

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
«АЛТАЙСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМ. И.И. ПОЛЗУНОВА»

На правах рукописи

Барышева Надежда Николаевна

**МЕТОД И СРЕДСТВО КОНТРОЛЯ МЕМБРАННОГО ПОТЕНЦИАЛА
ЗЕРЕН ПШЕНИЦЫ И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ ОЦЕНКИ
ВСХОЖЕСТИ**

Специальность: 05.11.13 – Приборы и методы контроля природной среды,
веществ, материалов и изделий

Диссертация на соискание ученой степени кандидата технических наук

Научный руководитель

доктор технических наук, профессор

С.П. Пронин

Барнаул - 2015

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	11
1.1 Роль всхожести в определении посевного качества семян пшеницы.....	11
1.2 Методика расчета нормы высева.	12
1.3 Обзор методов и средств оценки всхожести зерен пшеницы.....	13
1.3.1 Метод лабораторной оценки всхожести согласно ГОСТ 12038–84	13
1.3.2 Методы оценки жизнеспособности семян пшеницы.....	16
1.3.3 Метод оценки всхожести зерна пшеницы по изменению потенциала действия	20
1.4 Особенности строения зерновки пшеницы	22
1.5 Особенности изменения мембранного потенциала у растений	23
1.5.1 Потенциал покоя	25
1.5.2 Потенциал действия	30
1.6 Анализ применения мембранного потенциала в качестве параметра контроля всхожести семян пшеницы, выбор уравнения изменения мембранного потенциала.....	38
Выводы.	47
2 РАЗРАБОТКА МОДЕЛИ КОНТРОЛЯ МЕМБРАННОГО ПОТЕНЦИАЛА ..	48
Выводы.	52
3 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ	53
3.1 Описание средства контроля мембранного потенциала зерен пшеницы, как показателя их всхожести.....	53
3.2 Методика проведения экспериментального исследования.....	58
3.3 Статистический анализ полученных экспериментальных данных	68

3.4 Результаты экспериментального исследования изменения мембранного потенциала семян пшеницы с использованием уравнения Гольдмана-Ходжкина-Катца.....	74
3.5 Результаты экспериментальных исследований изменения мембранных потенциалов, полученных при проращивании зерен пшеницы с использованием растворов KCl различной концентрации	80
3.6 Сравнение теоретических заключений и экспериментальных результатов.....	89
Выводы.....	91
4 МЕТОД КОНТРОЛЯ МЕМБРАННОГО ПОТЕНЦИАЛА ЗЕРЕН ПШЕНИЦЫ И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ ОЦЕНКИ ВСХОЖЕСТИ.....	93
4.1 Подготовка семян пшеницы к проведению исследований.....	93
4.2 Измерение мембранного потенциала и статистическая обработка результатов.....	95
4.3 Контроль мембранного потенциала семян пшеницы, пророщенных с использованием дистиллированной воды, и оценка их всхожести... ..	96
4.4 Контроль мембранного потенциала семян пшеницы, пророщенных с использованием раствора KCl, и оценка их всхожести	98
Выводы	100
ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ РАБОТЫ	101
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	103
Приложение А. Условия проращивания семян сельскохозяйственных культур	114
Приложение Б. Акты внедрения	115

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования. Одной из важных гарантий продовольственной безопасности нашей страны является стабильное производство достаточного количества высококачественного зерна. Посевные качества зерна пшеницы – это одна из самых важных составляющих его потребительской стоимости, его конкурентоспособности и сельскохозяйственной производительности.

Всхожесть семян пшеницы является основным показателем, который определяет посевные качества семян, их пригодность для посева, норму высева.

В производстве сельскохозяйственной продукции в предпосевной период играет ключевую роль оценка посевных качеств семян пшеницы. Зачастую семена, не прошедшие дозревания после уборки урожая, при лабораторном анализе отличаются пониженной всхожестью, поэтому необходимо проводить дополнительную экспресс-оценку всхожести непосредственно перед высевом семян.

