



УДК 581.1.03+631.531.173

Моделювання внутрішньоклітинних механізмів виникнення біоелектричних потенціалів рослин під час комбінованої стимуляції

Д.В. Чернетченко, М.П. Моцний, Н.П. Боцьва, О.В. Єліна

Дніпропетровський національний університет імені Олеся Гончара, Дніпропетровськ, Україна

На листі кукурудзи проводили дослідження біоелектричних реакцій рослини за дії окремих стимуляторів, а також у разі їх комбінування. Як стимулятор обрано вплив холодової, теплової, фото- та електростимуляції. Для автоматизації дослідження біопотенціалів застосовано універсальний програмно-апаратний комплекс на базі ПК та камери з електродами. Запропоновано універсальну схему реєстрації біопотенціалів, яка дозволяє проводити експериментальні дослідження в умовах як окремого впливу на досліджуваний об'єкт стимулів, так і їх комбінацій. У ході дослідження зафіксовано біоелектричні потенціали листя кукурудзи у відповідь на термічні стимули. Проаналізовано динаміку вказаних потенціалів, оцінено потенціали стабілізації, а також відповідні значення порогу чутливості рослини до вказаних стимулів. На базі експериментальних даних визначено параметри еквівалентної моделі генерації електричних імпульсів у клітині у відповідь на подразники різної фізичної природи.

Ключові слова: реєстрація біоелектричних потенціалів; математична модель клітини; біопотенціали листя; стимуляція рослин; теплові та холодні стимули рослин

Models of intracellular mechanisms of plant bioelectrical potentials caused by combined stimulation

D.V. Chernetchenko, M.P. Motsnyj, N.P. Botsva, O.V. Elina

Oles Honchar Dnipropetrovsk National University, Dnipropetrovsk, Ukraine

This paper deals with bioelectrical potentials of the plants recorded during different types of stimuli and combined stimulus as well. All registrations were observed on the leaves of the corn. We used different stimuli, such as cold, heat, photo- and electrical stimulation, and certain combination of this stimuli. Hardware and software system for automated recording of bioelectrical potentials has been successfully used in this work. We proposed the universal pattern of bioelectrical potentials' recording which allowed to detect the response of the biological object to different stimuli and various combinations of these stimuli. This pattern can be used for the deeper understanding of biological mechanisms of electrical potentials' generation in cells and discovering of processes of accommodation of whole organisms to these stimuli. Integrated system of recording and biometrical processing was used for analysis of corn leaves electrical responses to the thermal stimuli. The dynamics of these potentials was studied, with the quantitative analysis of the potential level stabilization. We calculated the ratio of amplitude of response potentials to the first response amplitude. Mathematical models of the plant cell were used for studying of intracellular mechanisms of biopotentials generation. As a result of modeling, we revealed that electrical response of the cells was based on selective conductivity of cell membrane for H^+ and Ca^{2+} ions. Therefore, we showed the biophysical relation of plant potentials to underlying intracellular biophysical mechanisms during thermal and combined stimulation.

Keywords: bioelectrical potentials' recording; mathematical cell model; leaves' biopotentials; combined stimulation of plants; heat and cold stimuli

Вступ

У сучасних умовах для оцінки функціонального стану рослин, поряд з іншими, широко застосовуються біофізичні методи, одним з яких є метод аналізу біоелектричної активності, зокрема, біопотенціалів рослин, викликаних різними подразнювальними факторами. Найбільше поширення отримали методи, пов'язані з термостимуляцією, тому що стимули цієї природи найменш травматичні та адекватні для рослин. На практиці частіше зустрічаються методики з пониженням температури, які дозволяють використовувати великі перепади температур. Методи теплової стимуляції, а також процеси, що проходять у рослині при такій стимуляції, вивчені недостатньо. Варто зазначити, що майже немає праць, які б поєднували холодове та теплове стимулювання, що зумовило дані дослідження.

