

УДК 631.524.85

ОПРЕДЕЛЕНИЕ УСТОЙЧИВОСТИ РАСТИТЕЛЬНЫХ ТКАНЕЙ К АБИОТИЧЕСКИМ СТРЕССАМ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КОНДУКТОМЕТРИЧЕСКОГО МЕТОДА

Н.Н. Гришенкова, А.С. Лукаткин

*Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева
Россия, 430000, Саранск, Большевикская, 68*

Поступила в редакцию 29.10.04 г.

Определение устойчивости растительных тканей к абиотическим стрессам с использованием кондуктометрического метода. – Гришенкова Н.Н., Лукаткин А.С. – Проанализированы возможность использования кондуктометрического метода для оценки устойчивости растительных тканей к абиотическим стрессам и параметры измерения, позволяющие адекватно оценивать реакцию растения на неблагоприятные воздействия. Показана зависимость величины выхода электролитов из высечек листьев кукурузы (*Zea mays* Linnaeus, 1753) от физиологических особенностей (возраст растения, возраст и номер листа) и параметров эксперимента (размер высечек листьев, температура выращивания и инкубации). Установлены оптимальные условия опыта, позволяющие эффективно определить реакцию клеток и тканей на стрессовые воздействия по изменениям проницаемости клеточных мембран: время инкубации – 4 часа, размер высечек листьев – 1 см, возраст модельного растения – 11 дней. Разработанная методика апробирована при оценке воздействия на растения кукурузы пониженных положительных температур и тяжелых металлов.

Ключевые слова: *Zea mays*, абиотические стрессоры, тяжелые металлы, проницаемость клеточных мембран, длительность инкубации, возраст листа.

A conductometric technique to estimate the plant tissue stability to abiotic stresses. – Grishenkova N.N., Lukatkin A.S. – The possibility to employ a conductometric technique to estimate the plant tissue stability to abiotic stresses as well as some prospective parameters to be measured to adequately evaluate a plant's response to unfavourable impacts are analyzed. The electrolyte output from maize (*Zea mays* Linnaeus, 1753) leaf cuts was found to correlate with some physiological features (plant age, leaf age and number) and experimental parameters (leaf cut size, cultivation and incubation temperature). Optimal experimental conditions to effectively evaluate cell and tissue responses to stress impacts in terms of cell membrane permeability changes were established, namely: an incubation duration 4 h, a leaf cut size 1 cm, a model plant age 11 days. The technique developed was evaluated at studying the effect of lowered positive temperatures and heavy metals on maize.

Key words: *Zea mays*, abiotic stressor, heavy metal, cell membrane permeability, incubation duration, leaf age.

Многие абиотические факторы среды, к которым растение эволюционно не приспособлено, могут оказывать стрессовое воздействие на организм (Levitt, 1980). При этом растения испытывают явные нарушения физиологических функций, что проявляется в изменении метаболизма и внешних повреждениях (Коровин, 1984). Для того чтобы оценить степень повреждения, используют разнообразные визуальные, физиологические, биохимические показатели, которые, однако, развиваются в течение долгого периода послестрессового воздействия и не вполне

адекватно отражают реакцию растения на стрессовое воздействие. Одним из наиболее эффективных и быстрых методов является оценка степени повреждения клеточных мембран кондуктометрическим методом. При действии неблагоприятных факторов повышается утечка электролитов из тканей, свидетельствуя о нарушении избирательной проницаемости клеточных мембран (Приходько, 1977). Это может быть связано с нарушением структуры мембран или состояния их липидного комплекса (Родионов, 1983; Bertin et al., 1996).

Подобные эффекты были выявлены при изучении действия на растения неблагоприятных температур – низких (Shen, Yan, 2002), пониженных положительных (Зауралов, Лукаткин, 1985; Markowski et al., 1990), высоких (Демидчик и др., 2001; Ma Yong-Zhan et al., 1994), а также других воздействий.

Однако разные исследователи применяют неодинаковые методические подходы к оценке этого параметра, в связи с чем возникают затруднения с интерпретацией полученных результатов. Целью данной работы был подбор таких условий измерения выхода электролитов, которые позволят адекватно определить степень повреждения клеток теплолюбивых растений абиотическими стрессорами.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объектом исследования были растения кукурузы (*Zea mays*) сорта Днепропетровский 247 и гибрида Краснодарский 312 МВ. Молодые растения выращивали в условиях почвенной или водной культуры до возраста 7 – 11 суток при температурах от 13 до 35°C. В основных опытах семена кукурузы высаживали в сосуды с почвой емкостью 3 кг по 20 семян / сосуд на глубину 2 – 3 см, растения выращивали при температуре 25°C, влажности почвы 60 – 80% от полной влагоемкости и круглосуточном освещении люминесцентными лампами ЛБ-40 (освещенность 3000 лк).

