

На правах рукописи

СУХОВ Владимир Сергеевич

**РОЛЬ РАСПРОСТРАНЯЮЩИХСЯ ЭЛЕКТРИЧЕСКИХ СИГНАЛОВ В
ПОВЫШЕНИИ УСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ К ОХЛАЖДЕНИЮ**

03.00.12 – физиология и биохимия растений.

*Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук*

Нижний Новгород
2006

Работа выполнена на кафедре биофизики Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского

Научный руководитель:

доктор биологических наук,
профессор **Пятыгин С.С.**

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук
профессор **Паничкин Л.А.**

кандидат биологических наук,
доцент **Кузнецова Т.Н.**

Ведущая организация:

Казанский институт биохимии и
биофизики КазНЦ РАН

Защита состоится 24 октября 2006г. в 15 часов на заседании диссертационного совета К212.166.06. Нижегородского государственного университета им Н.И. Лобачевского (603950, Нижний Новгород, пр. Гагарина, 23).

e-mail: vssuh@mail.ru

fax: (8312) 34-50-56

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Нижегородского государственного университета им Н.И. Лобачевского.

Автореферат разослан 15 сентября 2006г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
кандидат биологических наук

И.Ф. Александрова

Основные сокращения и обозначения

БЭР - биоэлектрическая реакция, ВП – переменный потенциал, ЗФ – замедленная флуоресценция, ПД – потенциал действия, ФСII – фотосистема II, СС – стрессовые сигналы, ФСА – фотосинтетическая активность, ЭС – электрические сигналы, $\Delta\psi$ – электрический потенциал тилакоидной мембраны, $\Delta\mu$ – химический потенциал тилакоидной мембраны.

Общая характеристика работы

Актуальность темы. Существование живого организма в меняющихся условиях окружающей среды требует наличия коммуникационных систем связи, обеспечивающих его целостный ответ на внешние воздействия. У растений, кроме относительно медленной гормональной системы (Медведев, 2004), существуют и быстрые механизмы интеграции, связанные с генерацией и распространением стрессовых сигналов (СС), которые возникают при локальном действии стресс-факторов и вызывают широкий спектр функциональных ответов за время порядка мин (Pena-Cortes et al., 1995; Lautner et al., 2005).

В настоящее время природа СС однозначно не установлена. По мнению ряда авторов (Fromm, Eschrich, 1993; Оприлов, 1998), СС связаны с генерацией и распространением электрических сигналов (ЭС), представленных у растений потенциалом действия (ПД) и переменным потенциалом (ВП) (Оприлов и др., 1991). В пользу такого предположения говорит ряд экспериментальных работ (Fromm, Fei, 1998; Herde et al., 1998; Herde et al., 1999b; Lautner et al., 2005 и др.). Однако существуют гипотезы, связывающие индукцию ответа с изменениями градиента электрического поля, гидравлическими волнами или колебаниями газового состава в воздушном пространстве листа (Полевой и др., 1997; Bowles, 1998; Stahlberg et al., 2001), поэтому природа СС требует дальнейшего изучения.

СС вызывает широкий спектр функциональных ответов. Среди них можно отметить влияние СС на экспрессию генов (Herde et al., 1996, 1999a; Davies et al., 1997), на поглощение и транспорт ряда веществ (Оприлов, 1978; Fromm, Bauer, 1994), на дыхание (Filek, Koscielniak, 1997), на фотосинтетические процессы (Fromm, Eschrich, 1993; Fromm, Fei, 1998), на содержание АТФ во флоэмном эксудате (Ретивин и др., 1999b) и т.д. По-видимому, их конечным результатом является повышение неспецифической устойчивости растительного организма (Ретивин и др., 1999a; Акимова и др., 2001). В то же время механизм влияния вызванных СС функциональных ответов на устойчивость растений к действию стресс-факторов остается слабо изученным. Существует предположение о том, что он может быть связан с увеличением содержания АТФ (Ретивин и др., 1999b) во флоэмном эксудате. Однако такая гипотеза остается в настоящее время неподтвержденной экспериментально.

Таким образом, хотя имеющиеся в литературе данные позволяют предположить, что ЭС могут играть ключевую роль в дистанционном повышении устойчивости растений к действию стресс-факторов, сам факт участия ПД и ВП в развитии ответа и его механизмы требуют дальнейшего изучения.

Цель и основные задачи исследования. Целью работы является изучение роли ЭС в формировании повышения устойчивости растений к действию стресс-факторов на примере холодоустойчивости.

В задачи работы входило:

1. Оценить способность повреждающих и неповреждающих локальных раздражений вызывать дистанционные изменения холодоустойчивости растительных объектов.
2. Проанализировать возможность участия электрических сигналов (ПД и ВП) в развитии ответа.
3. Исследовать влияние ЭС на содержание АТФ в гипокотиле.
4. Исследовать влияние АТФ на холодоустойчивость растений.
5. Исследовать связь изменений содержания АТФ с фотосинтетической активностью (ФСА).
6. Исследовать роль Ca^{2+} в развитии ответа.

Научная новизна. В работе впервые предложен возможный механизм участия ЭС, АТФ, ФСА и Ca^{2+} в процессе повышения холодоустойчивости растений. При этом проведен сравнительный анализ влияния на холодоустойчивость повреждающих и неповреждающих локальных раздражений. Впервые показана тесная связь между фактом возникновения ЭС и развитием функционального ответа. Впервые показана двухфазная зависимость холодоустойчивости от содержания АТФ и предложена математическая модель, объясняющая эту зависимость. Впервые выявлено вызванное ЭС увеличение выхода АТФ из листа и участие Ca^{2+} в формировании ответа. Впервые установлена связь вызванного ЭС повышения выхода АТФ и увеличения холодоустойчивости с ФСА. В индуцированных ЭС ответах ФСА (по параметрам замедленной флуоресценции (ЗФ)) выделено три различных этапа и – на основе разработанной авторами модели кривой затухания ЗФ – предложены их возможные механизмы.

Научно-практическое значение. Показанное в работе участие ЭС, АТФ, ФСА и Ca^{2+} в формировании дистанционного повышения холодоустойчивости растений после действия локального раздражителя способствует развитию представлений о механизмах интеграции растительного организма в единое целое и его адаптации к меняющимся условиям окружающей среды, что помимо научной ценности, может быть полезно для решения ряда практических вопросов.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту.

1. ЭС (как ПД, так и ВП) участвуют в передаче стрессовых сигналов у растений, индуцируя возрастание холодоустойчивости их участков, лежащих за пределами зоны раздражения.
2. ЭС вызывают увеличение концентрации АТФ в растении, играющее одну из основных ролей в формировании повышения их холодоустойчивости.
3. Увеличение содержания АТФ связано с развитием изменений ФСА в листе, которые включают в себя до трех этапов с различными механизмами, а сочетание развившихся этапов зависит от типа ЭС и вида растения.
4. Необходимым условием развития ответа является, по-видимому, вход Ca^{2+} в клетку.

Апробация работы. Основные результаты работы были представлены на Международной конференции «Рецепция и внутриклеточная сигнализация» (Пушино, 2003), III Международной конференции «Регуляция роста, развития и продуктивности растений» (Минск, 2003), VIII и IX Нижегородской сессии молодых ученых (Нижний Новгород, 2003, 2004), VIII Международной конференции «Актуальные проблемы сохранения устойчивости живых систем» (Белгород, 2004), III Съезде биофизиков России (Воронеж, 2004), VIII Пушинской конференции молодых ученых (Пушино, 2004), XVIII Пушинских чтениях по фотосинтезу (Пушино, 2005).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 12 работ.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, 3 глав (включая обзор литературы), заключения, выводов и списка литературы. Изложена на 153 странице, содержит 42 рисунка и 2 таблицы. Список цитируемой литературы включает 261 работы, из них 167 на иностранных языках.

Объект и методы исследования

В качестве объекта исследований использовали 2-3-недельные проростки тыквы *Cucurbita pepo* L. сорта Мозолеевская. Растения выращивали гидропонным способом (на керамзите, питательный раствор – 50 % среда Хоглэнда - Арнона 1) при естественном освещении и комнатной температуре (18-23 °С). Другим объектом исследования служили листья герани (*Pellargonium graveolens* L.), выращенной при естественном освещении на дерново-перегнойной почве. Подготовку растения к эксперименту (закрепление, удаление частей, отделение листьев от целого растения) выполняли за сутки до опыта.

В экспериментах применяли локальные раздражители двух типов – неповреждающий (наложение кусочка льда диаметром 0.5 см, 15 сек) и повреждающий (точечный ожог раскаленной проволокой, 1-2 сек). Раздражение наносили на гипокотиль (проростки тыквы), в 3 – 4 см от основания семядоли, или на кончик черешка (листья герани), на расстоянии 0.5 или 10 см от листовой пластинки.

Регистрацию биоэлектрических реакций (БЭР) осуществляли экстраклеточно с использованием хлорсеребряных макроэлектродов ЭВЛ-1М и высокоомного усилителя постоянного тока ЭВ-74. Регистрирующим устройством служило самопишущее устройство КСП-4 или персональный компьютер (с использованием АЦП L-205). При регистрации ЭС у проростков тыквы не менее чем за 1.5 часа до начала опыта электрод сравнения помещали в омывающую корень жидкость, а измерительный – на гипокотиль (в зоне раздражения или рядом с семядольными листьями) или на листовую пластинку (на основание, середину или край семядольного листа). В опытах с листьями герани измерительный электрод помещали на основании листа, а электрод сравнения – на его кончик.

Для оценки ФСА использовали параметры ЗФ, которую регистрировали в семядолях черенков тыквы (с удаленными корнями и побегом над семядольными листьями) или листьях герани. При этом регистрацию индукционных кривых ЗФ осуществляли с помощью медленного однолучевого фосфороскопа (Веселовский, Веселова, 1990) (белый свет, 10000 люкс, время между возбуждением и

регистрацией свечения – 16 мс). У индукционных кривых ЗФ оценивали такие параметры как амплитуда, стационарный уровень и время полуспада кривой. Регистрацию кривых затухания ЗФ в секундном диапазоне осуществляли с помощью специальной установки (белый свет, 10000 люкс, регистрация 1 сек, каждые 3 сек, с 3-й по 50-ю) (Ретивин и др., 1999а). В качестве параметров кривой затухания ЗФ использовали светосумму свечения по всему исследованному диапазону. Контролем служили либо нераздраженные объекты, либо те же растения до раздражения.