Актуальним є питання вирощування рослин у штучних контрольованих умовах. Оптимізація кліматичних і енергетичних характеристик середовища у такому процесі потребує безперервного прижиттєвого контролю показників життєдіяльності рослин, який ускладнюється необхідністю уникнення їх можливих пошкоджень. За таких умов стають актуальними методики електрофізіологічної діагностики стану та розвитку рослин (Motsnyj et al., 2004).

Будь-який, навіть найпримітивніший, організм може відповісти на різноманітні зміни навколишнього середовища певною дією, причому ця дія буде в тому або іншому відношенні корисною для організму, вона буде спрямована на підтримання його існування. У рослин виділяють декілька типів електричних сигналів – потенціал дії (ПД), варіабельний потенціал (ВП), перехідні зміни потенціалу, ритміки або потенціал спокою (ПС).

Електричне збудження та відповідь вищих рослин зазвичай пов'язані зі швидкими відповідями на зовнішній стимул (Davies, 2004). Останні дослідження з електрогенезу рослин показують, що існує дуже велике різноманіття форм електричних відповідей (Fromm et al., 2007), навіть на стандартні зовнішні подразники: механічні, фото- чи теплові стимули.

Слід зазначити, що рослини виростають у мінливих температурних умовах, тому здатність відповідати на зміну температури необхідна для пристосування організму до певних умов середовища. Одним із ранніх відгуків рослин на зміну температури є генерація електричних реакцій. Відповідна електрична реакція на швидке охолодження являє собою імпульс, а отже, аналіз біоелектричної активності може дати діагностично важливу інформацію щодо розвитку рослини в цілому, а також щодо конкретного впливу одного з факторів.

Нині достатньо описано електрогенез рослин: види їх електричної активності у відповідь на різні подразнення та роль клітинної мембрани у процесах генерації біоелектричних потенціалів (Davies, 1987, 2004). Але роль внутрішньоклітинних процесів, міра та механізм їх впливу на динаміку біоелектричних реакцій окремих клітин та системи в цілому розкриті недостатньо. Відповіді клітин рослини на різні подразники значно різняться, що створює деякі труднощі для розуміння механізмів, що лежать за цими потенціалами, але

відіграють дуже важливу роль, дозволяючи аналізувати та контролювати кожен із параметрів (світло, температура, електростимуляція) окремо.

Узагалі, теплові потенціали відповіді рослини зумовлені сильним локальним зменшенням концентрації CO_2 , який активно поглинається електронним мембранним транспортом (Kaziolek et al., 2004) фотосистеми II (PS II). Детальніше це питання розглянуте у праці Lautner et al. (2005), в якій досліджено відповіді на тепловий подразник *Populus trichocarpa* та показано, що сигнал залежить від наявності у клітинах рослин іонів кальцію. Так само, як і потенціали дії клітин тварин, поширення електричних сигналів у рослинах відбувається завдяки іонним каналам. Слід зазначити, що іонні механізми збудливості клітин у тварин зазвичай пов'язані з потоками іонів Na^+ та K^+ , у той час, як для рослин головною роллю у формуванні потенціалів дії відіграють іони Ca^{2+} , Cl^- та K^+ (Samejima and Sibaoka, 1980; Felle and Zimmermann, 2007). Транспорт H^+ крізь плазматичну мембрану також може мати значення для потенціалів дії (Oprittov and Pyatygin, 2002; Vodeneev et al., 2006) та їх поширення. Під час нагрівання листка рослини спостерігали електричне збудження, що супроводжувалось активними H^+ -потоками у плазматичній мембрані та розпадом Р-тип H^+ -АТФ-ази (Stahlberg et al., 2006). Ензими клітинної стінки, плазматичної мембрани та цитоплазми змінюють свою активність під час локальних змін концентрації іонів (Davies, 1987). Внесок H^+ -потоків установлено завдяки факту локального підкислювання цитоплазми клітини (Bulychev and Kamzolkina, 2006; Vodeneev et al., 2006; Grams et al., 2009) під час зростання потенціалів дії. Покладаючись на факти щодо іонної динаміки під час зростання електричного збудження клітин, можна побудувати еквівалентну математичну модель для детальнішого вивчення цих процесів та визначення внеску описаних електрохімічних механізмів у процес електрогенезу.