Современный метод оценки всхожести представляет собой лабораторный анализ, который включает в себя несколько продолжительных по времени этапов: выведение семян из состояния покоя (4-7 дней), проращивание семян (7 дней). Затем подсчитывают нормально проросшие зерна из четырех проб по 100 штук в каждой и оценивают процент всхожести. Этот метод является трудоемким, отличается длительным процессом подготовки к исследованию, поэтому для экспресс-оценки всхожести в сжатые сроки не подходит.

Оценка всхожести семян пшеницы в максимально сжатые сроки во время предпосевного периода является актуальной задачей. В настоящее время предпосевной анализ всхожести семян пшеницы занимает от 10 до 14 дней по ГОСТ 12038-84.

На сегодняшний день существует метод и средство контроля всхожести семян пшеницы по изменению потенциала действия [105], который позволяет

значительно сократить срок контроля всхожести, а именно на 7 – 10 суток, по сравнению с используемым методом. Однако разработанные метод и средство обладают низкой достоверностью данных о всхожести семян пшеницы. Метод основан на графоаналитической модели, которая, во-первых, не учитывает воздействие температуры на изменение мембранного потенциала, во-вторых, не позволяет оценить воздействие солевых растворов разной концентрации на изменение мембранного потенциала, так как при проращивании семян пшеницы используют только дистиллированную воду.

Поэтому разработка метода и средства контроля мембранного потенциала зерен пшеницы с учетом температуры и солевых растворов при проращивании дает возможность осуществлять оценку всхожести семян пшеницы с более высокой степенью достоверности и является актуальной задачей, которая представляет, как теоретический, так и практический интерес.

Основываясь на уравнение Гольдмана-Ходжкина-Катца, предлагается модель контроля мембранного потенциала зерен пшеницы, которая позволяет учесть воздействие температуры, определить зависимость мембранного потенциала от изменения концентрации ионов K^+ , Na^+ , Cl^- на внешней стороне оболочки зерна пшеницы с помощью солевых растворов, что, в результате, дает высокую достоверность оценки всхожести семян пшеницы.

Актуальность работы подтверждается участием в программе «У.М.Н.И.К.», организованной Фондом содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере при поддержке Федерального агентства по науке и инновациям и Федерального агентства по образованию. С января 2012 года по декабрь 2013 года выполнялся государственный контракт на реализацию проекта на тему «Метод и средство контроля всхожести семян пшеницы по изменению потенциала действия», договор № 12/нр на выполнение научно-исследовательских и опытно-конструкторских работ сроком на 2 года.

Целью диссертационной работы является разработка метода и средства контроля мембранного потенциала зерен пшеницы с учетом температуры и растворов KCl разной концентрации при проращивании семян для повышения достоверности оценки всхожести зерен пшеницы.

Основные задачи диссертационной работы.

Для достижения поставленной цели в диссертационной работе были сформированы следующие задачи:

- провести аналитический обзор существующих методов оценки всхожести семян пшеницы;
- на основе уравнения Гольдмана-Ходжкина-Катца разработать модель контроля мембранного потенциала зерен пшеницы, как показателя их всхожести;
- разработать экспериментальную установку для исследования изменения мембранного потенциала в зависимости от всхожести, температуры и растворов KCl различной концентрации;
- исследовать изменения мембранного потенциала в зависимости от известной всхожести семян пшеницы, температуры и солевых растворов KCl различной концентрации при проращивании;
- разработать метод контроля мембранного потенциала зерен пшеницы, как показателя их всхожести, с учетом температуры и концентрации растворов KCl при проращивании.

Объектом исследования является мембранный потенциал зерен пшеницы разной всхожести.

Предметом исследования является метод контроля мембранного потенциала зерен пшеницы, как показателя их всхожести, который основан на зависимости мембранного потенциала зерен пшеницы от их всхожести,

температуры, концентрации раствора KCl на внешней оболочке зерен, используемого при проращивании семян.

Методы исследования.

Для решения поставленных задач в диссертационной работе были использованы методы экспериментального исследования, методы статистической обработки экспериментальных данных и методы математического моделирования.

Достоверность.

Достоверность полученных результатов основывается на использовании семян пшеницы с известной всхожестью, полученных в Барнаульском филиале ФГУ «Россельхозцентр» по Алтайскому краю, как эталонных, на высоком коэффициенте детерминации при определении зависимости мембранного потенциала от всхожести, температуры, концентрации растворов KCl.