В опытах по выяснению влияния температуры выращивания на величину выхода электролитов из высечек листьев 11-дневные растения кукурузы помещали на 1 или 3 суток в холодильную камеру «Черномор» или термостат ТС-80М в темноту при температурах от 10°C до 30°C.

В опытах по изучению действия тяжелых металлов семена кукурузы проращивали в течение 7 суток в растворах ТМ ($\text{NiSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ и $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) в концентрациях от 10 мкМ до 10 мМ. Затем проростки пересаживали в модифицированную среду Кнопа с добавлением ТМ и выращивали еще 2 недели методом рулонной культуры.

Сразу по окончании стрессовых воздействий определяли проницаемость клеточных мембран по выходу электролитов из высечек листьев в дистиллированную воду с использованием кондуктометра ОК-102 («Radelkis», Венгрия) с платиновым электродом (измерения проводили при частоте 3 кГц). Для этого брали навеску высечек листьев растений каждого варианта, тщательно промывали дистиллированной водой для удаления клеточного сока со срезов, обсушивали фильтровальной бумагой, затем делили на несколько частей и заливали дистиллированной водой. После экстракции в течение определенного времени определяли электропроводность раствора. Затем стаканчики с растительным материалом доводили до кипения, остужали до комнатной температуры, после чего доводили объем до исходной величины и определяли полный выход электролитов по электропроводности.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ УСТОЙЧИВОСТИ РАСТИТЕЛЬНЫХ ТКАНЕЙ

сти той же вытяжки после разрушения мембраны кипячением. Результирующий выход электролитов рассчитывали в процентах от полного выхода.

В ходе методических опытов определяли влияние ряда параметров на величину выхода электролитов из клеток – соотношения навески и воды, длительности и температуры экстракции, возраста растения и листа, порядкового номера листа, размера высечек и др.

Каждый опыт повторяли 2 – 3 раза с последующим расчетом средних значений и ошибок среднего квадратичного отклонения (Лакин, 1980). Различия между вариантами опыта определяли по *t*-критерию Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Кондуктометрический метод предназначен для определения электропроводности жидкостей, подвижности ионов, констант диссоциации, коэффициента растворимости, также он может использоваться для контроля промышленных процессов – измерения содержания солей в питьевой воде, степени загрязнения охлаждающих и промывных вод и т.д. Мы использовали этот метод для оценки стрессового воздействия на растительные ткани. Для этого необходимо решить некоторые методические вопросы.

Соотношение количества испытуемого материала и воды оказывает влияние на результаты определения экзосмоса электролитов из листовой ткани в дистиллированную воду (Коваль, 1974). Изменение концентрации электролитов в растворе может привести к существенным нарушениям измеряемых показателей. Поэтому следует придерживаться постоянного соотношения веса испытуемого образца и воды. В наших опытах мы брали 3 г высечек листьев растений каждого варианта, которые затем делили на 5 – 6 параллельных усредненных навесок листовой ткани. Каждую навеску заливали 100 мл дистиллированной воды. Как показали предварительные опыты, данное соотношение ткани/воды (500 мг/100 мл) не является обязательным, но вполне удобно для выполнения задач. Во-первых, достаточно большой объем воды позволяет не думать о концентрационных ограничениях подвижности ионов; во-вторых, увеличение объема листовой ткани потребует существенно более высоких затрат при выращивании растительного материала.