Опис динаміки електричних процесів на клітинному рівні після публікації відомої роботи А. Ходжкіна та А. Хакслі (Hodgkin et al., 1952), де започатковано такий підхід для нервової клітини, традиційно здійснюється із застосуванням методу математичного моделювання. Розробка та перевірка адекватності подібної моделі для опису електродинаміки рослинної клітини потребують накопичення значного обсягу експериментальних даних, зокрема, в умовах різних способів подразнення рослин і комбінацій таких подразнень.

Сучасні електронно-вимірювальні прилади здатні забезпечити реєстрацію біоелектричних потенціалів рослин як контактено, так і дистанційно, з високою чутливістю та малою інерційністю (Zhu, 2002). Але при цьому як для наукових досліджень, так і для виконання практичних завдань актуальною залишається комплексна автоматизація процесу реєстрації та обробки біопотенціалів із застосуванням сучасних комп'ютерних технологій (Hoppensteadt et al., 1986).

Мета цієї роботи полягає в оцінюванні реакції рослин на окремі теплові та холодні подразники, а також біоелектричної активності під час комбінованої стимуляції та встановленні можливих внутрішньоклітинних механізмів за допомогою моделювання цих процесів.

Результати та їх обговорення

Схема апаратно-програмного комплексу, за допомогою якого проводились дослідження, описана у праці Chernetchenko et al. (2013). У досліджах проводили реєстрацію біоелектричних потенціалів під впливом холодкових і теплових стимулів на листя кукурудзи за методикою, описаною Davies (2004). При цьому здійснено цифровий запис і програмну обробку зареєстрованих потенціалів.

Спочатку досліджено окремі параметри теплового та холодкового імпульсу, які брали за еталон для стандартної температури охолодження (нагрівання). Температуру стимулу визначали за допомогою термометри та мікрровольтметра (у досліджах вона складала $t^- = +6\text{ }^\circ\text{C}$, $t^+ = +9,5\text{ }^\circ\text{C}$). Після цього подразнювали холодом листок кукурудзи. Стимул таких параметрів викликає деполяризаційний імпульс (рис. 1 а). Загальна тривалість імпульсу – 28 с, амплітуда – 42 мВ, швидкість наростання імпульсу – приблизно 10 мВ/с. Фаза деполяризації триває 4 с, вона набагато коротша за фазу реполяризації, яка триває 24 с.

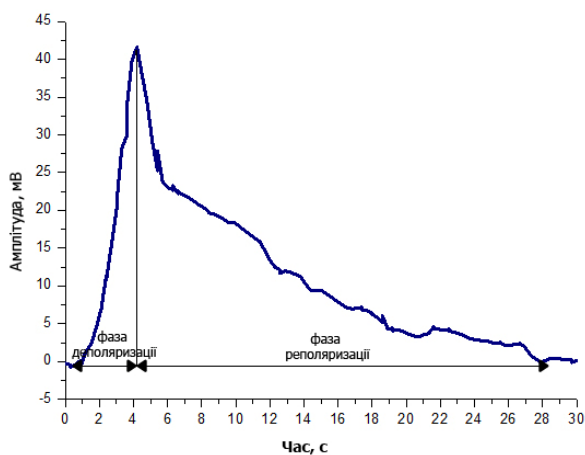
Якщо змінити полярність батареї, то як подразник можна подавати тепловий стимул. Теплова стимуляція викликає потенціал відповіді типу гіперполяризації (рис. 1 б). Загальна тривалість імпульсу становить 15 с, амплітуда відповіді на подразнення – 8 мВ, швидкість наростання

імпульсу – 1,6 мВ/с. Тривалість фази гіперполяризації – 5 с, реполяризації – 10 с.

