

7. Минский областной исполнительный комитет [Электрон. ресурс]: Любанский район. 2013. Режим доступа: <http://minsk-region.gov.by/ru/lyubanskij-rajon>
8. *Сцепановіч І.М., Сцепановіч А.Ф.* Навукова-метадычныя асновы маніторынгу лугавой і лугава-балотнай расліннасці Беларусі. Мінск, 2013. 289 с.
9. *Сцепановіч Я.М.* Трансект-метады як аснова маніторынгу раслінных экасістэм (з нямецкага досведу) // Міжнародны экалагічны досвед і яго выкарыстанне на Беларусі. Зборнік навуковых артыкулаў. International Environmental Experience: Applications for Belarus (collected papers) / Пад агульнай рэд. У. К. Слабіна. Віцебск, 2003. С. 226–230.
10. Туристская энциклопедия Беларуси / З.Я. Андриевская [и др.]; под общ. ред. И.И.Пирожника. Минск, 2007.
11. Управление трансграничным бассейном Днепра: суббассейн реки Припяти / Под ред. А. Г. Ободовского, А. П. Станкевича, С. А. Афанасьева. К., 2012. 448 с.
12. *Braun-Blanquet J.* Pflanzensociologie. Grundzüge der Vegetationskunde. Wien–New York, 1964. 865 s.

ИССЛЕДОВАНИЕ КАТИОННЫХ КАНАЛОВ КЛЕТОК КОРНЯ ПШЕНИЦЫ

Д. Е. Стрельцова, П. В. Чикун

Пшеница – одна из важнейших зерновых культур. Это главная продовольственная культура для большинства населения земного шара. Ценность пшеницы заключается в том, что ее белки способны образовывать клейковину, имеющую большое значение при производстве хлеба, макаронных изделий, манной крупы и других изделий [1].

В последнее время все большее внимание уделяется исследованию механизмов взаимодействия патогенов и растений.

Целью настоящей работы являлась адаптация электрофизиологической методики пэтч-кламп для исследования катионных каналов плазматической мембраны клеток корня пшеницы.

Объектами исследования служили 7–12-дневные проростки яровой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сортов «Василиса» и «Мунк», различающихся своей восприимчивостью к грибным болезням.

В 1978 г. немецкими биофизиками Е. Неером и Б. Сакманом (E. Neher, B. Sakmann) для измерения ионных токов через одиночные каналы был предложен метод локальной фиксации потенциала – пэтч-кламп (patch clamp). Суть метода заключается в следующем. Стеклопипетка, диаметр кончика которой около 1 мкм, подводится к мембране клетки и благодаря легкому присасыванию (через пипетку подается отрицательное давление) образует плотный контакт с участком мембраны, надежно электрически изолируя его (сопротивление контакта часто превышает 1 ГОм). В результате становится возможным зарегистрировать

токи, проходящие через этот участок мембраны, содержащий всего несколько ионных каналов.

Данная техника даёт возможность контролировать разность потенциалов на мембране, а также изменять условия окружения, т.е. химический состав растворов снаружи и внутри клетки. В данных контролируемых условиях измеряют трансмембранные ионные токи, проходящие через ион-транспортные системы, например, такие важные белковые комплексы плазматической мембраны, как ионные каналы и рецепторы. Эксперименты с техникой пэтч-кламп позволяют сделать выводы о том, как работают и регулируются ионные каналы, и соответственно, что лежит в основе опосредуемых ими процессов, в частности, минерального питания, клеточной сигнализации, адаптации к стрессовым воздействиям и т.д. [2,3].

На первом этапе любого исследования с применением техники пэтч-кламп для высших растений необходимо создать условия, в которых будут получены жизнеспособные протопласты. В результате проведенной нами работы были подобраны оптимальные сочетания целлюлолитических ферментов (целлюлолаз и пектиназ), осмотиков (сорбитол) и солевого состава среды для получения протопластов из корня пшеницы (таблица). За одно выделение выход составил 400-500 протопластов, потенциально пригодных для пэтч-кламп анализа. Они имели серую окраску, плотную консистенцию, четко очерченные края и демонстрировали отсутствие разрывов плазматической мембраны и тонопласта.