Холодоустойчивость проростков тыквы определяли методом электрофизиологической диагностики холодоустойчивости растений (Ретивин, Оприлов, 1992, 1993) (тестовое охлаждение -8°C , 7 – 15 мин, в зависимости от варианта эксперимента). Холодоустойчивость листьев герани определяли по степени снижения светосуммы секундной компоненты ЗФ после тестового охлаждения (-8°C , 11 или 25 мин) (Ретивин и др., 1999а). В качестве контроля использовали холодоустойчивость нераздраженных растений.

АТФ определяли люциферин-люциферазным методом (Оприлов и др., 1976). Содержание АТФ в семядольных листьях оценивали по ее выходу через срез семядоли в фиксированные (0.8 мл) объемы омывающего раствора, в которые последовательно погружали лист (экспозиция в каждом – 15 мин). Контролем служил выход АТФ до раздражения. При этом пересчет единиц свечения (усл. ед) в концентрацию не проводили. Содержание АТФ во флоэмном экссудате гипокотыля, определяли методом, описанным у Ретивина с соавторами (1999b). Контролем служило содержание АТФ во флоэмном экссудате у нераздраженных объектов.

Индукцированные локальными раздражениями изменения поглощения Ca^{2+} изучали методом меченых атомов (^{45}Ca) на отдельных семядолях. При этом сразу после раздражения черешка $^{45}\text{CaCl}_2$ вводили в омывающий срез семядоли раствор. Через 0.5 часа семядольный лист отмывали и разрезали на 3 части (черешок, нижняя и верхняя половины семядоли). Удельную активность их стандартных препаратов определяли с использованием торцового счетчика (МСТ-17) на установке «Б-2» «Волна». Контролем служила активность нераздраженных семядолей.

Для введения экзогенной АТФ или АДФ в проростки тыквы у них удаляли верхнюю часть гипокотыля, которую погружали в омывающий срез раствор. Через 1 час добавляли АТФ или АДФ (концентрации варьировали). После 0.5-часовой экспозиции у растений определяли холодоустойчивость или содержание АТФ во флоэмном экссудате гипокотыля. Листья герани за сутки до эксперимента разрезали на участки площадью 1 см^2 , которые погружали в омывающий раствор. За час до опыта в него добавляли АТФ или АДФ (экспозиция 1 час). Специфический ингибитор ФСП – диурон (10 мМ) или хелатор Ca^{2+} – ЭГТА (0.5 и 2 мМ) вводили в омывающий срез семядоли проростка тыквы раствор за сутки до эксперимента.

Эксперименты проводили в 5 – 10-кратной биологической повторности. Статистическую обработку результатов проводили методами вариационной статистики (Лакин, 1973; Тейлор, 1985) с использованием программ Microsoft

Excel 2000 и Primer of Biostatistics 4.03. При математическом моделировании использовали метод Эйлера и Монте-Карло (Буслов, Яковлев, 2001), расчеты проводили с помощью программ Microsoft Excel 2000 и Model Vision Studium 3.24.

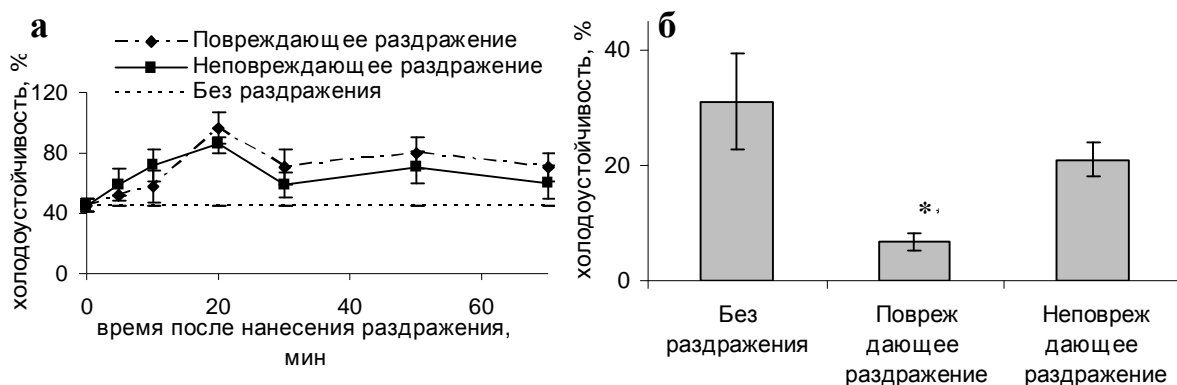


Рис. 1. Влияние повреждающего и неповреждающего локальных раздражений на дистанционную холодоустойчивость проростков тыквы (а) и листьев герани (б)

*Примечание: холодоустойчивость проростков тыквы (листьев герани) оценивали по отношению амплитуды БЭР (светосуммы ЗФ) после тестового охлаждения к соответствующей величине до охлаждения (в %), * - достоверно отличающиеся от контроля значения ($p < 0.05$)*

Результаты и их обсуждение

Исследование дистанционного влияния локальных раздражений на холодоустойчивость растений. Исследование дистанционного влияния локальных раздражений на холодоустойчивость проростков тыквы показало, что и неповреждающие, и повреждающие раздражения вызывали дистанционное повышение холодоустойчивости объекта, которое имело два недостоверных максимума (20 и 50 мин после воздействия) (Рис. 1а). При этом вызванный неповреждающими раздражениями ответ начинал развиваться быстрее, но в целом был меньше по величине.

В экспериментах с листьями герани, локальное повреждающее раздражение через 5 мин после нанесения вызывало дистанционное снижение холодоустойчивости, в то время как неповреждающее не индуцировало достоверных изменений (Рис. 1б). По-видимому, такое уменьшение устойчивости связано с отчленением листа и нарушением оттока метаболитов, изменения которых в норме, возможно, участвуют в повышении холодоустойчивости.

Таким образом, можно заключить, что локальные раздражения могут дистанционно менять холодоустойчивость проростков тыквы и листьев герани, их действие обладает определенной специфичностью и развивается в пределах 5-10 мин после нанесения. Эти результаты согласуются с представлением о существовании СС, способных индуцировать обратимое повышение неспецифической устойчивости растений (Ретивин, Опритов, 1993; Ретивин и др., 1997; Акимова и др., 1998). В то же время остается неизвестным, имеют ли СС электрическую природу?

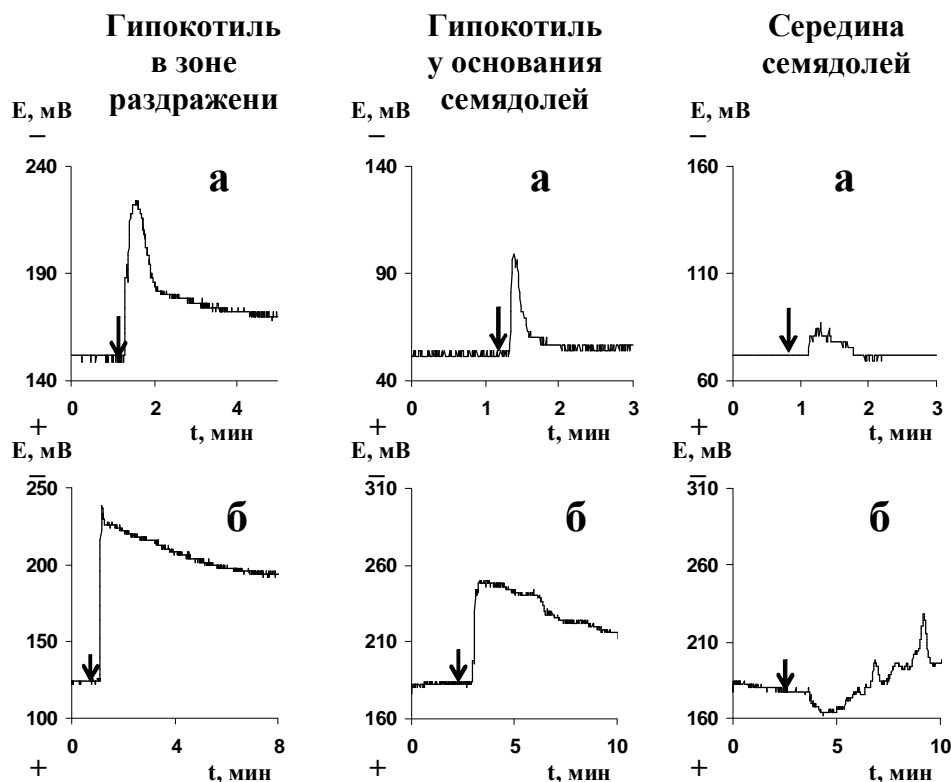


Рис. 2. Типичные примеры ЭС в различных участках проростка тыквы при неповреждающих (а) и повреждающих локальных раздражениях (б)

Примечание: стрелкой обозначено действие раздражителя

и их распространение до основания листа (30 ± 3 мВ). В большинстве случаев ЭС проходили в лист ($10 - 16$ мВ в различных участках листовой пластинки), за время порядка 10 сек. Типичные примеры ЭС приведены на рис. 2а. При этом ЭС в гипокотиле могут быть классифицированы как ПД, в то время как характеристика ЭС в семядоле более сложна. В частности их амплитуда ($10 - 16$ мВ) несколько ниже амплитуды ПД ($20 \div 100$ мВ (Fromm, 1991; Zavadzki et al., 1995)). Однако, такие важные признаки, как отсутствие затухания ЭС в семядоле на расстояниях порядка см (данные не приведены), при величине кабельной постоянной проводящих пучков тыквы 0.36 см (Ретивин, Опритов, 1987), и импульсная форма свидетельствует в пользу того, что ЭС в семядольном листе являются ПД.