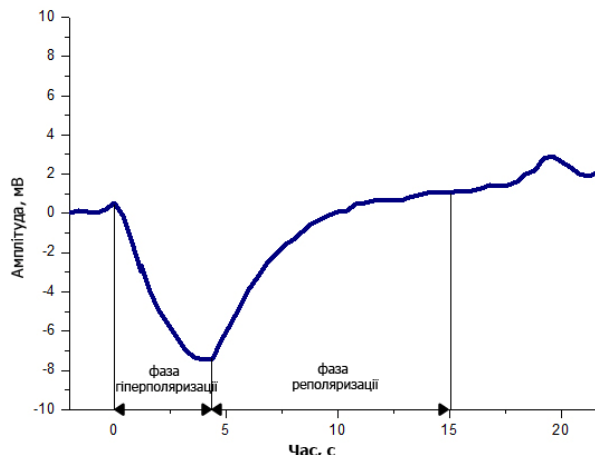
Після цього визначали взаємовплив теплових і холодкових потенціалів (наслідок дії комбінованих стимулів). Із цією метою застосовано методику комбінації подразників. Спочатку наносили подразник однієї модальності, за ним – іншої. У першій групі дослідів кондиціонувальний (К) тепловий імпульс передував холодковому – тестувальному (Т).

Спочатку тепловий стимул тривав 5 с. Після завершення дії теплового стимулу та релаксації рослини через час t здійснювали холодковий стимул, також тривалості 5 с. Значення параметра становило $t = 3, 5, 7, \dots, 23$ с. При цьому вимірювали амплітуду відповіді на холодковий стимул (A_1) (рис. 1 в). Після релаксації (5 хв) проводили 10 вимірювань для кожного значення змінного параметра, після завершення експериментів дані усереднювали.

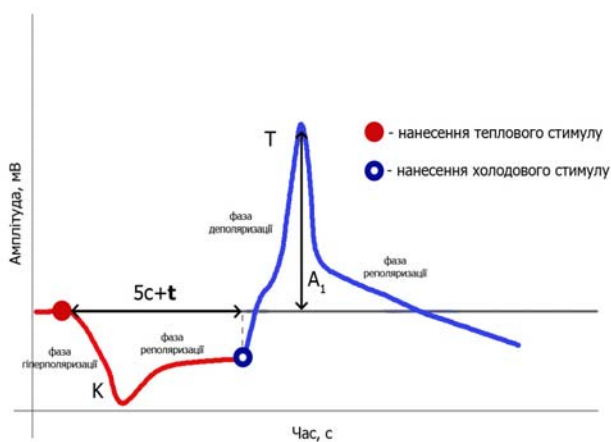
За великих інтервалів між К і Т (понад 21 с) імпульси відповіді практично не взаємодіють. Амплітуда відповіді складає 37 мВ, що становить 90% значення еталонної амплітуди (42 мВ), тривалість імпульсу дорівнює 27 с, що практично відповідає значенню еталону. Фаза реполяризації теплового імпульсу закінчилася, і пригнічення наступного холодкового імпульсу практично відсутнє (рис. 1 з).



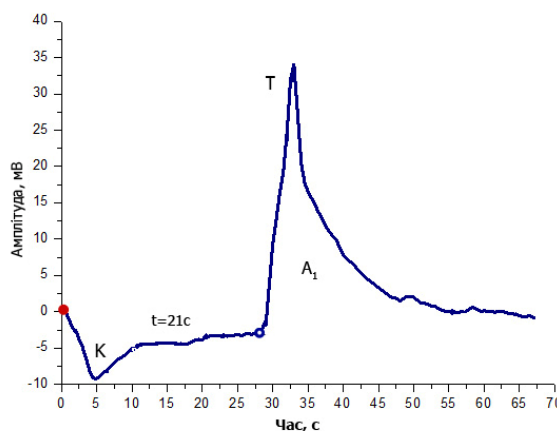
а



б



в



з

Рис. 1. Термічні потенціали під час одиночної стимуляції:

а – одиночний тепловий потенціал, б – одиночний холодковий потенціал, в – комбінована стимуляція (t – час між нанесенням стимулів, змінний параметр $t = 3, 5, 7, \dots, 23$ с, A_1 – амплітуда холодової відповіді), з – тепловий стимул, який передує холодковому (час між стимулами 21 с)

Під час скорочення інтервалу спостерігається виражена депресія тестувального потенціалу. Наприклад, для значення параметра $t = 3$ с, амплітуда холодого імпульсу складає 9 мВ (20% еталонного значення амплітуди), а для $t = 7$ с – 20 мВ (45% еталону). Скорочується також тривалість імпульсу: 6 і 15 с, відповідно (рис. 2 а, б).

