



УДК 581.1.03+631.531.173

Дослідження фотоіндукованих потенціалів листя перцю

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

Дніпропетровський національний університет імені Олеся Гончара, Дніпропетровськ, Україна

Досліджено біоелектричні реакції рослин за дії фотостимуляції за різних значень інтенсивності стимулів та довжин хвилі, що супроводжує процес світлової фази фотосинтезу. Запропоновано універсальну схему реєстрації біопотенціалів, яка дозволяє проводити експериментальні дослідження впливу світлових подразників на рослину. У цьому процесі було виключено дію будь-яких інших подразників і теплових факторів. Як фотостимулятор обрано світлові хвилі білого та червоного світла із довжиною хвилі 690 нм. Інтенсивність стимуляції змінювали від 150 до 450 Лк. Показано залежність параметрів потенціалів від внутрішньоклітинних процесів фотосинтезу, що відбуваються у клітині. Світлова фаза фотосинтезу супроводжується значними коливаннями електричного потенціалу мембрани хлоропластів. Також встановлено, що біоелектрична реакція листя рослини кількісно відрізняється для світла різних спектральних діапазонів, але якісна закономірність залишається незмінною, що показано на дослідженні біоелектричних відповідей листя під час дії світла в червоному спектрі. Запропоновано пояснення виникнення додаткової деполаризаційної фази біопотенціалів рослин, що виникають під час розвитку темнових репараційних процесів фотосинтезу. На базі отриманих експериментальних даних визначено кількісні та якісні характеристики біопотенціалів рослини на фотоподразники та пояснено роль внутрішньоклітинних процесів у генерації цих відповідей.

Ключові слова: комплексна реєстрація біоелектричних потенціалів; фотоіндуковані потенціали; біопотенціали листя перцю; мембрана хлоропластів

Research of photoinduced potentials of pepper leaves

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

Oles Honchar Dnipropetrovsk National University, Dnipropetrovsk, Ukraine

Bioelectrical potentials of the plants during photostimulation with various intensity values and wave lengths are studied. Such stimulation provides light-dependent reactions of photosynthesis. The universal scheme of registration of bioelectric potentials, which allows to carry out the experimental study of light stimuli effect on the plant is proposed. All registrations of potentials are observed on the pepper leaves. Photoinduced stimuli are different with intensity changed from 150 to 450 lux and different spectrums of white light and red light with wave length 690 nm. Different parameters of stimuli drive to different types of biopotentials of the plant, quantitative and qualitative relationships of this process are obtained. It is also found that bioelectrical reaction of the leaves is quantitatively different in various spectral ranges of light, but the quality remains the same for all cases, as shown in the study of bioelectric responses during exposure to the light in red spectrum range. The explanation of the additional depolarization phase that occurs during the running of dark reparative process of photosynthesis is given. Light-dependent reactions of photosynthesis are accompanied by significant changes in the electrical potential of chloroplasts' membrane. Besides, the dependence of bioelectrical reaction of the plant on different spectra of light is found. By this way, biophysical relation of plant potentials to the intracellular biophysical mechanisms during photo stimulation is obtained.

Keywords: complex bioelectrical potentials registration; photoinduced potentials; pepper leaves biopotentials; chloroplasts membrane

Вступ

Робота присвячена експериментальному дослідженню сумарної електричної активності, що супроводжує процес світлової фази фотосинтезу. Біопотенціали, які вивчаються, за сучасними уявленнями не є потенціалами дії (Motsnyj, 2011), а відображають зміну сумарного потенціалу мембрани хлоропластів, які безпосередньо беруть участь у процесі фотосинтезу. Фотосинтез – складний біохімічний процес, під час якого відбувається синтез органічних речовин із вуглекислого газу та води з обов'язковим використанням енергії світла. У вищих рослин органом фотосинтезу є листя, а органами виступають хлоропласти. У мембрану хлоропластів вбудовані фотосинтетичні пігменти: хлорофіли та каратиноїди. Хлорофіли поглинають червоне та синьо-фіолетове світло, натомість відбивають зелене світло, за рахунок чого надають рослині зеленого кольору. Молекули хлорофілу в мембранах тилакоїдів організовані у фотосистеми (Ljalin, 1990).