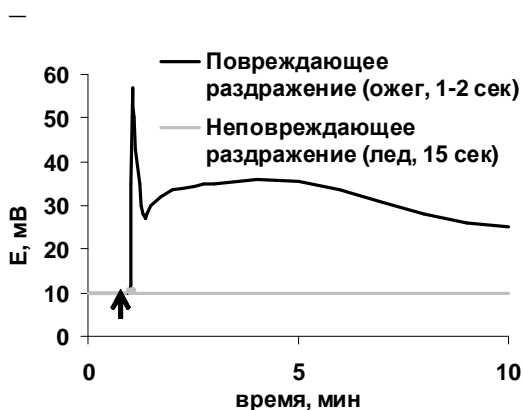


Рис. 3. Типичные примеры ответов потенциала в основании листа герани, при действии локальных

Исследования электрически вызванных локальными раздражениями. Изучение вызванных локальными раздражениями ЭС у проростков тыквы показало, что неповреждающие раздражения всегда вызывали генерацию ЭС в зоне действия (83 ± 6

Повреждающие раздражения всегда индуцировали в зоне раздражения ЭС (103 ± 4 мВ), которые распространялись по гипокотилу до основания семядоли (73 ± 4 мВ) и проходили в семядольный лист (38 ± 6 мВ). Типичные примеры таких сигналов приведены на рис. 2б. Учитывая связь с повреждающими раздражениями, амплитуду,

длительность и форму, они могут быть идентифицированы как ВП.

Изучение вызванных локальными раздражениями ЭС в листьях герани показало, что повреждающие раздражения вызывают распространяющиеся в листовую пластинку ЭС (ВП) (Рис. 3), в то время как неповреждающие раздражения не вызывали генерации распространяющихся ЭС (Рис. 3), что согласуется с отсутствием изменений холодоустойчивости при их действии.

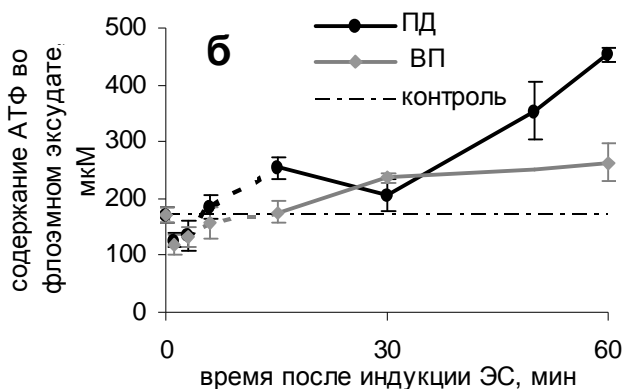


Рис. 4. Влияние ЭС на содержание АТФ во флоэмном эксудате проростков тыквы.

Исследование связи вызванного электрическими сигналами повышения содержания АТФ с увеличением холодоустойчивости. На следующем этапе исследования, был проведен анализ механизмов влияния ЭС на холодоустойчивость. Существует гипотеза (Ретивин и др., 1999b) о том, что одним из таких механизмов может быть связанное с метаболическими процессами возрастание содержания АТФ во флоэмном эксудате. Для проверки этого предположения было исследовано влияние ЭС на концентрацию АТФ во флоэмном эксудате. Было показано (Рис. 4), что ПД вызывал увеличение содержания АТФ (максимум – через 15 мин после индукции), затем концентрация АТФ снижалась до контрольного уровня, а потом вновь возрастала (максимум – через 60 мин после индукции). ВП вызывал монотонное возрастание содержания АТФ (Рис. 4) в эксудате.

В ходе дальнейшего анализа связи содержания АТФ во флоэмном экссудате (в стебле растения) и холодоустойчивости, было изучено влияние экзогенных АТФ и АДФ на устойчивость растений к охлаждению. Показано (Рис. 5а), что экзогенная АТФ с возрастанием концентрации вызвала двухфазное изменение холодоустойчивости – сначала возрастание (максимум при 1 мМ), а затем снижение до уровня ниже контрольного (3 мМ). Обработка экзогенной АДФ вызвала лишь недостоверное снижение холодоустойчивости (Рис. 5а). Обработка АТФ или АДФ

Таким образом, в пользу участия ЭС в индукции изменений устойчивости говорят следующие аргументы – (1) высокая вероятность их возникновения и распространения в лист, (2) малое (порядка 10 сек) время прохождения ЭС в лист и (3) отсутствие изменений холодоустойчивости при отсутствии генерации ЭС.

Исследование связи вызванного электрическими

сигналами повышения содержания АТФ с увеличением

холодоустойчивости.

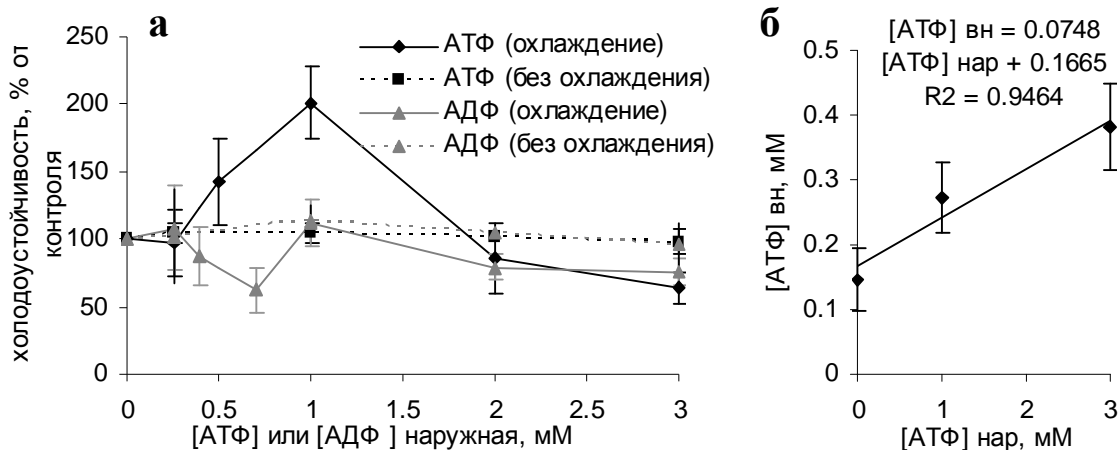


Рис. 5. Влияние экзогенных АТФ и АДФ на холодоустойчивость проростка тыквы (а) и связь между концентрацией экзогенной АТФ в наружном растворе ([АТФ]нар) и ее концентрацией в зоне, где исследовалась холодоустойчивость ([АТФ]вн) (б)

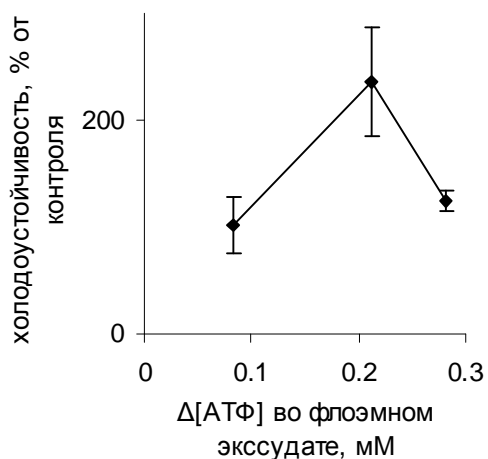


Рис. 6. Вызванное ПД повышение холодоустойчивости проростков тыквы в условиях затемнения после охлаждения на коротком интервале

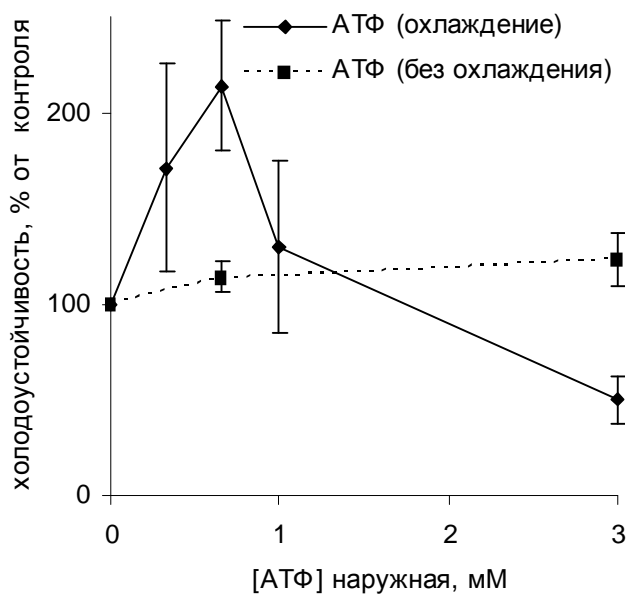


Рис. 7. Влияние экзогенной АТФ на

разной концентрации при отсутствии повреждения растения (без охлаждения) не вызвала достоверных изменений амплитуд тестовых БЭР. Изучение связи концентрации экзогенной АТФ с содержанием АТФ в гипокотиле (в зоне, где исследовалась холодоустойчивость) показало, что между ними наблюдается линейная зависимость (Рис. 5б). Это свидетельствует о том, что при использованном методе обработки, экзогенная АТФ проходит в гипокотиль и, по-видимому, вызывает изменение устойчивости растения.

В то же время между величинами вызванных ЭС изменений содержания АТФ во флоэмном экссудате (Рис. 4) и изменений холодоустойчивости (Рис. 1а) наблюдается некоторое несоответствие. Это может быть обусловлено освещением объекта после охлаждения и дальнейшим синтезом АТФ, возможно, связанным с ФСА. Для устранения такой возможности в отдельной серии экспериментов сразу после охлаждения проростки тыквы затемняли. Было показано, что через

15 мин после ПД изменений холодоустойчивости не наблюдается, через 50 мин происходит значительное ее возрастание, через 60 мин – величина устойчивости снижается, но остается достоверно повышенной. Если построить зависимость полученных в данном эксперименте значений холодоустойчивости от содержания АТФ во флоэмном эксудате на соответствующих интервалах времени после индукции ЭС (Рис. 4), то можно получить кривую (Рис. 6), очень близкую к наблюдаемой при действии экзогенной АТФ.