Після накопичення достатньої кількості експериментальних даних і проведення усереднення аналізували отримані результати. Наступні потенціали мають меншу амплітуду відносно першого (рис. 3). Зі збільшенням часу між тепловим і холодним стимулами амплітуда холодової відповіді A поступово збільшується та наближається

до значення одиночного холодого стимулу. Тобто зі збільшенням часу зменшується вплив попереднього теплового стимулу на наступний холодий.

Результати, отримані із застосуванням автоматизованого програмно-апаратного комплексу, у цілому добре узгоджуються з результатами попередніх експериментів із реєстрації потенціалів листя кукурудзи під час термічної стимуляції та комбінованих подразників. Похибка, яка накопичується через обмеження точності вимірювальних пристроїв і наявність зовнішніх завад, перебуває в межах 2–3% і практично не впливає на характеристики вихідного сигналу.

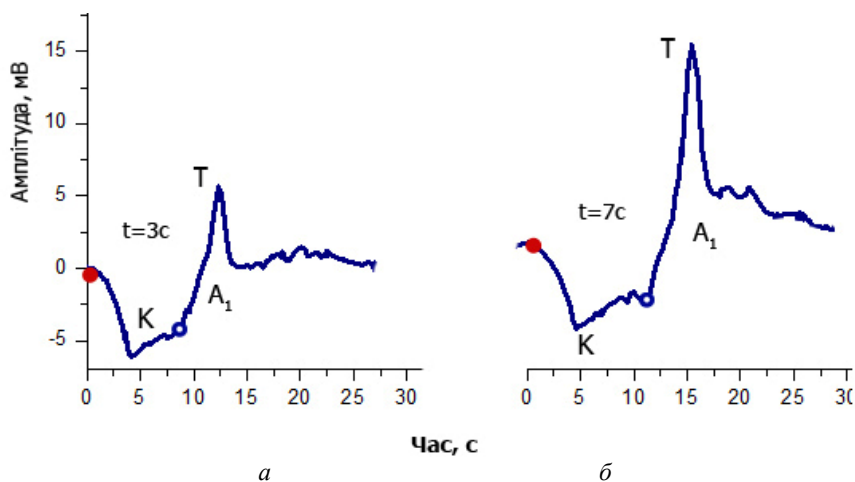


Рис. 2. Реакції під час комбінованих стимуляцій, тепловий потенціал передє холодому: а – час між стимулами $t = 3$ с, б – час між стимулами $t = 7$ с

