

УДК 577.37

ИЗМЕНЕНИЕ ЭЛЕКТРИЧЕСКОГО СОПРОТИВЛЕНИЯ ПЛАЗМАЛЕММЫ КЛЕТОК ВЫСШЕГО РАСТЕНИЯ ПРИ ГЕНЕРАЦИИ ВАРИАБЕЛЬНОГО ПОТЕНЦИАЛА

© 2013 г. Л.А. Катичева¹, Л.М. Сурова¹, О.Н. Шерстнева¹, А.В. Бушуева¹,
Е.В. Глинская², В.А. Воденев¹

¹Нижегородский госуниверситет им. Н.И. Лобачевского

²Саратовский госуниверситет им. Н.Г. Чернышевского

kbf@bio.unn.ru

Поступила в редакцию 01.02.2013

Определено сопротивление мембраны в покое и при развитии электрической реакции высшего растения на повреждение. Изменение сопротивления на мембране может быть использовано для оценки активности трансмембранных потоков в рамках тех или иных процессов. Подобраны условия для измерения сопротивления у клеток 2–3 слоев интактного растения *Cucurbita pepo* L. и произведена регистрация электрической реакции на ожог при параллельной оценке изменения сопротивления мембраны. Показано снижение мембранного сопротивления при генерации переменного потенциала, что может свидетельствовать об участии в данном процессе ионных каналов и пассивных потоков ионов через них.

Ключевые слова: переменный потенциал, высшие растения, микроэлектродная методика регистрации потенциала, сопротивление мембраны.

Введение

Присущие клеткам высших растений электрические свойства вызывают интерес исследователей не первое столетие, однако многие особенности «растительного электричества» по сей день остаются малоизученными [1–4]. В частности, открытым остается вопрос о механизме генерации электрического сигнала в ответ на повреждающее воздействие – переменного потенциала (ВП). ВП представляет собой переходную деполяризацию мембраны клеток растения, формирование которой, согласно существующим представлениям, связано с временной инактивацией H^+ -АТФазы [5]. Однако имеются предположения об участии в генерации ВП и пассивных потоков ионов, что, в свою очередь, требует дальнейших исследований [6, 7]. В ряде работ показана возможность изучения изменений активности ионных каналов клеток растения путем регистрации изменений сопротивления на мембране, которое снижается в случае открытия каналов и увеличивается при их инактивации или переходе в закрытое состояние [8–10]. Таким образом, оценка изменений сопротивления плазматической мембраны клеток высшего растения может стать одним из возможных способов изучения ионной природы ВП, в частности анализа участия в процессе его генерации пассивных потоков ионов. Цель данной работы – регистрация изменения мембран-

ного сопротивления у клеток интактного проростка высшего растения при генерации ВП.

Экспериментальная часть

Исследования проводили на проростках тыквы (*Cucurbita pepo* L.) возраста 15–20 дней. Проростки выращивали в климатической камере KBW-240, Binder, 16-часовой световой период, температура 23°C. В качестве субстрата использовали керамзит; питательным раствором служила 50%-ная среда Хогланда–Арнона [7].

Регистрация электрической активности производилась с помощью микроэлектродной техники (рис.1). Установка для регистрации электрического потенциала и сопротивления плазматической мембраны клеток растения включала микроскоп *Olympus* VX51 с автоматическими микроманипуляторами *Luigs and Neumann*, усилитель *Multiclamp* 700B (*Axon Inst.*) и ПК. Растение располагали на предметном столике микроскопа, при этом участок стебля проростка закрепляли в кювете со стандартным раствором, содержащим 0.1 мМ NaCl, 0.1 мМ KCl, 0.5 мМ CaCl₂. Электрод сравнения помещали в кювету, измерительный электрод с диаметром кончика 0.5 мкм, заполненный 0.1 М KCl, вводили в паренхимную клетку стебля тыквы, расположенную на глубине 30–40 мкм от поверхности, что соответствует клеткам второго или третьего слоя (рис. 2). Индуцирующее ВП повреждаю-

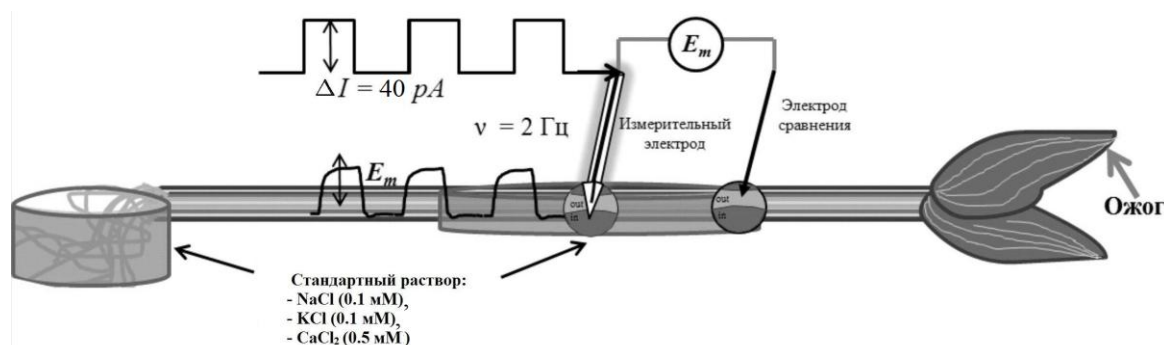


Рис. 1. Схема эксперимента по измерению электрической активности у проростков тыквы *Cucurbita pepo* L. (описание в тексте)