Результаты аналитических исследований подтверждаются результатами проведенных экспериментов и не противоречат фундаментальным исследованиям.

На защиту выносятся:

1. Обоснование необходимости разработки метода контроля мембранного потенциала семян пшеницы, как показателя их всхожести, с учетом воздействия температуры, солевых растворов разной концентрации при проращивании.

2. Модифицированное уравнение Гольдмана-Ходжкина-Катца, на основании которого разработана модель контроля мембранного потенциала семян пшеницы, как показателя их всхожести.

3. Результаты исследований изменения мембранного потенциала семян пшеницы в зависимости от температуры, концентрации растворов KCl при проращивании семян пшеницы.

4. Расчет абсолютных значений коэффициентов проницаемости оболочки семян пшеницы, а также внутренней концентрации ионов K^+ , Na^+ , Cl^- .

5. Алгоритм контроля мембранного потенциала семян пшеницы и его применение для оценки всхожести.

Научная новизна работы заключается в следующем.

В диссертационной работе представлено новое решение актуальной научно-практической задачи контроля мембранного потенциала семян пшеницы, как показателя их всхожести. Разработанные метод и средство позволяют повысить достоверность данных о всхожести семян пшеницы.

Впервые модифицировано уравнение Гольдмана-Ходжкина-Катца, которое позволяет определять концентрации ионов K^+ , Na^+ , Cl^- на внутренней стороне оболочки и ее коэффициенты проницаемости. На основании полученного уравнения, можно разрабатывать новые методы контроля, изменяя внешние параметры – температуру, концентрацию, использовать другие растворы.

Впервые определены концентрации ионов на внутренней стороне оболочки и ее коэффициенты проницаемости для семян пшеницы мягких сортов с различной всхожестью, которые могут выступать в виде сравнительной оценки для семян других сортов.

Практическая ценность работы.

Разработанные метод и средство контроля, в основе которого лежит модель контроля мембранного потенциала семян пшеницы, как показателя их всхожести, могут быть использованы сельскохозяйственными предприятиями и частными фермерами для оценки всхожести семян пшеницы в сжатые сроки.

Разработанное средство контроля мембранного потенциала семян пшеницы позволяет исключить температурное воздействие и повысить точность измерения.

Предложенная модификация уравнения Гольдмана-Ходжкина-Катца и математический алгоритм могут быть использованы для расчета концентраций ионов K^+ , Na^+ , Cl^- на внутренней стороне оболочки и ее коэффициентов проницаемости для зерен пшеницы любых сортов, что позволяет разрабатывать новые методы контроля.

Модифицированное уравнение позволяет исследовать влияние той или иной почвы на изменение мембранного потенциала семян пшеницы и, как следствие, всхожесть в конкретной почве.

На основе уравнения Гольдмана-Ходжкина-Катца и экспериментальных исследований научно доказано, что проращивание семян пшеницы при температуре $20^{\circ}C$ обеспечивает достоверную всхожесть семян. Полученный результат не противоречит диапазону температур, рекомендуемому ГОСТ 12038-84.

Апробация и реализация результатов работы.

Результаты диссертационной работы внедрены в Барнаульский филиал ФГУ «Россельхозцентр» по Алтайскому краю, в ФГБОУ ВО «Алтайский государственный аграрный университет» на кафедре «Сельскохозяйственные машины ИФ» и использованы при чтении лекций, курсовом и дипломном проектировании на кафедре «Информационные технологии» Алтайского государственного технического университета им. И.И. Ползунова.

Основные результаты диссертации докладывались на науч.–практич. конф. «Виртуальные и интеллектуальные системы», г. Барнаул, 2010, 2011, 2012, 2013гг.; на всероссийской молодежной конференции «Методы компьютерной диагностики в биологии и медицине», г. Саратов, 2011, 2012гг.; на XL научно-технической конференции по итогам работы профессорско-

преподавательского состава СевКавГТУ за 2010 год, г. Ставрополь, 2011 г.; на IX Всероссийской научно-технической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Наука и молодежь», г.Барнаул, 2012 г.