Изучение влияния экзогенной АТФ на холодоустойчивость участков листа герани (определенную по угнетению светосуммы ЗФ) показало, что в этом варианте эксперимента также наблюдается двухфазная зависимость холодоустойчивости от концентрации АТФ (максимум – 0.66 мМ) (Рис. 7). При отсутствии

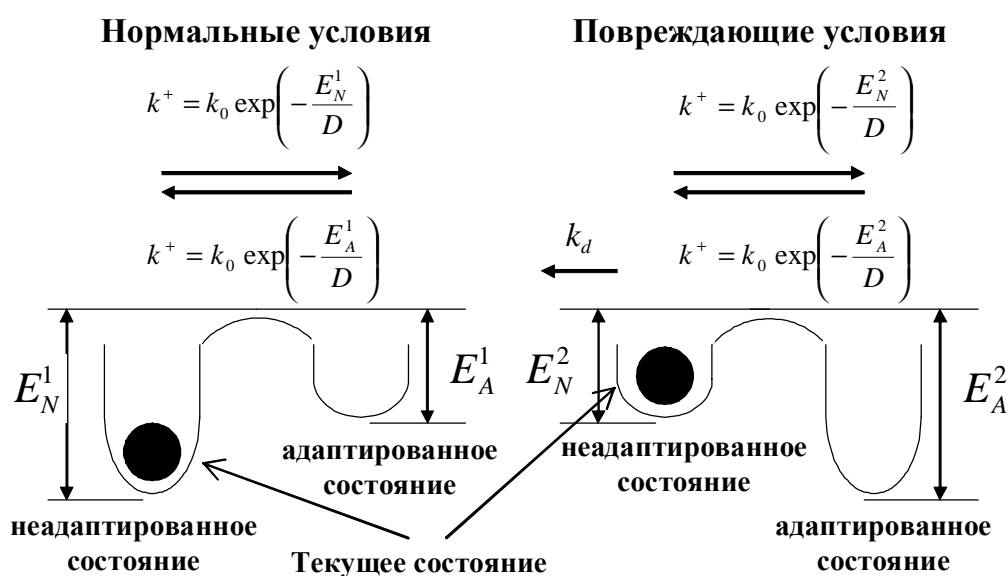


Рис. 8. Схема состояний организма, использованная в модели адаптации

повреждения растения (без охлаждения) АТФ не вызывает достоверных изменений светосуммы ЗФ (Рис. 7). АДФ на холодоустойчивость не влияет.

Таким образом, АТФ (но не АДФ) может двухфазно менять холодоустойчивость растительного объекта (повышение, затем снижение), что согласуется как с гипотезами о положительном влиянии АТФ на устойчивость (Allakhverdiev et al., 2005a, 2005b, 2005c), так и с представлениями об опасности избытка АТФ для растительного организма (Климов, 1997; Noctor, Foyer, 2000). Однако каким именно путем осуществляется такое влияние? Представляется маловероятным, чтоб оно было связано с сигнальной функцией АТФ, так как изменения ее содержания необходимые для развития эффекта составляют 100 – 200 мкМ, в то время как для формирования половины ответа при сигнальной функции АТФ требуется ее концентрация приблизительно 3 мкМ (Demidchik et al., 2003). Кроме того АДФ не вызывало повышение холодоустойчивости ни в одном из вариантов эксперимента, в то время как она также может служить в качестве сигнальной молекулы (Demidchik et al., 2003). На основании этого можно предположить, что основную роль в повышении холодоустойчивости играет энергетическая функция АТФ.

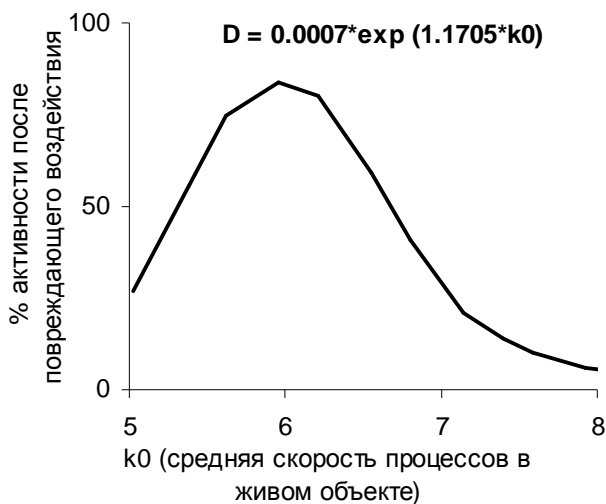


Рис. 9. Влияние D и k_0 на устойчивость симулированного моделью объекта в условиях однонаправленного их изменения
Примечание: экспоненциальная зависимость D от k_0 получена при анализе связи этих параметров (см. текст)

условиях более вероятным становилось адаптированное, при неповреждающих – неадаптированное состояние. При этом, с АТФ, по-видимому, связана k_0 (k_0 пропорциональна [АТФ]), так как большинство процессов энергозависимы. Связь АТФ и E возможна, но она, вероятно, специфична для разных процессов, поэтому в обобщенной модели не рассматривалась. Для анализа связи АТФ (k_0) и D была построена вспомогательная модель синтеза (константа скорости $k_0 \cdot \zeta$, где ζ – случайная величина, с распределением близким к нормальному) и утилизации (константа скорости k_0) метаболита. При ее решении методом Монте-Карло было показано, что дисперсия концентрации метаболита (отражающая D) экспоненциально связана с содержанием АТФ (k_0) (данные не приведены). Таким образом, АТФ, по-видимому, увеличивает и уровень флуктуаций в системе.

Изучение влияния однонаправленного изменения k_0 и D показало, что величина сохранившейся активности после тестового повреждающего воздействия (т.е. устойчивость симулированного моделью объекта) сначала растет, а затем снижается ниже начального уровня (Рис. 9). Такой результат очень близок к наблюдаемому в эксперименте влиянию АТФ и позволяет предположить, что оно связано как с ростом средних скоростей, так и с повышением уровня флуктуаций в системе. Последнее возможно даже более значимо, так при максимальной устойчивости k_0 увеличивается всего на 20 %, в то время как D – возрастает в 3 раза. При этом конкретные процессы, отвечающие за повышение устойчивости, могут быть различны – экспрессия генов и белковый синтез (Hincha, 2002; Koike et al., 2002; Gaudet et al., 2003), перестройки в липидном матриксе (Опритов, 1998), изменения содержания сахаров (Hekneby et al., 2006) и т.д. Таким образом, достоинством предложенной модели является и то, что она может показать некоторые важные аспекты повышения устойчивости без обращения к конкретным процессам.

С целью анализа возможных путей влияния АТФ на устойчивость растительного объекта, нами была разработана математическая модель адаптации живого объекта. Она предполагала существование двух его состояний – неадаптированного (в котором объект повреждался под действием стресс-факторов) и адаптированного (объект не был подвержен действию стресс-факторов) (Рис. 8). Переходы между ними определялись параметрами E – «потенциальный барьер», который необходимо преодолеть для перехода в другое состояние, k_0 и D – средняя скорость процессов и уровень их флуктуаций (дисперсии) в объекте. При повреждающих

Из изложенного следует, что увеличение содержания АТФ, по-видимому, действительно повышает холодоустойчивость растительного объекта, в то же время остаются неясными механизмы, обеспечивающие возрастание концентрации АТФ.

Исследование связи увеличения содержания АТФ с фотосинтетической активностью. Задачей следующего этапа исследования было изучение механизмов вызванного ЭС возрастания содержания АТФ во флоэмном эксудате. Из литературы хорошо известно (Малофеев, 1971; Pena-Cortes et al., 1995; Koziol et al., 2004 и др.), что ЭС могут вызвать изменения ФСА. Было предположено, что именно они ответственны за увеличение концентрации АТФ. Для проверки этой гипотезы было изучено влияние ЭС на выход АТФ из семядолей проростков тыквы, так как именно в них преимущественно и протекают фотосинтетические процессы. Было показано (Рис. 10а), что при этом наблюдается возрастание выхода АТФ,

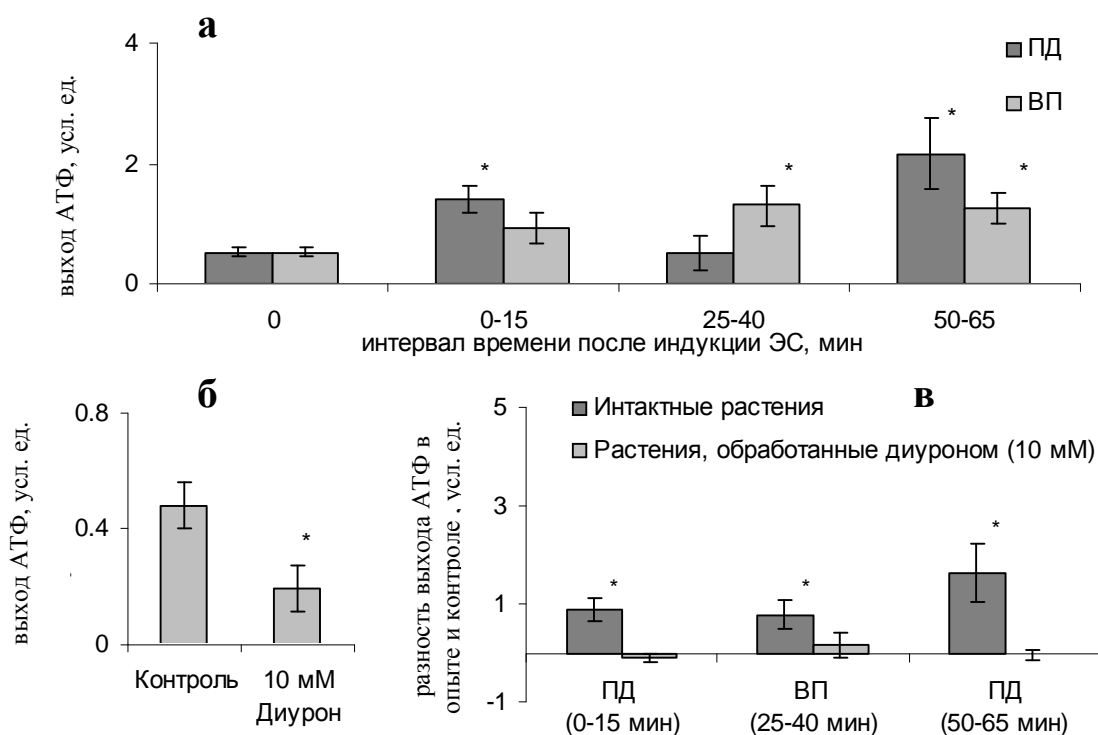


Рис. 10. Влияние ЭС на выход АТФ из семядольных листьев интактных проростков тыквы (а) и влияние обработки диуроном на ее выход в покое (б) и при развитии индуцированных ЭС ответов (в)