Рис. 2. Фотография клетки проростка тыквы с подведенным к ней измерительным электродом. Глубина от поверхности проростка равна 30 мкм

щее раздражение в виде ожога открытым пламенем в течение 2 с наносили на кончик семядольного листа. Для анализа изменения сопротивления клеток проростков тыквы при генерации ВП через измерительный электрод на мембрану подавался переменный ток частотой 2 Гц и амплитудой 40 пА. Регистрация соответствующих изменений трансмембранной разности электрического потенциала, генерируемых при прохождении тока заданной амплитуды, позволила оценить величину сопротивления мембраны клеток проростка путем применения закона Ома для участка цепи. Принципиальная схема эксперимента представлена на рис. 1.

Результаты и их обсуждение

Ожог семядольного листа индуцировал распространяющуюся электрическую реакцию, которая представляла собой переходную деполяризацию мембраны с амплитудой 60–70 мВ и длительностью порядка минут. Параметры зарегистрированных электрических ответов позволяют классифицировать их как ВП [11].

Перед измерением сопротивления во время генерации ВП были подобраны параметры переменного тока, проведение которого через мембрану не будет вызывать изменений ее электрических характеристик. На рис. 3а представлены изменения напряжения на мембране при проведении через нее импульсов тока подобранных амплитуды и длительности (40 пА, 2 Гц) и соответствующие изменения сопротивления. Как видно из рисунка, в отсутствие действия повре-

ждающих раздражителей амплитуда вызванных импульсами тока скачков напряжения на мембране остается неизменной, как и величина мембранного сопротивления. Таким образом, импульсы тока с выбранными параметрами не влияют на электрические характеристики мембраны, и, следовательно, их изменения, в частности изменения сопротивления, будут отражать активацию транспортных систем при его генерации ВП.

На рис. 3б представлены типичная кривая мембранного потенциала и соответствующие изменения сопротивления при генерации ВП. Согласно полученным результатам, при генерации ВП амплитуда ответов напряжения на мембране на пропускаемый переменный ток снижается, что соответственно указывает на снижение величины сопротивления. Величина сопротивления клетки в среднем уменьшалась на 40%, при этом стоит отметить, что снижение сопротивления по времени хорошо соответствовало развитию фазы деполяризации ВП. Наблюдаемые изменения могут быть объяснены активацией ионных каналов при генерации ВП, что, в свою очередь, ведет к формированию пассивных потоков ионов через мембрану и снижению сопротивления плазмалеммы.

В то же время в литературе имеются данные о неизменности уровня сопротивления мембраны при ее деполяризации, которая вызвана повреждающим раздражением [8]. При этом стоит отметить, что Stahlberg не исключает участия пассивных потоков ионов через мембрану при ВП, а указывает на вероятную компенсацию

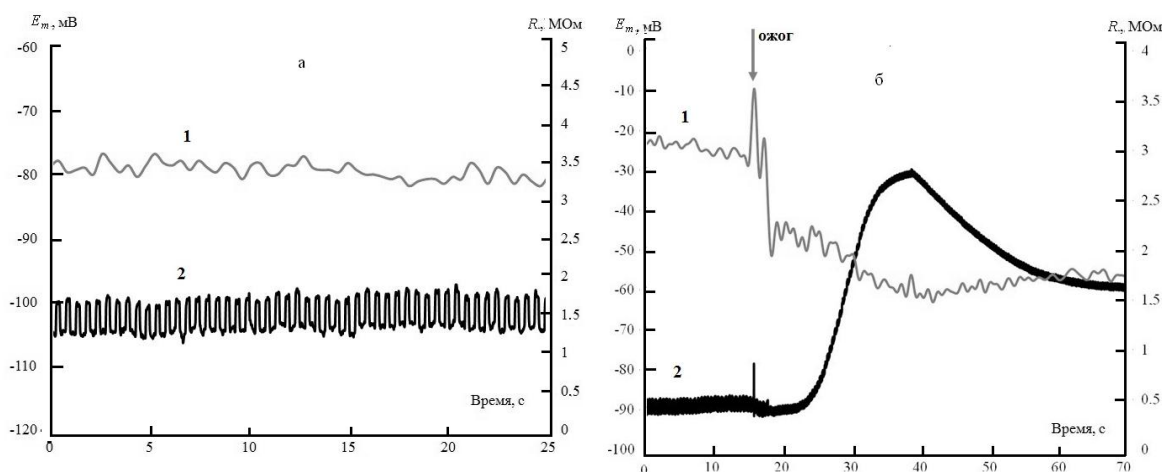


Рис. 3. Изменения сопротивления клетки проростка тыквы (1) и электрической активности мембраны (2) при параллельном проведении через нее импульсов тока (амплитуда 40 пА, частота 2 Гц): а – в отсутствие раздражения; б – при индукции ВП ожогом кончика семядольного листа. Стрелкой указан момент нанесения повреждения