Реакції фотосинтезу поділяють на дві групи: реакції світлової та темної фази. Світлова фаза відбувається тільки за присутності світла в мембранах тилакоїдів за участі хлорофілу, транспортних білків, електронів та ферменту АТФ-синтази. За дії кванту світла електрони хлорофілу збуджуються та залишають молекулу, попадаючи на зовнішній бік мембрани тилакоїдів, яка при цьому заряджається негативно. Окиснення молекули хлорофілу, відбираючи електрони у води, зумовлює фотоліз води. Іони гідроксиду віддають свої електрони та перетворюються при цьому на вільні радикали, які, об'єднуючись, утворюють воду та вільний кисень. Кисень виділяється у навколишнє середовище, а протони накопичуються всередині тилакоїду.

У результаті мембрана тилакоїдів з одного боку за рахунок іонів H^+ заряджається позитивно, а з іншого за рахунок електронів – негативно. Коли різниця потенціалів на мембрані тилакоїду досягає 200 мВ, протони мігрують через мембранні канали АТФ-синтази та відбувається реакція фосфорилування: АДФ перетворюється на АТФ. Таким чином, у світловій фазі відбувається фотоліз води, який супроводжується двома важливими процесами: синтезом АТФ, а також виділенням кисню в атмосферу.

Розглянувши ці процеси, можна сказати, що світлова фаза фотосинтезу супроводжується значними коливаннями електричного потенціалу мембрани хлоропластів. Оскільки хлоропласти містяться у плазмі клітини, такі коливання суттєво змінюють мембранний потенціал плазмолемі (Rubin and Gavrilenko, 1977). Зміни мембранного потенціалу можна зареєструвати за допомогою макроелектрода. У рамках даної статті вивчено коливання мембранного потенціалу, які відбуваються при під час стимулювання поверхні рослини світлом.

Матеріал і методи досліджень

Дослідження біопотенціалів рослин проведено на добре розвинених проростках перцю (сорт Дарунок Молдови *in vivo*). Перед проведенням експериментів здій-

снювали підготовку проростків. Відібрані зерна перцю висівали у спеціальних горщиках, заповнених ґрунтом, і пророщували у вологому середовищі. Проростки використовували в експерименті через 30 діб після появи сходів.

Проросток у горщику із землею розташовували в екранованій камері, після чого обраний листок фіксували на спеціальній підставці фотостимулятора. Рослину витримували у темряві упродовж 30 хвилин для адаптації, після чого на поверхні листка розташовували неполяризовані електроди (ЕВЛ-1М). Активний електрод розташовувався в центрі «плями», що виникала на листку під час фотостимуляції, пасивний електрод – на неосвітленій частині листка. Між електродами упродовж експерименту реєстрували різницю потенціалів. Вихід електродів був з'єднаний із входом передпідсилювача. Сигнал із виходу передпідсилювача потрапляв на самописець Endim та на вхід пристрою оцифровки даних із подальшою обробкою у ПК.

Потенціали викликали за допомогою фотостимулятора, активною частиною якого є світлодіод, що випромінює світлову хвилю визначеної довжини. Для зменшення нагрівання листка використовували спеціальні інфрачервоні фільтри. Освітленість регулювали за допомогою зміни струму через світлодіод. Силу струму контролювали за допомогою цифрового міліамперметра. Освітленість вимірювали за допомогою люкметра Ю-116. Тривалість світлового імпульсу задавали за допомогою реле часу.

Для калібрування використовували калібрувальний генератор, який підключали на вхід підсилювача замість електродів.

Під час експериментів використовували світлові стимули білого світла тривалістю 15 с різної освітленості (150–450 лк) та різного спектрального діапазону (червоне світло – 690 нм). У серії експериментів реєстрацію здійснювали на одній і тій самій ділянці листка, що значно зменшує статистичну помилку отриманих даних.

Результати та їх обговорення

У дослідах біопотенціали викликали за допомогою одиночних фотостимулів тривалістю 15 секунд. Результат одного з типових дослідів показано на рисунку 1. Одиночні світлові подразники світловим імпульсом білого світла з рівнем освітленості 150 лк викликають суттєву зміну потенціалу листя. Потенціал гіперполяризації генерується практично в момент нанесення подразника (швидка зміна потенціалу вниз на графіку) та продовжує нарощуватись до моменту вимикання подразника (другий пік на графіку).