Публикация результатов исследования.

По теме диссертационной работы опубликовано 14 научных работ, в том числе 4 статьи в ведущих рецензируемых научных журналах, входящих в Перечень ВАК.

Личный вклад автора заключается в разработке и испытании экспериментальной установки для контроля мембранного потенциала зерен пшеницы, в экспериментальных исследованиях зависимости изменения мембранного потенциала от всхожести семян, от температуры и растворов КСЛ при проращивании семян, на основании которых был разработан новый метод контроля, позволяющий повысить достоверность данных о всхожести семян пшеницы.

Структура и объем диссертации.

Диссертационная работа состоит из введения, четырех глав, заключения, списка литературы и приложений, изложенных на 116 страницах машинописного текста, комментируется 30 рисунками, 9 таблицами. Список литературы включает 119 наименований.

В диссертационной работе обобщены результаты исследований, проведенных автором с 2010 по 2015 гг.

1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Роль всхожести в определении посевного качества семян пшеницы

Стабильное производство зерна высокого качества гарантирует продовольственную безопасность. Высокий урожай, прежде всего, определяется качеством посевного материала. Качество зёрен пшеницы является важной составляющей потребительской стоимости семенного материала, его конкурентоспособности.

Качество семян пшеницы обусловлено следующими показателями - всхожесть семян, жизнеспособность, чистота и отход семян, масса тысячи, влажность, зараженность болезнями и заселенность вредителями. Основываясь на эти параметры, рассчитывается посевная годность семенного материала, а также норма высева на гектар.

Требования к семенам пшеницы регламентированы ГОСТ Р 52325-2005, где указаны нормы показателей качества семян [1].

Одним из важных показателей качества зёрен пшеницы является их всхожесть, которая определяется количеством проросших в лабораторных условиях семян из четырех партий по сто штук в каждой за ограниченный период времени при оптимальной температуре в течение восьми суток. Проращивают семена на специальном ложе, в песке или с использованием увлажненной фильтровальной бумаги. При оценке всхожести из анализируемых партий выбираются проросшие и не проросшие семена, которые делятся на несколько групп: нормально проросших, ненормально проросших, набухших, твердых и загнивших. Затем в каждой из групп подсчитывается количество семян и вычисляется процент всхожести.

Требования к нормам всхожести регламентированы стандартами качества сортовых семян.

Известно, что семена пшеницы по посевным качествам подразделяются на три класса, учитывая всхожесть и чистоту. Сельскохозяйственные культуры первого класса должны обладать всхожестью более 95%. Второй класс семян пшеницы характеризуется всхожестью 92% и более, а третий класс присваивается при всхожести семян в 90% и более. Семена со всхожестью ниже 90% являются некондиционными.

Чем ниже всхожесть семян пшеницы, тем выше норма высева. Для высева семян запрещено использовать некондиционный по всхожести материал. Если использовать для высева семена с максимально достоверной всхожестью, то можно сэкономить в будущем тысячи тонн зерна.

1.2 Методика расчета нормы высева

Одной из самых актуальных задач для сельскохозяйственного производства является расчет нормы высева семян, то есть безошибочное определение количества семян, требующихся для высева на 1 гектар.

Нормы определяют в зависимости от региона, от его почвы, климатических условий, от способов посева, от сорта и засоренности, а главное, от посевного качества зерён пшеницы, установленного вследствие анализа основных показателей.

Использование высококачественного посевного материала позволит снизить норму высева и тем самым сэкономить расход семян.

Согласно ГОСТ 12038-84 определяется посевная годность для кондиционных семян [2] по формуле:

$$ПГ = \frac{Ч \cdot В}{100}, \quad (1.1)$$

где ПГ – посевная годность, %; Ч – чистота семян; В – всхожесть семян, %.

Значение посевной годности необходимо при определении нормы высева семенного материала [3].

Норма высева рассчитывается по формуле:

$$НВ = \frac{100 \cdot A \cdot M}{ПГ}, \quad (1.2)$$

где А – число всхожих семян, высеваемых на 1 га, млн.шт/га, М – масса 1000 семян, г; ПГ – посевная годность, %.