*Примечание: * - достоверно отличающиеся от контроля значения ($p < 0.05$)*

очень близкое по своей динамике к увеличению содержания АТФ в эксудате. В то же время увеличение выхода АТФ было больше по относительной величине и развивалось быстрее, нежели изменение содержания АТФ в эксудате, что свидетельствует в пользу его первичности. Обработка ингибитором транспорта e^- через ФСII (диуроном) более чем в 2 раза снижала выход АТФ у нераздраженных растений (Рис. 10б) и полностью подавляла его изменения, вызванные ЭС (Рис. 10в). Такие результаты показывают, что увеличение выхода АТФ обусловлено ФСА (поток e^- через ФСII) и, по-видимому, отражает связанное с ФСА возрастание ее содержания в семядоле. В ходе дополнительного исследования

было установлено, что обработка диуроном также полностью подавляла вызванное ЭС

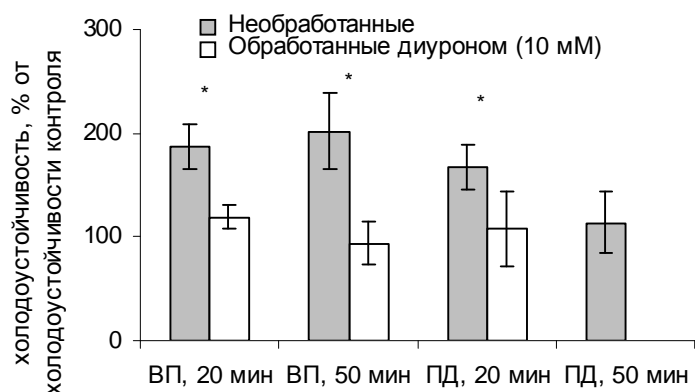


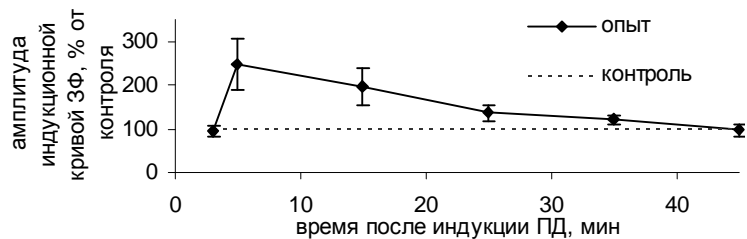
Рис. 11. Влияние диурина на вызванное ЭС повышение холодоустойчивости проростка тыквы

*Примечание: * - достоверно отличающиеся от контроля значения ($p < 0.05$)*

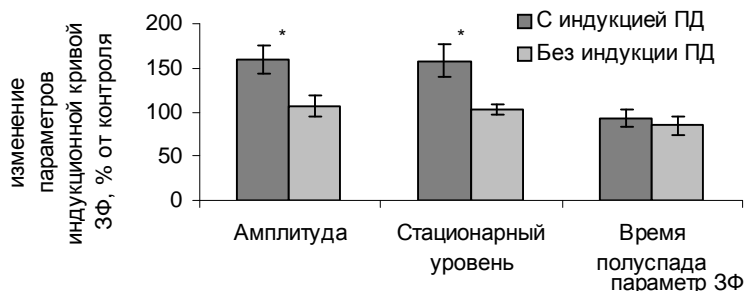
которую оценивали по параметрам ЗФ. При этом было показано, что ПД у черенков проростков тыквы вызывал быстрое и обратимое повышение амплитуды индукционной кривой ЗФ (Рис. 12а). Детальное исследование параметров ЗФ через 10 мин после раздражения выявило близкие изменения амплитуды и стационарного уровня ЗФ, при отсутствии ответа времени полуспада (Рис. 12б). ВП вызывал изменения ЗФ сложной кинетики (Рис. 12в), среди которых может быть выделено 3 этапа (Рис. 12г). Так 1-й (близкий к вызванному ПД ответу) продолжался до 15-й минуты после раздражения и характеризовался увеличением амплитуды и стационарного уровня, при отсутствии изменений времени полуспада. 2-й (15 – 30 мин) сопровождался возрастанием амплитуды и времени полуспада, при отсутствии изменений стационарного уровня. 3-й (более 30 мин) был близок по свойствам 1-му. Таким образом, ЭС способны вызывать изменения ФСА проростков тыквы. При этом ответ зависит от типа сигнала (ПД или ВП) и может включать в себя до 3-х этапов, имеющих, по-видимому, разные механизмы.

возрастание холодоустойчивости модельного объекта (проростка тыквы с удаленным побегом над семядольными листьями, одной из семядолей и частью другой) (Рис. 11). Учитывая связь АТФ и холодоустойчивости, это также свидетельствует в пользу того, что именно изменения ФСА вызывают рост содержания АТФ в стебле.

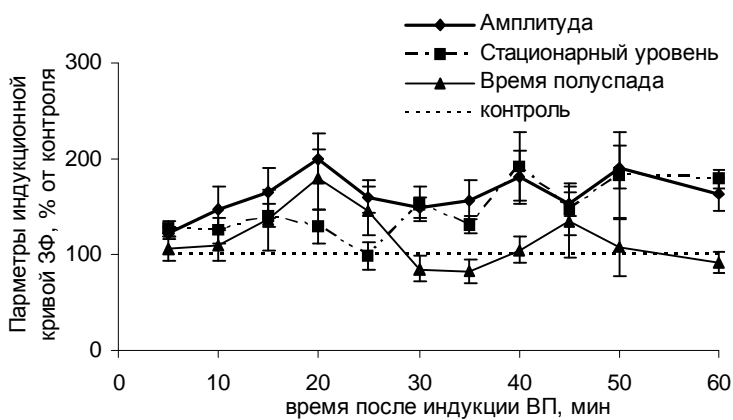
Для более детальной проверки этой гипотезы было изучено влияние ЭС на ФСА,



б



в



г

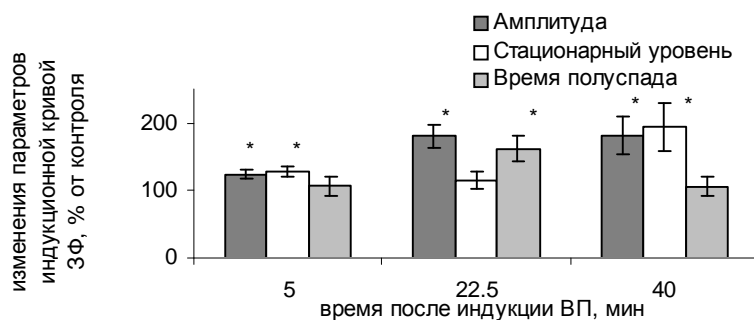


Рис. 12. Величина амплитуды индукционной кривой 3Ф на разных интервалах времени после индукции ПД (а) и ВП (в), значения параметров индукционной кривой через 10 мин индукции ПД (б) и через 5, 22.5 и 40 мин после индукции ВП (г)

Примечание: * - достоверно отличающиеся от контроля значения ($p < 0.05$)

Дополнительные эксперименты с листьями герани показали,

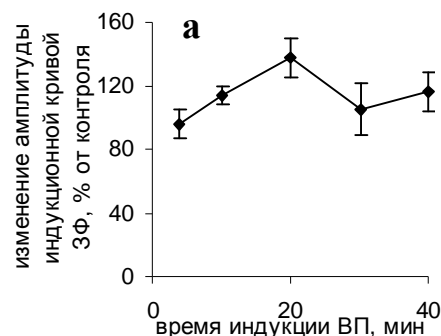


Рис. 13. Зависимость величины 3Ф и светосуммы кривой

что ВП вызывал изменения амплитуды и стационарного уровня индукционной кривой 3Ф, однако их кинетика была различна. Так максимум повышения амплитуды индукционной кривой развивался через 20 мин после индукции ЭС (Рис. 13а), а стационарного уровня – через 4 – 5 мин (Рис. 13б). Через 30 – 40 мин после раздражения параметры 3Ф снижались до величин достоверно не отличающихся от контроля. Исследование влияния ЭС на секундную компоненту 3Ф показало, что ВП вызывал обратимое

снижение светосуммы свечения (Рис. 13в). Как и в экспериментах с проростками тыквы, изменения ФСА могут быть разделены на 2 этапа. При этом 1-й этап характеризуется значительным возрастанием стационарного уровня индукционной кривой и снижением светосуммы 3Ф, при слабых изменениях амплитуды. 2-й этап связан в первую очередь с возрастанием амплитуды индукционной кривой 3Ф, при отсутствии отчетливых изменений динамики стационарного уровня и

слабом снижении светосуммы. Учитывая сходство особенностей 1-го и 2-го этапов ответа у герани и у проростков тыквы, можно предположить, что они имеют близкие механизмы. В то же время, из литературы известно, что ответы сходные по динамике с 1-м этапом изменений ФСА сопровождаются снижением поглощения CO_2 (Pena-Cortes et al., 1995; Koziolok et al., 2004; Lautner et al., 2005), которое возможно и индуцирует развитие ответа. Для проверки связи изменений ФСА с газообменом, листья герани были за сутки до эксперимента обработаны вазелином (их газообмен был снижен). При этом показано (Рис. 13в), что такая обработка более чем в 2 раза уменьшает 1-й этап ответа, не оказывая никакого влияния на 2-й. Это свидетельствует в пользу связи начального этапа ответа ФСА с изменениями поглощения CO_2 .