Потенціал нарощується та досягає максимального значення на 60-й секунд. Амплітуда потенціалу в максимумі досягає 12 мВ, після цього потенціал зменшується та на 120-й секунд досягає нульового значення, після чого зростає до моменту закінчення реєстрації (250-та секунда). У разі збільшення рівня освітленості до 200 лк картина суттєво змінюється.

Амплітуда початкової гіперполяризації зменшується до 10 мВ і, на відміну від попередньої реєстрації,

зменшується також тривалість фази гіперполяризації (з 120 до 80 с). На 80-й секунді гіперполяризація досягає нульового рівня та починається фаза деполяризації, яка досягає максимуму 10 мВ на 80-й секунді. Наприкінці

реєстрації потенціал коливається на рівні ± 7 мВ. У випадку подальшого збільшення освітленості до 450 Лк картина процесу суттєво не змінюється (рис. 1).

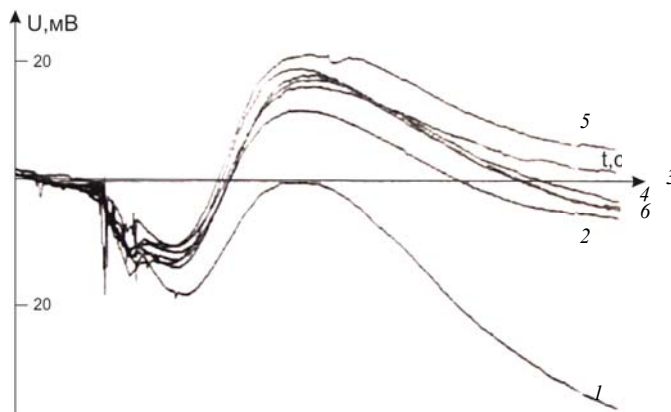


Рис. 1. Біопотенціали листка перцю, викликані одиночним імпульсним стимулом білого світла тривалістю 15 с: під час стимуляції використано різні рівні освітленості 1 – 150 Лк, 2 – 200, 3 – 300, 4 – 350, 5 – 400, 6 – 450 Лк

Аналогічні досліди проводили із застосуванням червоного світла довжиною хвилі 690 нм та освітленістю 150 та 450 Лк. Результати даної серії експериментів показано на рисунку 2. Із моменту включення стимулятора (а) за освітленості 150 Лк спостерігається спочатку невелика деполяризація, яка з 50-ї секунди переростає в гіперполяризацію з максимумом 8 мВ на 80-й секунді, потім знову переходить у деполяризацію з максимумом 7 мВ на

200-й секунді. При збільшенні рівня освітленості до 450 Лк (рис. 2) одразу після вмикання стимулятора спостерігається деполяризація, яка досягає максимуму 12 мВ на 150-й секунді, переходячи у гіперполяризацію до відключення стимулятора. Імпульсна стимуляція в першому випадку (I) викликала незначні деполяризаційні потенціали з амплітудою 2 мВ, а в другому (II) – потенціали взагалі були відсутні.

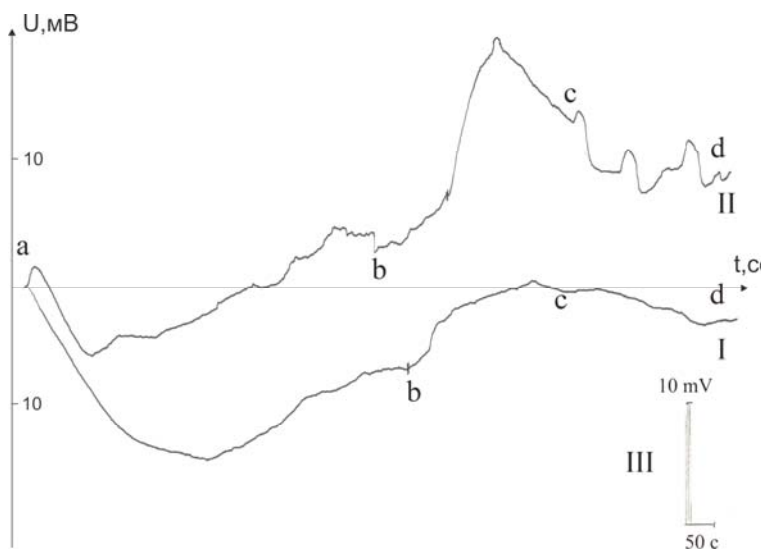


Рис. 2. Біопотенціали листка перцю, викликані стимуляцією червоним світлом із $\lambda = 690$ нм:

a-b – неперервна стимуляція, *c-d* – імпульсна стимуляція із $T = 15$ с;

I – освітленість 150 та II – 450 Лк, III – калібровка $A = 10$ мВ, $t = 50$ с

За середніми даними проведених груп дослідів для білого світла побудовано графік залежності рівня потенціалів гіперполяризації та деполяризації від рівня освітленості (рис. 3). За початкового рівня освітленості (150 Лк) гіперполяризація має максимальне значення (13 мВ), а деполяризація при цьому значенні освітленості дорівнює нулю. При збільшенні освітленості рівень гіперполяризації зменшується та стабілізується за освітленості 250 Лк на рівні 5,5 мВ. При цьому рівень

деполяризації зростає та стабілізується на рівні $-7,5$ мВ. Для червоного світла результати якісно не відрізнялися.

Потенціали, які спостерігалися (рис. 1), практично не мають латентного періоду, що свідчить про високу швидкість перебігу процесів. Із рисунка 1 також можна бачити, що швидкість збільшення потенціалу під час фази гіперполяризації практично не залежить від рівня освітленості. Цей факт говорить про незалежність швидкості процесу від рівня освітленості.

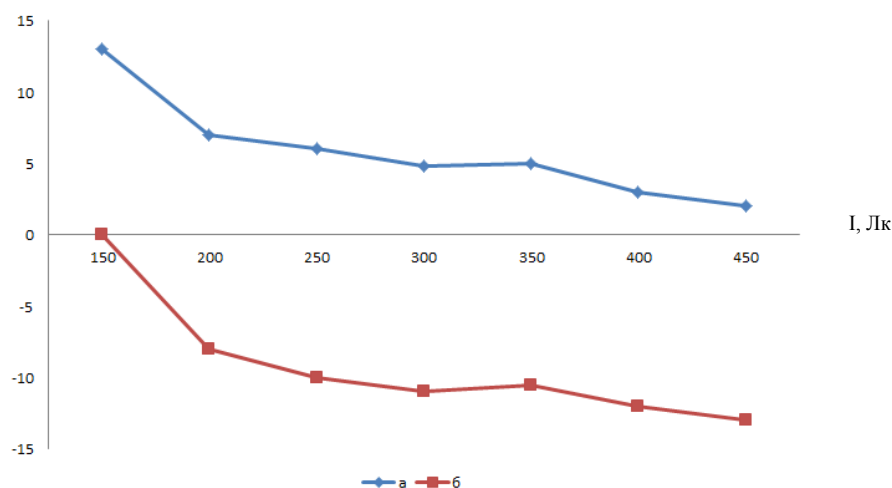


Рис. 3. Залежність потенціалів гіперполяризації (а) та деполяризації (б) від рівня освітленості листка білим світлом: по осі абсцис – рівень освітленості (Лк), по осі ординат – амплітуда потенціалів (мВ)

Співставлення отриманих даних із літературними відомостями (Rubin, 1973) показує, що коротколатентна фаза гіперполяризації відображає процеси поляризації мембрани хлоропластів при фотолізі води. Це процес, швидкість якого практично не залежить від енергії кванта збуджувального світла та його інтенсивності. Оскільки в експерименті використовували короткі світлові імпульси тривалістю 15 с, цей процес штучно переривався на початковій фазі. Загальна тривалість світлової фази біопотенціалів до моменту насичення не менше ніж 150 с (Motsnyj, 2001). Фаза деполяризації, яка виникає після вимкнення світла, імовірно, відображає репараційні процеси, які відбуваються у цитохромних системах. На думку деяких авторів (Ljalın, 1968), фаза вимкнення може бути пов'язана з темновими процесами фотосинтезу.