Согласно государственным стандартам на посевные качества семян пшеницы мягких сортов всхожесть для сортов первого класса должна быть не менее 95%, для второго класса – не менее 92%, для третьего класса - не менее 90%.

1.3 Обзор методов и средств оценки всхожести зерен пшеницы

Оценка всхожести, как одного из главных показателей качества зерен пшеницы, является актуальной задачей для сельскохозяйственных организаций. Точная оценка всхожести позволяет избежать больших экономических потерь, которые могут появиться вследствие увеличенной нормы высева или при замене некондиционных семян пшеницы.

1.3.1 Метод лабораторной оценки всхожести согласно ГОСТ 12038–84

Способ оценки всхожести согласно ГОСТ 12038-84 представляет собой проращивание зёрен в чашечках Петри, Коха на выбор в лабораторных условиях, используя для замачивания бумагу или предварительно прокаленный песок.

Перед началом эксперимента из исследуемой партии зёрен, которые отобраны после определения чистоты, применяя способ согласно ГОСТ 12037-81 [99], выделяется несколько проб по 100 зёрен. Из выделенной для лабораторного анализа всхожести пробы отбирают одну навеску, из которой выбирают зёрна для исследования, а остальные являются отходом. Отбор проб осуществляется по ГОСТ 12036-85 [100]. Таким образом, для анализа

всхожести отсчитывают 4 пробы, если масса зёрен исследуемой партии составляет 20%, и 2 пробы, если масса составляет от 10% до 20% [2].

Перед началом лабораторного исследования все оборудование подготавливается к эксперименту, т.е. промывается в кипяченой воде, затем дезинфицируются 1%-ным раствором марганцовокислого калия или спиртом.

Перед проведением лабораторного исследования всхожести семена пшеницы, свежесобранные или они или хранящиеся на складе, необходимо вывести из состояния покоя.

Для выведения из состояния покоя используется несколько методов обработки. Первый метод заключается в предварительном охлаждении. Зерна пшеницы размещают на ложе из увлажненной фильтровальной бумаге или увлажненном прокаленном песке, установив температуру 5°C-10°C, в течение нескольких дней (время определяется с учетом определения энергии прорастания). Если в день учета всхожести семена не проросли, то срок продлевается еще на три дня. Таким образом, для зёрен пшеницы время выведения из состояния покоя может составлять от 2 до 5 суток.

Второй метод заключается в предварительном нагревании сухих семян в открытых чашечках Петри или Коха при температуре от 30°C до 40°C в течение 5-7 дней. После чего семена проращивают согласно методам, описанным в стандарте.

Перед тем как отправить семена в термостат, их ополаскивают водой, после этого промокают их фильтровальной бумагой. Ложе обрабатывают 0,2%-ным раствором нитрата калия либо раствором гиббереллина концентрацией от 200 до 1000 мг в 1 дм³.

После подготовки семян и оборудования к исследованию растительни на 50% заполняются увлажненным песком, семена вдавливаются в песок и сверху покрываются слоем в 0,5 см увлажненного песка. Если для исследования используется фильтровальная бумага, то семена выкладываются между

несколькими слоями увлажненной фильтровальной бумаги в чашечках Петри или Коха.

Согласно условиям, прописанным в ГОСТ 12038-84, в термостатах поддерживается температура в 20°C (допускается отклонение не больше, чем на 2°C). Температура проверяется три раза в день. Ежедневно проверяется увлажненность песка или бумаги, не допускается переувлажнения, а при необходимости ложе дополнительно смачивается.

В термостатах нужно обеспечить периодическую вентиляцию, приоткрывая каждый день чашечки Петри или Коха на 2-3 секунды. Воду в термостате необходимо менять каждые 3-5 суток.

Оценку всхожести для зерен пшеницы мягких и твердых сортов осуществляют по истечении 7-8 дней, но окончательный срок лабораторного анализа может быть сокращен, если зёрна проросли преждевременно, а если за установленный срок семена не проросли, то время продлевается еще на трое суток.

Оценка всхожести заключается в подсчете нормально проросших зёрен пшеницы в исследуемых партиях. Семена проверяются на наличие развитых здоровых корешочков, неповрежденных подсемядольных и надсемядольных колен, а также на наличие двух семядолей и первичных листочков [2].