В отдельной серии опытов было показано, что действие локального неповреждающего раздражителя на черешок листа герани не вызывает изменений ни одного из исследуемых параметров ЗФ (данные не приведены), что согласуется с отсутствием в этом варианте опыта ЭС и изменений холодоустойчивости.

Для дальнейшего анализа возможных механизмов развития изменений ФСА было необходимо более детальное изучение связи между параметрами ЗФ и ФСА. Эта задача может быть решена методами математического моделирования, поэтому целью следующего этапа исследования стала разработка математической модели кривой затухания ЗФ. Основой математической модели ЗФ служила схема ФСЦ, разработанная с учетом работ Hankamer, Barber (1997) и Беляевой с соавт. (2000), которая включала в себя 6 состояний донорной и 5 состояний акцепторной

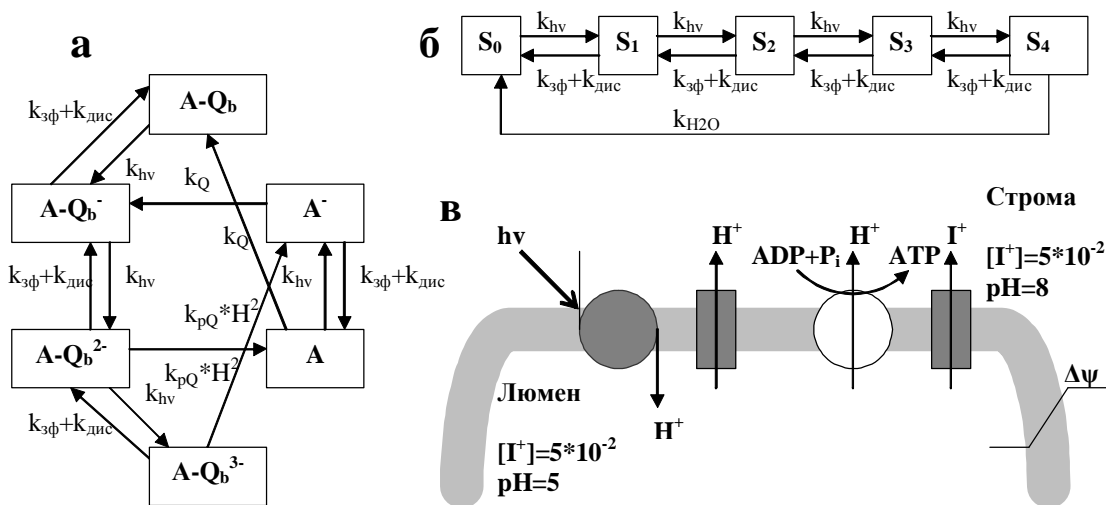


Рис. 14. Схемы акцепторной (а) и донорной (б) сторон ФСЦ, а также электрофизиологическая схема тилакоида (в), использованные в модели кривой затухания ЗФ

стороны (Рис. 14а, б). При этом уравнения динамики вероятностей различных состояний ФСЦ, полученные на ее основе, решали либо в условиях освещения, либо в условиях развития кривой затухания ЗФ в темноте ($k_{hv} = 0$). Кроме того, в ней были учтены изменения электрического потенциала тилакоидной мембраны ($\Delta\psi$) (Пикуленко, 2005), которые были описаны как пассивного (утечка) и активного (H^+ -АТФ-синтетаза) потоков протонов и пассивного потока положительного иона (Рис. 14в). Пассивные токи описывали уравнением Гольдмана, H^+ -АТФ-синтетазу – уравнением для активного протонного потока из

работы Veilby et al. (2001). В модели также учитывали изменения концентрации протонов и произвольного положительного иона, а также буферные свойства стромы и люмена для H^+ . Непосредственно, константу скорости ЗФ (а также тепловой диссипации) описывали уравнением (1):

$$k_{зф(дис)} = k_{фл}(k_{дис}) \exp\left(\frac{F}{RT}(E_D + E_{Ph} + E_{Qa} + E_{Qb} + \Delta\psi)\right) \quad (1)$$

где $k_{фл}(k_{дис})$ - константа скорости флуоресценции (тепловой диссипации) возбужденного состояния пигмента, F, R, T – стандартные термодинамические величины, E_D, E_{Ph}, E_{Qa} и E_{Qb} – величины потенциальных барьеров, препятствующих обратному переносу зарядов из донорной стороны, Ph, Q_a и Q_b , соответственно. В случае переходов из состояний $A-Q_b^{3-}$ и $A^- - E_{Qb}$ принимали равным нулю. Параметры модели, частично брали из литературы, частично – подбирали. Модель решали численно, в условиях соответствующих длительному предварительному освещению (стационарные условия) и в условиях первых секунд освещения после темновой адаптации (не работает H^+ -АТФ-синтетаза, отсутствует ΔpH , большой $\Delta\psi$) (пиковые условия).

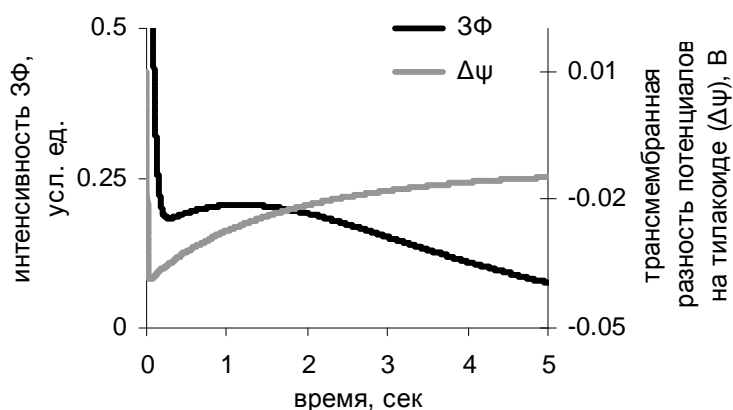


Рис. 15. Кривые затухания ЗФ и изменения трансмембранного потенциала ($\Delta\psi$) симулированные математической моделью

Численное решение модели показало, что она может симулировать основные свойства кривой затухания ЗФ (наличие миллисекундных и секундных компонент, второй максимум свечения и др. (Веселовский, Веселова, 1990)) (Рис 15). Далее разработанную модель использовали при анализе возможных механизмов различных этапов ответа ФСА. В анализе использовали

такие характеристики симулированных моделью кривых затухания ЗФ, как величина свечения на 15-й мс в стационарных и пиковых условиях (соответствует стационарному уровню и амплитуде индукционной кривой ЗФ, соответственно) и светосумма секундной компоненты в стационарных условиях.

Анализ предположения о первичной роли снижения поглощения CO_2 в развитии 1-го этапа ответа ФСА показал, что соответствующие такому снижению и накоплению первичных продуктов фотосинтеза изменения параметров модели (уменьшение концентрации H^+ в строме (H), активности H^+ -АТФ-синтетазы и скорости возврата пластохинонов на ФСП (k_Q)) вызывают близкие к экспериментальным изменения показателей ЗФ (Рис. 16а). При этом различия между 1-ми этапами изменений ФСА у тыквы (амплитуда ЗФ возрастает) и у герани (амплитуда не меняется), могут быть связаны с разной скоростью диссипации ΔpH и пула НАДФН₂ при затемнении, так как время развития амплитуды ЗФ (приблизительно 1 сек) значительно меньше времени необходимого

для нового формирования обусловленного снижением поглощения CO_2 увеличения ΔpH и пула НАДФН₂ (порядка 10-в сек). Таким образом, математическая модель демонстрирует возможность участия инактивации поглощения CO_2 в формировании 1-го этапа ответа. При учете угнетающего влияния на развитие 1-го этапа ответа снижения газообмена, а также данных литературы (Pena-Cortes et al., 1995; Koziolok et al., 2004; Lautner et al., 2005), его связь с инактивацией процессов поглощения CO_2 представляется весьма вероятной. В качестве возможных причин этого можно отметить связанный с развитием ЭС вход Ca^{2+} , который может инактивировать ферменты цикла Кальвина (Portis, Heldt, 1976; Веселовский, Веселова, 1990), а также обусловленное ЭС (Ретивин, Викулов, 1980) закисление цитоплазмы и защелачивание апопласта. Последнее может снижать вход CO_2 (Bulychev et al., 2001), и – за счет закисления стромы – непосредственно влиять на ферменты темновой стадии фотосинтеза, активность которых при низких рН уменьшается (Веселовский, Веселова, 1990).

2-й этап развития вызванных ЭС изменений ФСА (15 – 30 мин), по-видимому, не связан с темновой стадией (сопровождается увеличением амплитуды индукционной кривой, не зависит от уровня газообмена) и соответствует по времени показанному в ряде работ увеличению поглощения CO_2 (Fromm, Eshrich, 1993; Pena-Cortes et al., 1995; Fromm, Fei, 1998). Можно предположить, что он связан с состоянием тилакоидной мембраны (в частности, с ее ионной проницаемостью). Изучение влияния снижения ионной проницаемости на симулированные моделью кривые затухания ЗФ показало (Рис. 16б), что в этом случае наблюдается слабое уменьшение светосуммы, умеренное возрастание величины ЗФ на 15-й мс