Висновки

Стимуляція листя перцю білим світлом упродовж 15 с зумовлює розвиток двофазного електричного потенціалу. Перша, коротколатентна фаза гіперполяризації, яка виникає практично одразу в момент увімкнення світла, імовірно, пов'язана зі світловою фазою фотосинтезу. Друга, фаза деполяризації, виникає при вимкненні світла та, ймовірно, пов'язана з темновими процесами, що супроводжують фотосинтез.

За рівнів освітленості понад 200 Лк динаміка потенціалів та їх амплітуди практично збігаються, тобто процеси фотосинтезу, що знаходять відображення в описаних потенціалах, практично не залежать від рівня освітленості. Реакції рослини на фотостимуляцію різного спектрального діапазону якісно не відрізнялися, що було перевірено за допомогою червоного світла, змінювались лише абсолютні значення амплітуди потенціалів. Результати дослідження впливу фотостимуляції рослини у різних частинах спектра можуть дати підставу для створення спеціальних, сприятливіших умов для перебігу внутрішньоклітинних процесів у рослинах. Отримані результати можуть бути застосовані для подальшого вивчення функціональних станів рослин.

Бібліографічні посилання

- Adygezalov, V.F., Grodzinskij, D.M., 1976. Izuchenie metabolicheskoy prirody foto inducirovanykh biopotencialov lista [The study of the nature of the photo-induced metabolic biopotentials sheet]. *Fiziologija i Biohimija Kul'turnyh Rastenij* 8(6), 601–606 (in Russian).
- Andrianov, V.K., Kurella, G.A., Litvin, F.F., 1986. O vzaimosvjazi potenciala pokoja i fotosinteza [On the relationship between the resting potential and photosynthesis]. *Fiziko-Himicheskie Osnovy Avtoreguljacji v Kletkah*. Moscow, 200–205 (in Russian).
- Bulychev, A.A., Andrianov, V.K., Kurella, G.A., Litvin, F.F., 1971. Transmembrannyj potencial hloroplasta i ego fotoinducirovannye izmenenija [The transmembrane potential of chloroplast and photoinduced changes]. *Doklady AN SSSR* 197(2), 473–476 (in Russian).
- Chernetchenko, D.V., Motsnyj, M.P., Botsva, N.P., Elina, E.V., Milykh, M.M., 2013. Avtomitizovana sistema reestracij bioelektrichnih potencialiv [Automated experiment for bioelectrical potentials registration]. *Visn. Dnipropetr. Univ. Ser. Biol. Ekol.* 21(2), 70–75 (in Ukrainian).
- Doroshek, A.S., Korona, O.A., 1980. O iniciirujushhix mehanizmah sveta zavisimosti bioelektricheskoy reakcii rastenij [About triggering mechanisms of light depending on the bioelectrical reaction of plants]. *Sveto-Zavisimaja Bioelektricheskaja Aktivnost' List'ev Rastenij*. Sverdlovsk, 92–96 (in Russian).
- Gavkovskaja, O.V., Jaglova, L.G., 1973. Fotoinducirovannye izmenenija potenciala kalija i raznosti jelektricheskix potencialov cherez membrany kletki [Photo-induced changes in the capacity of potassium and an electrical potential difference across the cell membrane]. *Biofizika Membrany* 154–159 (in Russian).
- Ljalın, O.O., 1967. Bioelektricheskije perehodnye processy, vznikajushhie v liste rastenija pri svetovom vozdejstvii [Bioelectric transients occurring in plant leaves when exposed to light]. *Kibernetika v Rastenievodstve* 95, 115–121 (in Russian).
- Ljalın, O.O., 1968. Fiziko-himicheskie osnovy avtoreguljacji v kletkah [Physical and chemical bases of autoregulation in the cells]. Moscow (in Russian).
- Motsnyj, M.P., Elina, E.V., Vlasova, S.V., 2004. Issledovanie reakcii rastenij, vizvannoї ritmicheskoy stimulyacii [The