В результате лабораторного анализа определяется среднеарифметическое значение для всех исследуемых партий. В том случае, если полученное среднеарифметическое значение не превышает допустимое отклонение, представленное в таблице 1.1, результат лабораторного анализа засчитывается. Полученное значение считается всхожестью, результат записывают в процентах.

Если отклонение полученной в результате лабораторного анализа всхожести от среднеарифметического значения превышает допустимое отклонение в одной из четырех проб, то всхожесть определяют по остальным

трем партиям. Если результаты двух и более проб отклоняются от допустимого расхождения, то анализ повторяется.

Таблица 1.1 - Допускаемое отклонение для среднеарифметического значения всхожести

Среднеарифметическое значение всхожести	Допускаемое отклонение результатов контроля исследуемых партий от среднего
99%	-2%
97% – 98%	±3%
95% – 96%	±4%
92% – 94%	±5%
88% – 91%	±6%
83% – 87%	±7%
75% – 82%	±8%
62% – 74%	±9%

На сегодняшний лаборатории «Россельхозцентра» осуществляют оценку всхожести, используя метод проращивания зёрен в чашечках Петри или Коха, описанный в ГОСТ 12038-84. Данный метод характеризуется продолжительностью подготовки к проведению исследования (от 3 до 7 дней) и продолжительностью проведения эксперимента (около 8 дней).

1.3.2 Методы оценки жизнеспособности семян пшеницы

С целью сокращения продолжительности подготовки к исследованию и сокращения времени проведения анализа разработаны методы оценки всхожести с использованием переменной температуры и стимуляторов роста.

Наиболее распространенным методом является метод оценки с использованием солей тетразола. Данный метод применяют перед отправкой зёрен на хранение на склад. Метод заключается в следующих процедурах:

1. Зёрна пшеницы из исследуемой пробы специально замачивают на 20 часов в воде.
2. После этого зёрна разрезают пополам, одну половину зерновки удаляют.
3. Оставшиеся половинки заливаются раствором тетразола и выдерживаются в растворе в течение 30 минут при установленной температуре в 30°C.
4. Половинки зерновок промываются чистой водой, и затем подсчитывается количество окрашенных зародышей. Количество соответствует всхожести [4].

Данный метод оценки всхожести позволяет перед отправкой на хранение предварительно определить всхожесть семян пшеницы. Недостаток метода по анализу жизнеспособности заключается в трудоемкости (требуется большой ручной труд – разделить каждое зерно пополам), и полученные в результате анализа данные зачастую не сопоставимы с данными лабораторной всхожести.

Поэтому для оценки всхожести семян озимой пшеницы используется также метод, который заключается в проращивании семян с использованием стимуляторов роста. Этот метод является близким к предыдущему методу, он заключается в проращивании семян пшеницы с использованием стимуляторов роста в термостате в течение 10-12 часов [29,30].

Использование данного метода стимулирует рост семян, наполняя их физиологически активными веществами, тем самым увеличивая количество нормально проросших семян. Вот только стимулирование семян пшеницы может не дать нужных результатов, большое количество семян может не дать всходов, потому что процесс послеуборочного дозревания во время хранения семян не зависит только лишь от стимуляторов роста, а определяется также проницаемостью клеточных мембран и т.д. Поэтому полученные в результате

анализа данные также зачастую не сопоставимы с данными лабораторной всхожести.

Существуют также такие методы для экспресс-оценки качества семенного материала пшеницы, как методы контроля по определению жизнеспособности семян пшеницы по ГОСТ 12039–82. Это, прежде всего, тетразольно-топографический метод, как наиболее распространенный метод лабораторного анализа. Следующий метод - это метод окрашивания семян с использованием индигокармина и кислого фуксина. Для контроля качества применяют также метод с учетом скорости набухания семян, а также люминесцентный метод.

Все эти методы могут быть использованы для семян пшеницы, находящихся в состоянии покоя, если требуется очень быстрый результат. Методы используются также при оценке не проросших за время проведения исследования семян. Жизнеспособность данными методами, согласно ГОСТ 12037-81 [99], определяют по 2-м пробам (в каждой из пробы содержится 100 зерновок).