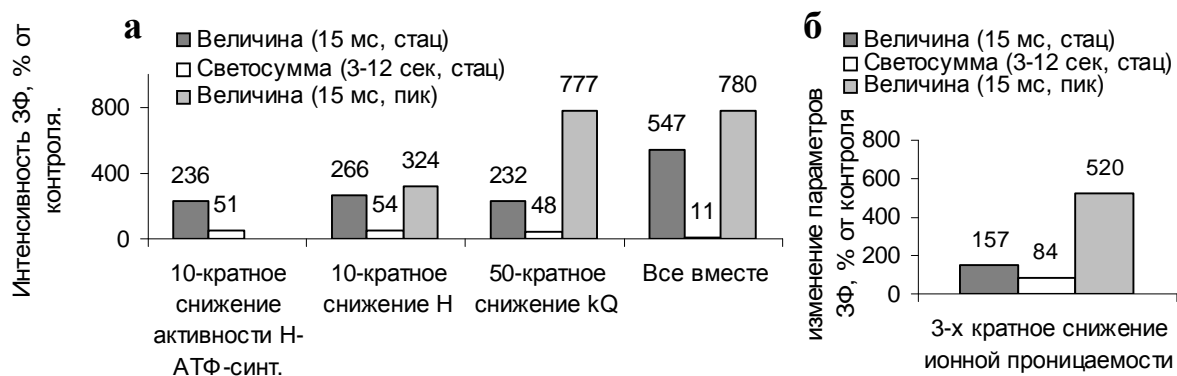


Рис. 16. Симулированные моделью величина ЗФ на 15-й миллисекунде после начала кривой затухания ЗФ (стационарные и пиковые условия) и светосумма на секундном диапазоне (стационарные условия) при снижении активности Н-АТФсинтазы, содержания протонов в строме (Н) и kQ (а) или при снижении ионной проницаемости тилакоидной мембраны (б)

стационарных условиях и очень значительное ее увеличение в пиковых условиях. Такие результаты хорошо согласуются с наблюдаемым в экспериментах на 2-м этапе изменений ФСА значительным возрастанием амплитуды ЗФ, слабым повышением ее стационарного уровня и небольшим снижением светосуммы свечения в секундном диапазоне. В пользу такого механизма свидетельствует и рост времени полуспада, так как наблюдаемый в экспериментах первый пик

индукционной кривой ЗФ связан с $\Delta\psi$ (Веселовский, Веселова, 1990), а скорость трансформации $\Delta\psi$ в ΔpH будет уменьшаться по мере снижения ионной проницаемости мембраны тилакоида. Возможные пути развития уменьшения ионной проницаемости тилакоидной мембраны неизвестны, однако, учитывая существование на ней ионных каналов (Pottosin, Schonknecht, 1996; Hinnah, Wagner, 1998), в том числе – Ca^{2+} -зависимых (Vambutas et al., 1994), можно предположить, что в развитии ответа могут участвовать Ca^{2+} и ионные каналы.

3-й этап ответа (более 30 мин после индукции ЭС) наиболее сложен для интерпретации. Учитывая сходство его динамики с временными параметрами вызванного ЭС медленного снижения поглощения CO_2 и изменений состояния ФСА, показанных в ряде работ (Pena-Cortes et al., 1995; Herde et al., 1999a), можно предположить, что он с одной стороны связан с инактивацией темновой стадии фотосинтеза (отсюда его сходство с 1-м этапом), а с другой – возможно, с медленными перестройками в самом фотосинтетическом аппарате. В ряде работ показано, что одним из звеньев такого ответа является синтез некоторых фитогормонов, в частности АБК (Herde et al., 1996, 1999b), которая способна модулировать темновую стадию фотосинтеза (Meyer, Genty, 1998) и пигментный состав фотосинтетического аппарата (Ivanov et al., 1995). На основании этого, можно допустить, что 3-й этап ответа связан с обусловленной синтезом ряда фитогормонов медленной инактивацией темновой стадии фотосинтеза и перестройками фотосинтетического аппарата, однако это предположение в

значительной степени гипотетично.

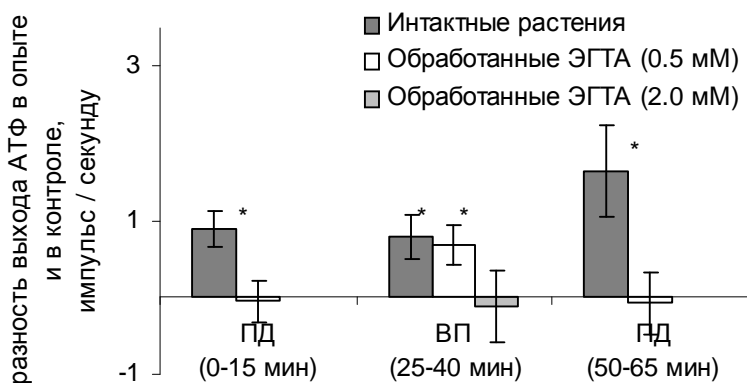


Рис. 17. Влияние ЭГТА на индуцированные ЭС изменения выхода АТФ из семядольного листа

Таким образом, ЭС сигналы способны индуцировать сложные ответы ФСА, включающие в себя (в зависимости от типа ЭС и вида растения) до трех различных по механизмам этапов. При этом временные параметры развития изменений ФСА близки к соответствующим параметрам увеличения

выхода АТФ, что дополнительно свидетельствует в пользу их связи. Определенное противоречие возникает только в случае 2-го повышения выхода АТФ после ПД, которому не соответствуют изменения ФСА у проростков тыквы. Возможно, это связано с исследованием ФСА на черенках, а не на интактных растениях, вследствие чего нарушалось нормальное развитие ответа ФСА (судя по временным характеристикам – его 3-го этапа). Такое предположение подтверждает и отсутствие второго максимума холодоустойчивости (через 50 мин после индукции ПД) у проростков тыквы с удаленным побегом над семядолями и семядольным листом (Рис. 11). При этом связь между выходом АТФ и ответами ФСА, по-видимому, реализуется через увеличение концентрации АТФ, которая может

возрастать как за счет снижения потребления АТФ в цикле Кальвина (1-й и 3-й этапы ответа), так и за счет обусловленной ростом $\Delta\psi$ на тилакоидной мембране активации синтеза (Junesch, Graber, 1991) (2-й этап ответа). Возникающий в результате этого избыток АТФ в листе в дальнейшем, по-видимому, транспортируется с током флоэмного эксудата в стебель, где увеличение содержания АТФ вносит свой вклад в повышение устойчивости растения к охлаждению.

Исследование участия Ca^{2+} в формировании ответа. Показанное выше влияние ЭС на ФСА и – как следствие – на содержание АТФ оставляет открытым вопрос – через какие именно процессы реализуется это влияние? Было предположено, что одним из таких процессов может быть вход ионов кальция, которые, являясь вторичными мессенджерами, модулируют широкий спектр процессов в растительной клетке (Тарчевский, 2001). В связи с этим было установлено, что обработка ЭГТА (0.5 мМ для ПД и 2 мМ для ВП) вызывает подавление вызванного ЭС увеличения выхода АТФ из семядольного листа (Рис. 17), что говорит о значимости внешнего Ca^{2+} для нормального развития ответа. В ходе дополнительного исследования было показано, что локальные раздражения вызывают рост поглощения ^{45}Ca черешком семядолей (данные не приведены). Таким образом, вход Ca^{2+} , по-видимому, играет определенную роль в развитии вызванных ЭС ответов.

Предполагаемая схема участия ЭС, АТФ, ФСА и Ca^{2+} в развитии дистанционного повышения холодоустойчивости растений. На основании проведенного нами анализа была предложена возможная схема участия ЭС, Ca^{2+} , АТФ и ФСА в развитии дистанционного повышения холодоустойчивости растений (Рис. 18). В соответствии с ней при действии локальных раздражителей возникают ЭС, которые распространяются по стеблю и проходят в листовую пластинку, где при

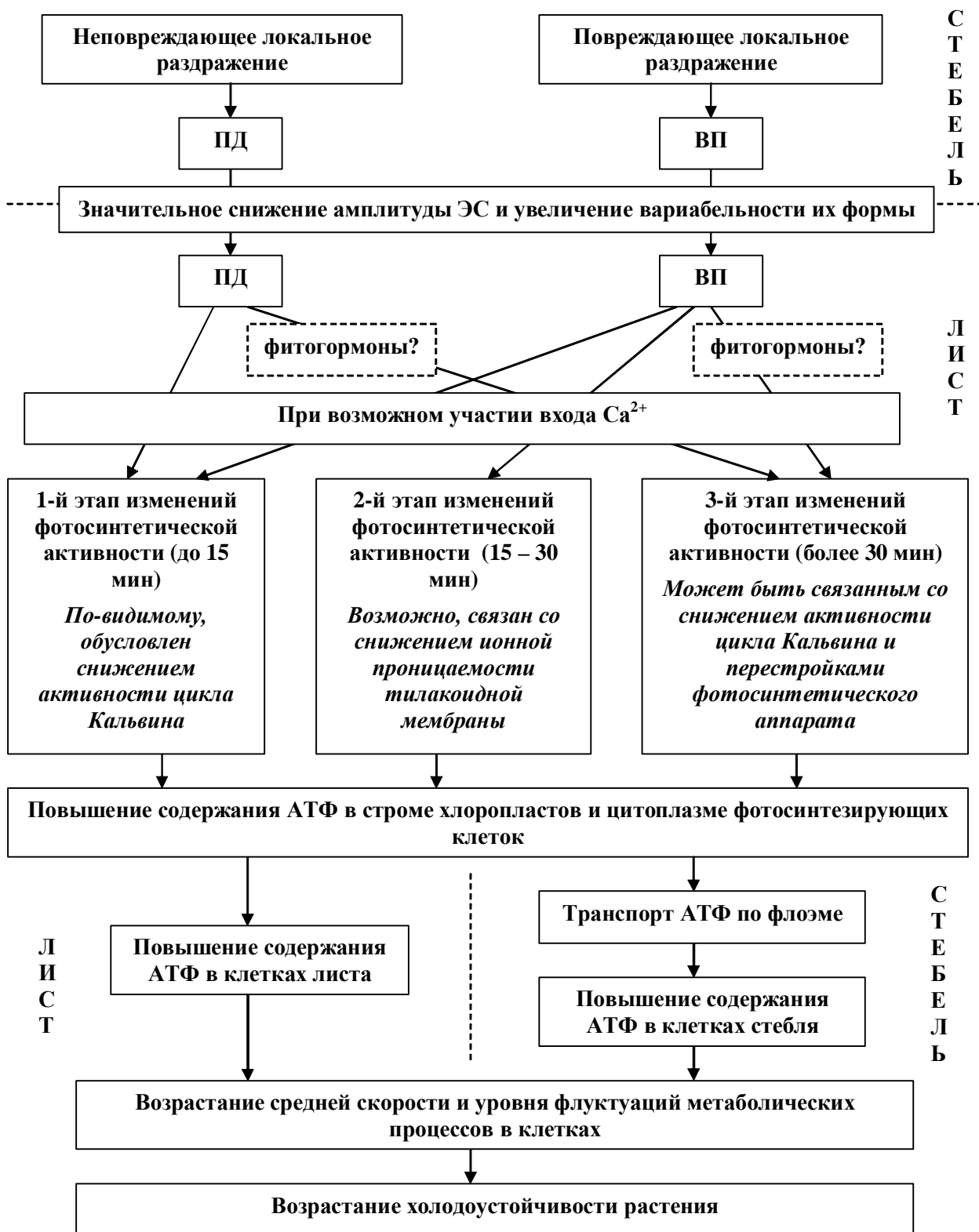


Рис. 18. Схема предполагаемых путей участия электрических сигналов, Ca^{2+} , фотосинтеза и АТФ в развитии вызванного локальными стрессовыми воздействиями дистанционного повышения холодоустойчивости растения

участии входа Ca^{2+} вызывают изменения ФСА, которые могут включать до трех этапов ответа, связанных с разными механизмами. Конечным результатом всех этапов изменений ФСА является увеличение содержания АТФ в фотосинтезирующих тканях и – посредством транспорта в составе флоэмного

эксудата – в стебле. В свою очередь, АТФ повышает среднюю скорость процессов и уровень флуктуаций в организме, облегчая тем самым переход растения в адаптированное состояние и индуцируя повышение его холодоустойчивости.