- study plants responses induced by repetitive stimulation]. *Nauka ta Osvita*, Odessa, 55, 37–38 (in Russian).
- Novak, V.A., Ivankina, N.G., 1977. Priroda svetoinducirovannoj bioelektricheskoj reakcii pri vnekletochnyh otvedenii [The nature of light-induced bioelectrical reaction by extracellular recording]. Moscow, 143–154 (in Russian).
- Obolonskij, V.V., Rybin, I.A., 1973. Rol spektral'nogo sostava i intensivnosti sveta v formirovanii svetostimuliruemoj bioelektricheskoj reakcii rastenija [The role of the spectrum and intensity of light in the formation of bioelectric reaction svetostimuliruemoj plants]. *Upravlenie Skorost'ju i Napravlenost'ju Biosinteza u Rastenij*. Krasnojarsk, 30–31 (in Russian).
- Roblin, G., 1985. Analysis of the variation potential induced by wounding in plants. *Plant Cell Physiol*. 26, 255–261.
- Rubin, B.A., Gavrilenko, V.F., 1977. Biohimija i fiziologija fotosinteza [Biochemistry and physiology of photosynthesis]. Moscow, 143–145 (in Russian).
- Rybin, I.A., 1973. O razlichnoj prirode bioelektricheskih reakcij na vkljuchenie i vykljuchenie sveta [About the different nature of bioelectrical reactions on and off light]. *Doklady AN SSSR* 211(5), 1239–1241 (in Russian).
- Rybin, I.A., Miheeva, S.A., 1973. Dejstvie strofantina na bioelektricheskuju reakciju rastenija pri vkljuchenii i vykljuchenii sveta [Action of strophanthin on bioelectrical reaction of the plant when switched on and off light]. *Fiziologija Rastenij* 20(1), 88–91 (in Russian).
- Rybin, I.A., Miheeva, S.A., 1973. Ingibitory obmena kak vozmozhnyj instrument issledovanija bioelektricheskoj reakcii list'ev vysshih rastenij pri vkljuchenii i vykljuchenii sveta [Inhibitors of metabolism as a possible tool for studying bioelectrical reaction of leaves higher plants when turning light]. *Voprosy Reguljacji Fotosinteza* 3, 58–76 (in Russian).
- Rybin, I.A., Miheeva, S.A., 1973. O prirode bioelektricheskoj reakcii lista rastenija na vkljuchenie i vykljuchenie sveta [On the nature of bioelectrical reactions sheet plants on and off light]. *Doklady AN SSSR* 208(3), 742–744 (in Russian).
- Rybin, I.A., Miheeva, S.A., Efimov, A.K., 1972. Issledovanija biohimicheskoj reakcii lista rastenija na stupenchatoe izmenenie intensivnosti sveta [Research of biochemical reaction of leaf plants to a step change in light intensity]. *Fiziologija Rastenij* 19(3), 545–550 (in Russian).
- Rybin, I.A., Obolonskij, V.V., 1974. Jelektricheskaja reakcija list'ev kukuruzy, vyzvannaja monohromaticheskim svetom razlichnoj intensivnosti i dliny volny [Electrical reaction corn leaf caused by monochromatic light of different intensities and wavelength]. *Biofizika* 19(5), 878–884 (in Russian).
- Rybin, I.A., Obolonskij, V.V., Jefimov, A.K., 1972. Zavisimost' perehodnoj bioelektricheskoj reakcii lista rastenija ot spektral'nogo sostava sveta [Depending of transition bioelectrical reaction of leaf plants from the spectral composition of light]. *Fiziologija Rastenij* 18(6), 1170–1173 (in Russian).
- Rybin, I.A., Obolonskij, V.V., Miheeva, S.A., 1977. O dvuh komponentah svetoinducirovannoj jelektroreakcii list'ev vysshih rastenij [About two components of light-induced effect of leaves of higher plants]. *Fiziologija Rastenij* 24(6), 1165–1173 (in Russian).
- Volkov, G.A., Misjuk, L.A., 1971. Ob interpretacii bioelektricheskoj reakcii rastenija na razdrazhenie na primere sveta [On the interpretation of bioelectrical plant response to stimulation by the example of the light]. *Doklady AN SSSR* 197(6), 1435–1437 (in Russian).

Nadijшла до редколегії 14.09.2015