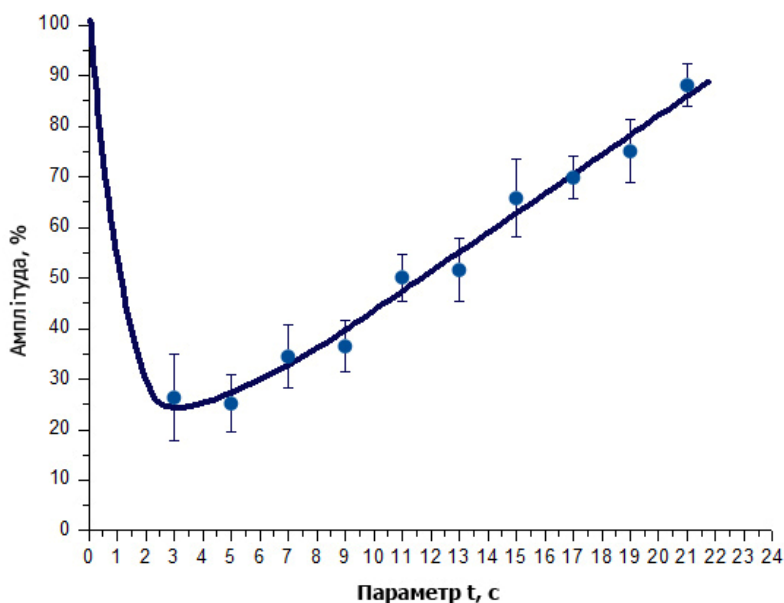


Рис. 3. Зміна амплітуди біопотенціалів залежно від параметра t : по осі абсцис – інтервал часу (с) між кондиціонульним і тестувальним подразненнями; по осі ординат – амплітуда імпульсу (%) відносно першого

Для аналізу внутрішньоклітинних механізмів виникнення та динаміки зареєстрованих біоелектричних потенціалів використано математичну модель клітини зі здатністю генерації активних електричних потенціалів.

Для опису динаміки іонних струмів I_i та потенціалу на мембрані V_m на основі механізму Ходжкіна – Хакслі (Hodgkin et al., 1952) використано формулу:

$$I_i(V_m, t) = (V_m - E_i)g_i \quad (1)$$

Як показали Chernetchenko et al. (2013), визначення параметрів моделі на підставі експериментальних даних під час реєстрації біоелектричних потенціалів та із застосуванням програмної апроксимації вхідних даних дає досить точні результати. Для отриманих експериментальних залежностей провідності іонних каналів мають значення відповідно $g_1 = 32,6$ та $g_2 = 70,1$, близькі до значень провідностей протонних каналів і каналів Ca^{2+} L-типу. Це досить достовірно вказує на походження

зареєстрованих потенціалів. Періодичні осцилятивні відповіді, що спостерігалися в експериментах (рис. 1 а), є активними електричними відповідями клітини на подразник, в основі яких лежить взаємодія іонів H^+ та Ca^{2+} . Деяке відхилення розрахованих під час моделювання електричних провідностей від табличних значень для відповідних іонів спостерігається через наявність у клітині струмів інших типів і шунтувального струму витоку іонів із клітини.

Висновки

Аналіз дослідів показує, що попереднє теплове подразнення на малих інтервалах 0–3 с на 75% гальмує «холодову» тестувальну відповідь, а починаючи з 4-ї по 24-ту секунду амплітуда потенціалу повільно відновлюється. Таке явище пояснюється тим, що попереднє теплове подразнення підвищує поріг збудливості клітин, які генерують тестувальний «холодовий» потенціал. При цьому на фоні фази реполяризації «холодового» потенціалу тепловий сприймається як надпороговий і спостерігається початкова фаза варіабельного потенціалу, за яким розвивається класичний «тепловий» потенціал гіперполяризаційного типу. Отже, можна зробити висновок, що попереднє теплове подразнення зумовлює підвищення порогу генерації ПД, а попереднє холодове подразнення викликає утворення двофазного «теплого» потенціалу, перша фаза якого – варіабельний потенціал.

Для аналізу можливих внутрішньоклітинних механізмів виникнення та динаміки зареєстрованих біоелектричних потенціалів розроблено математичну модель клітини зі здатністю до генерації активних електричних потенціалів. У результаті визначення параметрів моделі на базі отриманих експериментальних даних установлено, що в основі електричної відповіді клітини лежить селективна зміна електричної провідності клітинної мембрани для іонів H^+ і Ca^{2+} . Таким чином, показано зв'язок між потенціалами активності, що реєстрували з поверхні рослини, та внутрішньоклітинними процесами. Отримані результати можуть бути покладені в основу нової методики для визначення функціонального стану рослини.

Бібліографічні посилання

Chernetchenko, D.V., Motsnyj, M.P., Botsva N.P., Elina, E.V., 2013. Avtomitizovana systema reestracyi bioelektrichnih potencialiv [Automated experiment for bioelectrical potentials registration]. *Visn. Dnipropetr. Univ. Ser. Biol. Ekol.* 21(2), 70–75 (in Ukrainian).