Таблица

Оптимизированный состав смеси и протокол выделения протопластов из корней пшеницы для экспериментов методом пэтч-кламп

Ферменты	1 % целлюлаза Onozuka RS (Yakult Honsha, Япония), 0,1% целлюлозин (CalBiochem, Великобритания), 0,1% пектолиаза Y-23 (Yakult Honsha, Япония)
Ионный состав	10 мМ KCl, 10 мМ CaCl ₂ , 2 мМ MgCl ₂
pH	5,7-6,0
Осмолярность	700 мОсм/кг

В ходе электрофизиологических тестов протопластов, выделенных их корней пшеницы, было показано, что в данной системе функционируют классические наружу- и внутрь-проводящие катионные каналы. Обнаруженные проводимости демонстрировали мгновенно- и медленно-активирующие компоненты тока.

В работе была протестирована реакция ионных каналов протопластов, выделенных из корня пшеницы, на присутствие в среде патогенного гриба фузариум, являющегося одним из наиболее опасных патогенов данного растения.

Одним из ключевых аспектов взаимодействия клетки растения с патогенными грибами является рецепция сигнала элиситора на плазматической мембране. Элиситоры – вещества, выделяемые патогенными организмами и распознаваемые растением, т.е. своего рода индукторы иммунного и приспособительного ответа. Одной из наиболее ранних ответных реакций клеток растений на действие патогенов и продуцируемых ими элиситоров является повышение в цитозоле содержания ионов кальция и протонов, что вызвано активацией соответствующих ионных каналов плазмалеммы и тонопласта. Индукция элиситорами потоков ионов кальция и протонов по градиенту концентрации приводит к деполяризации плазмалеммы и тонопласта. Было обнаружено, что это, в свою очередь, вызывает потенциалзависимую активацию анионных и калиевых каналов и дальнейшее изменение трансмембранного градиента различных ионов. Найдена связь между формированием ответной реакции клеток на действие элиситоров (образование фитоалексинов) и ионными потоками. Так, например, блокаторы ионных каналов ингибировали, а H^+ - и Ca^{2+} -ионофоры усиливали ответную реакцию клеток на элиситоры. [4,5].

При работе с пшеницей устойчивого к фузариуму сорта «Василиса» были выявлены две популяции клеток, по-разному реагирующие на культуральную жидкость патогенного гриба фузариум. В первой группе (2/3 клеток) культуральная жидкость фузариума вызывала активацию только выходящих токов, в то время как, во второй группе (1/3 клеток) активировались как выходящие токи, так и входящие токи. В протоластах, выделенных из корня менее устойчивого сорта «Мунк», не наблюдалось значительного изменения входящих и выходящих токов. Последнее может свидетельствовать о том, что устойчивость к фузариуму может зависеть от способности ионных каналов реагировать на элиситоры данного патогена. Растение, обладающее способностью быстро распознать патоген путем реакции на плазматической мембране, вероятно, имеет возможность лучшего приспособления и запуска более мощного иммунного ответа, что способствует выживанию при заражении.

Наши дальнейшие исследования будут направлены на установление характера модифицирующего влияния элиситоров патогенных грибов на функционирование обнаруженных катионных каналов с целью выявления потенциальных механизмов мембранной рецепции патогенных организмов в корнях злаковых культур. Также планируется провести исследование других фактором биотической и абиотической природы на работу ионных каналов пшеницы.

Таким образом, в ходе проведенной работы:

1. Были подобраны и апробированы условия подготовки объекта и проведения эксперимента с техникой пэтч-кламп на клетках корней пшеницы.

2. Продемонстрировано, что плазматическая мембрана клеток корня пшеницы обладает проводимостями, типичными для высших растений: внутрь- и наружу-направленными ионными каналами.

3. Выявлены закономерности влияния элиситоров патогенного гриба фузариум на работу ионных каналов. Установлено, что устойчивый к патогену сорт «Василиса» по сравнению сортом «Мунк» обладает способностью быстрой активации ионных каналов в ответ на присутствие в среде культуральной жидкости фузариума.

Литература

1. Интернет-ресурс:<http://www.russbread.ru/syre-xlebopekarnogo-roizvodstva/osnovnoe/zernovye-kultury-pshenica.html>
2. *Сидоров А.В.* Физиология межклеточной коммуникации. Минск, 2008.
3. *Zhao Y., Inayat S., Dikin D.A.* Patch clamp technique: Review of the current state of the art and potential contributions from nanoengineering // *J. Nanoeng. Nanosys.* 2008. V. 222. P. 1–11.
4. *Тарчевский И.А.* Влияние элиситоров на ионные потоки и электрические потоки растений // *Физиология растений.* 2000. Т. 47. № 2. С. 321–331.
5. *Yoshikawa M., Yamaoka N., Takeuchi Y.* Elicitors: Their Significance and Primary Modes of Action in the Induction of Plant Defense Reactions // *Plant. Cell. Physiol.* 1993. V. 34. № 8. P. 1163–1173.