вызываемых ими изменений сопротивления инактивацией H^+ -АТФазы.

Заключение

Подобраны оптимальные условия для изменения величины сопротивления на мембране интактных растений. Согласно полученным результатам, генерации электрической реакции на повреждение соответствует снижение сопротивления мембраны клетки. При этом подобное снижение связано, вероятно, с активацией ионных каналов на стадии деполяризации ВП. Особый интерес для дальнейших исследований в данном случае представляют потоки ионов Ca^{2+} и Cl^- , участие которых продемонстрировано для другого типа электрических сигналов высшего растения – потенциала действия [7]. Таким образом, результаты работы могут послужить основой для последующего анализа участия пассивных потоков ионов в генерации переменного потенциала, а методика регистрации изменений сопротивления у клеток интактных растений может быть применима и для других задач электрофизиологии растений.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (соглашения № 14.132.21.1317 и № 14.В37.21.2007).

Список литературы

- Burdon-Sanderson J. Note on the electrical phenomena which accompany irritation of the leaf of *Dionaea muscipula* // Proc. Royal Soc. 1873. V. 21. P. 495–496.
- Оприлов В.А., Пятюгин С.С., Ретивин В.Г. Биоэлектrogenез у высших растений. М.: Наука, 1991. 213 с.
- Krol E., Dziubinska H., Trebacz K. What do plants need action potential for? // In: Action Potential, Marc L. DuBois (ed.). New York: Nova Science Publishers. 2010. P. 1–26.
- Pavlovic A., Slovackova L., Pandolfi C., Mancuso S. On the mechanism underlying photosynthetic limitation upon trigger hair irritation in the carnivorous plant Venus flytrap (*Dionaea muscipula* Ellis // J. Exp. Bot. 2011. V. 62. P. 1991–2000.
- Julien J.L., Desbiez M.O., de Jaeger G., Frachisse J.M. Characteristics of the wave of depolarization induced by wounding in *Bidens pilosa* L. // J. Exp. Bot. 1991. V. 42. P. 131–137.
- Zimmermann M.R., Felle H.H. Dissection of heat-induced systemic signals: superiority of ion fluxes to voltage changes in substomatal cavities // *Planta*. 2009. V. 229. P. 539–547.
- Воденев В.А., Акинчиц Е.К., Орлова Л.А., Сухов В.С. Анализ роли ионов Ca^{2+} , H^+ , Cl^- в генерации переменного потенциала у высшего растения *Cucurbita pepo* L. // Физиология растений. 2011. Т. 6 (58). С. 826–833.
- Stahlberg R., Cosgrove D.J. The Propagation of slow wave potentials in pea epicotyls // *Plant Physiol*. 1997. V. 113. P. 209–217.
- Shimmen T. Electrophysiology of mechanosensing and wounding response // In: Plant Electrophysiology – theory and methods. A.G. Volkov (Ed.). Berlin: Springer, 2006. P. 319–339.
- Булычев А.А., Крупенина Н.А. Инактивация проводимости плазмалеммы в щелочных зонах *Chara corallina* после генерации потенциала действия // Биологические мембраны. 2010. Т. 27 (2). С. 209–217.
- Roblin G., Bonnemain J-L. Propagation in *Vicia faba* stem of potential variation induced by wounding // *Plant Cell Physiol*. 1985. V. 26. P. 1273–1283.

ELECTRIC RESISTANCE CHANGES IN HIGHER PLANT CELL PLASMALEMMA AT VARIATION POTENTIAL GENERATION

*L.A. Katicheva, L.M. Surova, O.N. Sherstneva, A.V. Bushueva, E.V. Glinskaya,
V.A. Vodeneev*

The membrane resistance values at rest and during the electrical response to injury have been measured. According to the available literature data, the changes in membrane resistance can be used to estimate the activity of transmembrane ion flows. The electrical resistance changes of *Cucurbita pepo* L. cell plasmalemma at a depth of 2-3 layers from the stem surface have been measured during the electrical response to burn. A drop in membrane resistance has been registered at variation potential generation that may testify to the existence of passive ion flows through the membrane.

Keywords: variation potential, higher plants, potential registration microelectrode technique, membrane resistance.