Выход электролитов из листовой ткани в дистиллированную воду определяли по изменению электропроводности вытяжки после экспозиции определенной длительности. В наших опытах изучалась кинетика выхода электролитов из листовой ткани кукурузы в интервале времени от 5 минут до 24 часов (рис. 1). При ее выражении в системе координат $dc/dt - t$ было обнаруже-

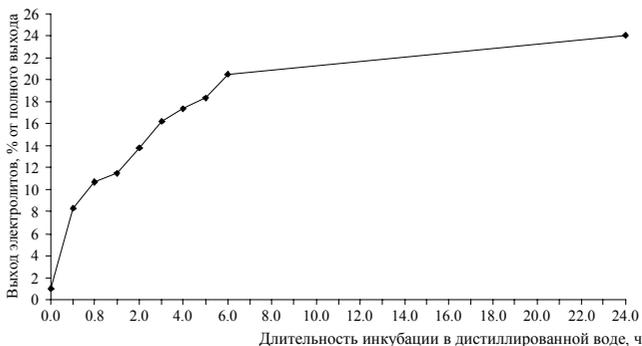


Рис. 1. Кинетика выхода электролитов из листьев кукурузы

но, что экзоосмос имеет форму гиперболы. При выражении скорости выхода электролитов в логарифмическом масштабе хорошо заметны два перелома, которые указывают на резкое изменение скорости экзоосмоса. Очевидно, что первый перелом (около 40 мин с начала экстракции) указывает на включение в процесс выхода ионов плазмалеммы; второй перелом (около 5 – 6 ч с начала экспозиции) – на участие тонопласта и других внутриклеточных мембран. Поэтому в дальнейшем экстракцию проводили при комнатной температуре в течение 4 часов. Выбранный для проведения опытов временной интервал (4 ч) представляется наиболее удобным, так как показывает выход электролитов из свободного пространства и цитоплазмы (через плазмалемму), косвенно указывая на состояние плазмалеммы (Зауралов, Лукаткин, 1985).

Расчет выхода электролитов. После экстракции в течение определенного времени определяли выход электролитов в каждом образце. Затем мембраны в растительном материале разрушали посредством кипячения, объем доводили дистиллированной водой до постоянной величины (100 мл) и определяли «полный выход электролитов» по электропроводности той же вытяжки. Результирующий выход электролитов рассчитывали в процентах от полного выхода. При этом из полученных значений вычитали электропроводность дистиллированной воды. Это необходимо для более точного определения полного выхода электролитов из листовой ткани, так как при низкой проницаемости мембран электропроводность экстракта из живого образца сравнима с электропроводностью воды по порядку величин. В табл. 1 приведена удобная форма записи результатов в журнале наблюдений.

Таблица 1

Пример записи результатов, полученных при измерении выхода электролитов из высечек растительной ткани

№ повторности (стаканчика)	Выход электролитов до кипячения, мкСм	Чистый выход, мкСм*	Выход электролитов после кипячения, мкСм	Чистый выход, мкСм*	% от полного выхода электролитов
1	9	7	145	143	4.9
2	11	9	136	134	6.7
3	11	9	130	128	7.0
4	10	8	131	129	6.2
5	12	10	147	145	6.9
6	12	10	149	147	6.8
Среднее	-	-	-	-	6.4±0.3

* Электропроводность дистиллированной воды, равная 2 мкСм, вычиталась из данных по выходу электролитов.

Расчет выхода электролитов удобно проводить по формуле:

$$L = (L_1 - L_w) / (L_2 - L_w) \times 100,$$

где L – полный выход электролитов, %; L_1 и L_2 – электропроводность после соответственно настаивания навески и кипячения, мкСм; L_w – электропроводность дистиллированной воды, мкСм.

Зависимость выхода электролитов от размера высечек листьев кукурузы. Роль измельчения листьев нельзя не учитывать, так как с увеличением числа поранен-

ОПРЕДЕЛЕНИЕ УСТОЙЧИВОСТИ РАСТИТЕЛЬНЫХ ТКАНЕЙ

ных клеток не только возрастает переход содержимого последних в воду, но имеет место длительное повышение проницаемости, которое связано с раздражением соседних с поврежденными клеток (Коваль, 1974).

Для выяснения зависимости выхода электролитов от размера высечек брали первый и второй листья у 11-дневных растений кукурузы, затем их резали на высечки размером 0.5, 1 и 2 см, сравнивали выход электролитов (табл. 2). Обнаружено, что уменьшение размеров высечек листа кукурузы в 4 раза приводило к увеличению выхода электролитов в 5.3 раза. На основании этих результатов во всех последующих экспериментах использовали высечки листьев размером 1 см.