Заключение

Результаты настоящего исследования позволяют считать, что ЭС играют важную роль в формировании повышения холодоустойчивости растения под действием локальных стресс-факторов. При этом ЭС, по-видимому, передают информацию о наличии локального стрессового воздействия в другие части растения, где – возможно, при участии входа Ca^{2+} в клетку – вызывают изменения ФСА. В результате последних формируется избыток АТФ, который обеспечивает повышение холодоустойчивости растительного организма, возможно, путем ускорения метаболических процессов и увеличения уровня их флуктуаций в растении. Таким образом, можно полагать, что ЭС, вход Ca^{2+} , изменения ФСА и увеличение содержания АТФ образуют единую последовательность событий, обеспечивающих целостный ответ растения на локальные раздражения и повышение его устойчивости к действию стресс-факторов.

Среди других интересных результатов исследования можно отметить влияние АТФ на холодоустойчивость, которое целесообразно рассмотреть в контексте эффективности функционирования растения. Так, если после действия локального раздражителя не начинает действовать более сильный, влияющий на целое растение стресс-фактор, то структурные перестройки (один из вариантов адаптации организма) оказываются излишними. Несколько иная ситуация складывается при повышении содержания АТФ, которая в случае отсутствия действия более интенсивного стресс-фактора может быть использована в других клеточных процессах. С другой стороны, при действии стресс-фактора, она – посредством роста скоростей и уровня флуктуаций в живой системе – может облегчать переход растения в более адаптированное состояние и последующие процессы репарации. Таким образом, можно предположить, что вызванное ЭС повышение холодоустойчивости (а возможно и общей устойчивости) растения связано не с собственно адаптацией, а с созданием условий, в которых развитие адаптационных процессов под действием влияющих на целое растение стресс-факторов будет облегчено. Возможно, что этот принцип может использоваться растительным организмом и в иных вариантах развития повышения устойчивости.

Еще один важный аспект полученных результатов связан с ролью флуктуаций в процессе адаптации организма. В его рамках показано, что возрастание уровня флуктуаций может не только уменьшать, но и увеличивать устойчивость биообъекта.

Таким образом, полученные результаты вносят вклад в понимание механизмов адаптации растительного организма к действию стрессовых факторов.

Выводы

1. У проростков тыквы и листьев герани существуют быстро распространяющиеся стрессовые сигналы, с помощью которых неповреждающие и повреждающие локальные раздражения вызывают быстрое и обратимое изменение холодоустойчивости участков растения, расположенных за пределами зоны действия раздражителя. Такие стрессовые сигналы имеют электрическую природу и представлены ПД и ВП, которые возникают в зоне раздражения, распространяются по стеблю и проходят в листовую пластинку. При отсутствии распространяющихся электрических сигналов изменения холодоустойчивости не наблюдаются.

2. Электрические сигналы вызывают увеличение содержания АТФ во флоэмном эксудате, которое играет одну из основных ролей в формировании повышения устойчивости растений к действию стресс-факторов. Установлено, что при возрастании концентрации АТФ происходит двухфазное изменение холодоустойчивости растительных организмов (увеличение, затем уменьшение ниже контрольного уровня). АДФ в отличие от АТФ не меняет устойчивость исследованных объектов. Обнаруженное влияние АТФ на холодоустойчивость связано скорее с энергетическими, нежели с сигнальными механизмами. Для интерпретации полученных результатов предложена математическая модель адаптационного процесса, объясняющая действие АТФ на устойчивость через увеличение средних скоростей и уровня флуктуаций протекающих в живой системе метаболических процессов.

3. Увеличение концентрации АТФ во флоэмном эксудате является результатом усиления ее выхода из листовой пластинки, которое в свою очередь связано с вызванными электрическими сигналами изменениями ФСА и, по-видимому, обусловлено возрастанием содержания АТФ в клетках листа. Показано, что изменения ФСА включают в себя до трех этапов. Конкретное сочетание развившихся этапов при этом зависит от типа электрического сигнала и вида растения. В случае отсутствия генерации распространяющихся электрических сигналов ответ ФСА не развивается. Предложена математическая модель кривых затухания ЗФ, на основе которой проведен анализ возможных механизмов формирования различных этапов изменений ФСА.

4. Установлено, что важную роль в реализации влияния электрических сигналов на ФСА и содержание АТФ играет вход Ca^{2+} , так как обработка растений хелатором Ca^{2+} (ЭГТА) подавляет возрастание выхода АТФ, а действие локальных раздражителей увеличивает поглощение ^{45}Ca черешками семядольных листьев.

5. Предложен возможный механизм формирования вызванного действием локальных раздражителей дистанционного повышения холодоустойчивости растений, который учитывает участие электрических сигналов, входа Ca^{2+} , изменений ФСА и увеличения концентрации АТФ в развитии ответа.

Список публикаций по теме диссертации

1. **Сухов В.С.** Влияние распространяющихся биоэлектрических реакций на замедленную флуоресценцию *Cucurbita pepo* L. // VIII Нижегородская сессия молодых ученых (естественнонаучные дисциплины): Тез. докл. Н. Новгород, 2003. С. 192-194.
2. **Сухов В.С.**, Опритов В.А., Воденеев В.А., Орлова О.В., Абрамова Н.Н., Пятыгин С.С. Влияние распространяющихся биоэлектрических реакций на замедленную флуоресценцию и поглощение ионов кальция в семядольных листьях и черенках проростков *Cucurbita pepo* L. // Рецепция и внутриклеточная сигнализация: Матер. межд. конф. Пущино, 2003. С. 302-305.
3. **Сухов В.С.**, Опритов В.А., Орлова О.В., Абрамова Н.Н., Воденеев В.А., Пятыгин С.С. Влияние потенциалов действия на замедленную флуоресценцию и содержание АТФ в листьях проростков тыквы // Регуляция роста, развития и продуктивности растений: Матер. III Межд. научн. конф. Минск, 2003. С.237-238.
4. **Сухов В.С.** Влияние потенциала действия и переменного потенциала на содержание АТФ в семядольном листе проростков тыквы // Биология – наука XXI века: Тез. докл. 8-й межд. школа-конф. молодых ученых. Пущино, 2004. С. 95.
5. **Сухов В.С.** Анализ кинетики влияния распространяющихся биоэлектрических реакций на замедленную флуоресценцию семядолей проростков тыквы // Современные проблемы математики и естествознания: Матер. 8-й Всероссийск. научн.-техн. конф. Нижний Новгород, 2004. С. 18-19.
6. **Сухов В.С.** Изучение способности переменного потенциала к индукции преадаптации у проростков тыквы // Исследования человека и объектов живой природы: Матер. 1-й Всероссийск. научн. конф. Нижний Новгород, 2004. С. 10.
7. **Сухов В.С.**, Воденеев В.А., Орлова О.В., Абрамова Н.Н., Опритов В.А., Пятыгин С.С. Влияние распространяющихся биоэлектрических реакций на содержание АТФ в семядольных листьях проростков тыквы // III Съезд биофизиков России: Тез. докл. Т. 2. Воронеж, 2004. С.464-465.
8. Мысягин С.А., Воденеев В.А., Лобов С.А., **Сухов В.С.**, Ретивин В.Г., Пятыгин С.С., Опритов В.А. Холодоиндуцированные потенциалы действия и их функциональная роль у высших растений // Проблемы физиологии растений Севера: Тез. докл. Межд. научн. конф. Петрозаводск, 2004. С.132
9. **Сухов В.С.** Особенности влияния распространяющихся биоэлектрических реакций на замедленную флуоресценцию листьев герани // IX Нижегородская сессия молодых ученых (естественнонаучные дисциплины): Тез. докл. Н. Новгород, 2004. С. 234-235
10. **Сухов В.С.** Вызванное распространяющимися биоэлектрическими реакциями повышение холодоустойчивости проростков тыквы // Актуальные проблемы сохранения устойчивости живых систем: Матер. VIII Межд. научн. экологич. конф. Белгород, 2004. С. 214-215.
11. **Сухов В.С.**, Пятыгин С.С. Изменения состояния фотосинтетического аппарата проростков тыквы, вызванные распространяющимися электрическими

сигналами // Преобразование энергии света при фотосинтезе: Тез. докл XVIII Пущинских чтений по фотосинтезу и Всероссийск. конф. М., 2005. С. 53-55.

12. **Сухов В. С.**, **Воденев В. А.**, **Орлова О.В.** Влияние распространяющихся биоэлектрических реакций на световую стадию фотосинтеза и содержание АТФ в семядольных листьях *Cucurbita pepo L.* // Вест. Нижегородск. ун-та. Сер. Биология. 2005. Вып. 2 (10). С. 218 – 224.