Davies, E., 1987. Action potentials as multifunctional signals in plants – a unifying hypothesis to explain apparently disparate wound responses. *Plant Cell Environ.* 10, 623–631.

Davies, E., 2004. New functions for electrical signals in plants. *New Phytol.* 161, 607–610.

Eccles, J., 1966. *Fiziologija sinapsov* [Physiology of synapses]. Mir, Moscow (in Russian).

Friesen, W.O., Friesen, J.A., 1994. *NeuroDynamix: Computer models for neurophysiology*. Oxford University Press, New York.

Goldman, D.E., 1943. Potential, impedance, and rectification in membranes. *J. Gen. Physiol.* 27(1), 37–60.

Grams, T.E.E., Lautner, S., Felle, H.H., Matyssek, R., Fromm, J., 2009. Heat-induced electrical signals affect cytoplasmic and apoplastic pH as well as photosynthesis during propagation through the maize leaf. *Plant Cell Environ.* 32(4), 319–326.

Heldt, H.W., 1997. *Plant biochemistry & molecular biology*. Oxford University Press, Oxford.

Hille, B., 2001. *Ionic channels of excitable membranes*. Sinauer Associates, Sunderland.

Hodgkin, A.L., Huxley, A.F., 1952. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J. Physiol.* 117, 500–544.

Hoppensteadt, F.C., 1986. *An introduction to the mathematics of neurons*. Cambridge University Press, Cambridge.

Huguenard, J., McCormick, D.A., 1994. *Electrophysiology of the neuron: An interactive neuron*. Oxford University Press, Oxford.

Koch, C., Segev, I., 1989. *Methods in neuronal modeling: From synapses to networks*. Bradford Book, The MIT Press, Cambridge.

Lysikov, V.N., 2001. Studying some features of maize genetics and developmental biology using electrophysiological techniques. Action potentials in maize sieve tubes change phloem translocation. *J. Exp. Bot.* 45(4), 463–469.

Motsnyj, M.P., Elina, E.V., Vlasova, S.V., 2004. *Issledovanie reakcii rasteniy, vizvannoi ritmicheskoy stimulyacii* [The study plants responses induced by repetitive stimulation]. *Nauka ta osvita, Odessa* 55, 37–38 (in Russian).

Muyskens, M.A., Glass, S.V., Wietsma, T.W., Gray, T.M., Mark, A., 2007. Data acquisition in the chemistry laboratory using LabVIEW software. *J. Chem. Educ.* 73(12), 1112–1114.

Ogren, P.J., Jones, T.P., Paul, J., 2006. Laboratory interfacing using the LabVIEW software package. *J. Chem. Educ.* 73(12), 1115–1116.

Rinzel, J., Ermentrout, G.B., 1989. *Analysis of neural excitability and oscillations*. The MIT Press, Cambridge.

Roblin, G., 1985. Analysis of the variation potential induced by wounding in plants. *Plant Cell Physiol.* 26, 255–261.

Rosljakova, T.V., Molchan, O.V., Vasekina, A.V., Lazareva, E.M., Sokolik, A.I., Jurin, V.M., de Bur, A.H., Babakov, A.V., 2011. Soleustojchivost' jachmenja: Vzaimosvjaz' jekspressii izoform vakuoljarnogo Na^+/H^+ -antiportera s nakopleniem $^{22}Na^+$ [Salt tolerance of barley: The relationship isoform expression vacuolar Na^+/H^+ -antiporter with accumulation of $^{22}Na^+$]. *Fiziologija Rastenij* 58(1), 28–39 (in Russian).

Stankovic, B., Witters, D.L., Zawadzki, T., Davies, E., 1998. Action potentials and variation potentials in sunflower: An analysis of their relationships and distinguishing characteristics. *Physiol. Plantarum* 103, 51–58.

Thiel, G., Homann, U., Plieth, C., 1997. Ion channel activity during the action potential in *Chara*: A new insight with new techniques. *J. Exp. Bot.* 48, 609–622.

Zhu, J.K., 2002. Salt and drought stress signal transduction in plants. *Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.*, 53, 247–273.

Надійшла до редколегії 11.10.2014