Таблица 2

Выход электролитов из клеток листьев кукурузы в зависимости от размеров высечек

Размер высечек, см	№ повторности	Выход электролитов		
		После 4 ч инкубации, мкСм	Полный выход, мкСм	% выхода от полного
0.5	1	40	169	23.7
	2	27	116	23.3
	3	44	159	27.7
	4	23	97	23.7
	5	22	100	22.0
	6	30	124	24.2
	Среднее	-	-	24.1±0.8
1	1	9	110	8.2
	2	10	142	7.0
	3	14	164	8.5
	4	14	127	11.0
	5	13	136	9.6
	6	16	159	10.1
	Среднее	-	-	9.1±0.6
2	1	3	70	4.3
	2	4	82	4.9
	3	3	77	3.9
	4	4	91	4.4
	5	4	95	4.2
	6	5	98	5.1
	Среднее	-	-	4.5±0.2

Влияние температуры инкубации на проницаемость клеточных мембран. Выход ионов из клеток зависит от температуры инкубации. Теоретически электропроводность электролитов связана с температурой следующей зависимостью:

$$\gamma_1 = \gamma_0 [1 + (t - t_0) \beta],$$

где γ_1 – электропроводность при данной температуре; γ_0 и t_0 – соответственно электропроводность и температура, принятые за стандарт; β – температурный коэффициент электропроводности (для солей $\beta = 0.024$, для оснований – 0.019, для кислот – 0.016). Учитывая, что электролиты экстракта представлены главным образом ионами, нетрудно заметить, что отклонение температуры раствора на 4°C приведет к изменению электропроводности на 10%. В связи с этим введение поправки на температуру эксудата представляется абсолютно необходимым (Коваль, 1974).

Наши измерения показали (табл. 3), что изменение температуры во время измерения на 9°C привело к смещению электропроводности на 18.1%, а теоретические расчеты по приведенной выше формуле дали изменение электропроводности на 16%, т.е. теоретические и экспериментальные значения зависимости выхода электролитов от температуры оказались близкими, но не полностью. Это может быть связано с тем, что при значительном варьировании температуры происходят не только физические смещения диффузионных свойств жидкостей, но также изменяются свойства мембран, в том числе транспортные. Поэтому при определении электропроводности раствора необходимо учитывать и корректировать температуру измерения, но лучше измерения проводить при одинаковой температуре.

Таблица 3

Влияние температуры измерения на выход электролитов из высечек листьев кукурузы

Температура измерения, °С	Выход электролитов		
	После 4 ч инкубации, мкСм	Полный выход, мкСм	% выхода от полного
13	26	147	17.9
	25	150	16.7
	16	106	15.1
	35	198	17.7
	16	106	15.1
	Среднее	-	16.5±0.6
22	32	163	19.6
	31	147	21.1
	27	136	19.9
	36	177	20.3
	30	170	17.7
	32	177	18.1
Среднее	-	19.5±0.5	

Влияние физиологических особенностей растения на проницаемость клеточных мембран. Проницаемость клеточных мембран определяли у растений разного

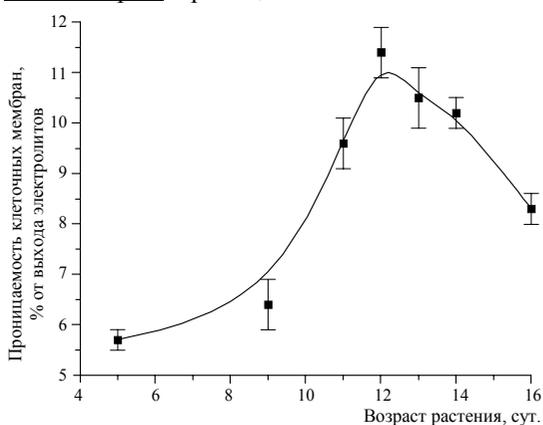


Рис. 2. Зависимость проницаемости клеточных мембран листьев кукурузы от возраста растения

возраста. Измерения свидетельствуют о том, что проницаемость клеточных мембран была самой низкой у молодых растений (возраст 5 и 9 суток), более высокой – у 13 – 14-дневных растений и максимальной у 12-дневных растений кукурузы (рис. 2.). Видно, что выход электролитов постепенно увеличивался, начиная от возраста растений 5 суток, до 12 суток, затем постепенно уменьшался. Это связано с возрастными изменениями у растений: изменениями состояния клеточных мембран, содержания воды, ио-

ОПРЕДЕЛЕНИЕ УСТОЙЧИВОСТИ РАСТИТЕЛЬНЫХ ТКАНЕЙ

нов, органических веществ в клетке, анатомическими особенностями и т.д. (Шабельская, 1987), вследствие чего и наблюдали изменения выхода электролитов.

Выход электролитов стабильно повышался с увеличением возраста листа (рис. 3). В то же время необходимо отметить, что величина проницаемости клеточных мембран зависит также от порядкового номера листа. Она была минимальной у второго листа, максимальной у третьего листа, тогда как первый лист занимал промежуточное положение. Подобные изменения отражают состояние мембран листьев; очевидно, что у самых молодых и у стареющих листьев мембраны более проницаемы для ионов по сравнению с молодыми, вполне развитыми листьями (Penazio et al., 1982).

Влияние температуры выращивания на выход электролитов из клеток листьев кукурузы. Интенсивность выхода электролитов зависит также от предшествующих измерению условий выращивания растений. Известно, что при изменении температуры выращивания в сильной степени модифицируется состав и свойства липидов, входящих в состав мембран. Например, у теплолюбивых растений, помещенных в условия пониженных температур, наблюдается увеличение проницаемости клеточных мембран (Зауралов, Лукаткин, 1985). В наших опытах выявлено, что при изменении температуры выращивания от 14 до 35°C наблюдали варьирование степени выхода электролитов (данные не приведены). Поэтому для применения кондуктометрического метода в целях определения состояния растительных тканей необходимо выращивать растения при одинаковых и относительно постоянных температурах.

Определение степени повреждения растений стрессовыми факторами. Степень повреждения клеток в различных вариантах оценивали по величине «коэффициента повреждаемости» (КП), рассчитываемого по формуле:

$$\text{КП} = \frac{L_D - L_O}{100 - L_O} \times 100\%,$$

где L_D – выход электролитов из ткани, подвергнутой стрессу, в процентах от полного выхода электролитов; L_O – выход электролитов из ткани контрольных растений, в процентах от полного выхода электролитов (Зауралов, Лукаткин, 1985).

Величина L_D является относительной мерой выхода электролитов, вызванного действием стрессора, и может быть принята пропорциональной количеству (или интенсивности) «повреждений» в клеточных мембранах. Включение контроля в расчет отражает выход электролитов вследствие только лишь разрезания тканей и

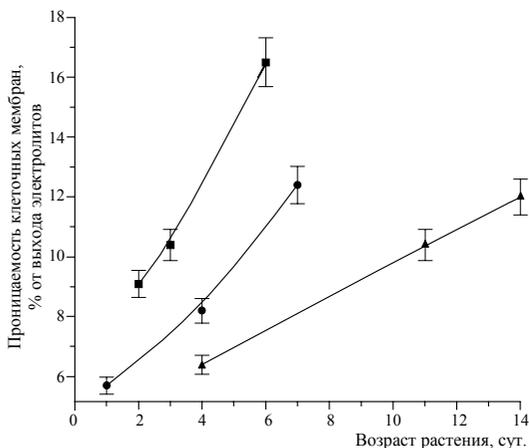


Рис. 3. Зависимость проницаемости клеточных мембран листьев кукурузы от номера и возраста листа

4-часового выдерживания в воде. Следовательно, рассчитанные значения повреждений (КП) отражают выход электролитов, вызванный только действием стрессового фактора на растительные клетки.

Проверка этого расчетного показателя была проведена при использовании двух стрессовых воздействий – пониженных положительных температур (2°C) и тяжелых металлов. Было показано, что при охлаждении растений кукурузы величина КП возрастает пропорционально длительности охлаждения и снижению температуры (данные не приведены).

При изучении влияния тяжелых металлов на проницаемость клеточных мембран выявлено, что различные ТМ вызывали неоднозначные изменения проницаемости мембран. Так, увеличение концентрации ионов Ni^{2+} с 10 до 500 мкМ повышало экзоосмос электролитов в дистиллированную воду из высечек листьев кукурузы с 2.0 до 6.0%, тогда как ионы Cu^{2+} и Pb^{2+} лишь незначительно изменяли величину выхода ионов. В диапазоне концентраций Zn^{2+} от 10 мкМ до 10 мМ наблюдали непостоянное изменение выхода электролитов без каких-либо определенных закономерностей; минимальным он был при концентрации 10 мМ, а максимальным – при концентрации 0.5 мМ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проницаемость клеточных мембран является ранним показателем изменения физиологических функций растительного организма, поэтому ее изменение может служить критерием оценки устойчивости тканей растений к абиотическим стрессорам. Наши исследования показали, что величина проницаемости клеточных мембран теплолюбивых растений зависит от различных факторов: возраста растения и листа, порядкового номера листа (минимальная – у второго, максимальная – у третьего), абиотических условий выращивания – температурного режима (снижение температуры выращивания с 35 до 14°C вызывало уменьшение величины КП клеток листьев кукурузы), минерального питания (выращивание растений кукурузы на растворах тяжелых металлов вызывало увеличение выхода электролитов).

Интенсивность выхода электролитов в дистиллированную воду из высечек листьев кукурузы зависит также и от условий измерения, в которых проводится опыт. Поэтому нами предлагаются следующие условия определения выхода электролитов, соблюдение которых позволит повысить достоверность оценки устойчивости тканей растений к абиотическим факторам:

- для опыта использовать высечки листа определенного размера – 1 см;
- использовать временной промежуток инкубации 4 часа;
- фиксировать и учитывать температуру, при которой происходило измерение выхода электролитов;
- учитывать возраст растения и модельного листа;
- учитывать условия выращивания растений, предшествующие измерениям.

Работа выполнена при финансовой поддержке Конкурсного центра фундаментального естествознания Министерства образования РФ (проект Е02-6.0-234), Программы «Развитие научного потенциала высшей школы» Федерального агентства по образованию и программы «Университеты России» (проект УР.07.01.112).

ОПРЕДЕЛЕНИЕ УСТОЙЧИВОСТИ РАСТИТЕЛЬНЫХ ТКАНЕЙ

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Демидчик В.В., Найдун С.Н., Яблонская Л.И., Соколик А.И., Юрин В.М. Изменение свойств ионных каналов плазмалеммы клеток *Nitella flexilis* при длительной гипертермии // Физиология растений. 2001. Т. 48, №3. С. 349 – 355.

Зауралов О.А., Лукаткин А.С. Кинетика экзоосмоса электролитов у теплолюбивых растений при действии пониженных температур // Физиология растений. 1985. Т. 35, вып. 2. С. 347 – 354.

Коваль С.Ф. Исследование свойств клеточных мембран и устойчивости растений по вымываемости электролитов // Изв. Сиб. отд-ния АН СССР. 1974. №15, вып. 3. С. 161 – 168.

Коровин А.И. Растения и экстремальные температуры. Л.: Гидрометеоздат, 1984. 272 с.

Лакин Г.Ф. Биометрия. М.: Высш. шк., 1980. 293 с.

Приходько Н.В. Изменение проницаемости клеточных мембран как общее звено механизмов неспецифической реакции растений на внешние воздействия // Физиология и биохимия культурных растений. 1977. Т. 9, вып. 3. С. 301 – 309.

Родионов В.С. Изменения в мембранных липидах растений при пониженных температурах // Липидный обмен древесных растений в условиях Севера. Петрозаводск: Изд-во Петрозавод. ун-та, 1983. С. 4 – 68.

Шабельская Э.Ф. Физиология растений. Минск: Вышейш. шк., 1987. 320 с.

Bertin P., Bouharmont J., Kinet J.M. Somaclonal variation and improvement in chilling tolerance in rice. Changes in chilling-induced electrolyte leakage // Plant Breeding. 1996. Vol. 115, №4. P. 268 – 272.

Ma Yong-Zhan, Zou Qi, Cheng Bing-Song. Kinetics of electrolyte leakage from wheat leaf tissues under heat stress // Plant Physiol.: Abstr. Pap. Annu. Meet. Amer. Soc. Plant Physiologists. 1994. P. 105.

Levitt J. Responses of plants to environmental stresses. Vol. 1. Chilling, freezing and high temperatures stresses. New York: Acad. Press, 1980. 426 p.

Markowski A., Augustyniak G., Janowiak F. Sensitivity of different species of field crops to chilling temperature. III. ATP content and electrolyte leakage from seedlings leaves // Acta physiologica plantarum. 1990. Vol. 12, №2. P. 167 – 173.

Pennazio S., D'agostino G., Sapetti C. Cation release from discs of tobacco leaves of different ages // Physiol. Veg. 1982. Vol. 20, №4. P. 577 – 583.

Shen H., Yan X. Membrane permeability in roots of *Crotalaria* seedlings as affected by low temperature and low phosphorus stress // J. Plant Nutr. 2002. Vol. 25, №5. P. 1033 – 1047.