Метод тетразольно-топографический заключается в реакции клеток зародышей семян пшеницы на водный раствор тетразола. В результате реакции зародыши здоровых, с высокими показателями качества семян приобретают красноватый оттенок, а зародыши плохих семян остаются прежнего цвета [2]. Таким образом, зародыши семян пшеницы могут окрашиваться раствором тетразола не полностью, по особенностям окрашивания происходит классификация на жизнеспособные зёрна и нежизнеспособные.

Подготовка к анализу заключается в приготовлении оборудования к эксперименту, подготовки водного раствора тетразола, замачивании зёрен на 15-18 часов при температуре 20°C (если анализ свежееубранных семян, то при температуре 10°C-15°C). Затем семена разделяют на две половины вдоль зародыша, половинки зерновок промываются водой, затем погружаются в подготовленный водный раствор тетразола при температуре 20°C на полтора

часа (при температуре 30°C оставляют на 40 – 50 минут). Семена оставляют в полной темноте. Вторые сто половинок выбрасывают. После того, как половинки выдержаны в водном растворе тетразола, их ополаскивают 2-3 раза водой и затем промокают бумагой. Зародыши семян исследуют с использованием специального оборудования (самое простое – это лупа), а также просто осматривая зерновки. На протяжении исследования зародышей семена должны быть постоянно увлажненными [28].

В соответствии с рисунком окрашивания зародышей семена пшеницы определяются как жизнеспособные или нежизнеспособные. Если семя жизнеспособное, то наблюдается полное окрашивание зародыша или проявляются некрозы на верхнем конце щитка и кореиллизе. Количество жизнеспособных зёрен подсчитывают и отмечают на специальном чертеже плюсом, а нежизнеспособные зёрна - минусом. Затем считается среднеарифметическое жизнеспособности по результатам исследования двух проб по сто половинок зерен, конечный результат записывается в процентах.

Отклонение от результата не должно превышать допускаемое расхождение, приведённое в таблице 1.2.

Таблица 1.2 - Допускаемое отклонение от результатов исследования двух проб семян пшеницы

Среднеарифметическое жизнеспособности зёрен пшеницы по результатам исследования двух проб	Допускаемое отклонение от результатов исследования двух проб семян пшеницы
99%	±2%
98%	±4%
97%	±5%
95% – 96%	±6%
93% – 94%	±7%
90% – 92%	±8%
88% – 89%	±9%
84% – 87%	±10%
79% – 83%	±11%
74% – 78%	±12%
65% – 73%	±13%

Главные преимущества методов определения жизнеспособности заключаются в том, что эти методы значительно сокращают продолжительность проведения анализа (то есть позволяют сократить на 7 – 11 дней). Но недостатками данных методов является, прежде всего, небезопасность использования химических реагентов, а также трудоемкость подготовки семян к проведению исследования. На сегодняшний день все централизованно отказываются от использования формальдегидов для проведения исследования жизнеспособности и, как следствие, отказываются от методов с применением формальдегидов.

1.3.3. Метод оценки всхожести зерна пшеницы по изменению потенциала действия

В настоящее время предложен метод контроля всхожести семян, который основан на изменении потенциала действия зерна пшеницы.

Метод определения всхожести по изменению потенциала действия включает в себя несколько этапов:

1. Подготовка зерен пшеницы к проведению анализа путем замачивания 100 зерен пшеницы в течение 12 часов в специальных ячеистых поролоновых лотках, пропитанных 50 мл дистиллированной водой.

2. Измерение потенциала действия семян пшеницы с помощью средства контроля.

3. Обработка полученных результатов с применением статистических методов анализа, построение графика изменения усредненного значения потенциала действия зерна пшеницы, анализ по отличительным признакам.

На основе графоаналитической модели изменения потенциала действия зерен пшеницы делается заключение о всхожести исследуемой партии семян.

По отличительным признакам определяется семенное зерно - всхожесть более 91%, если всхожесть менее 91%, то это некондиционные семена [101-103].

Преимущество данного экспресс-метода заключается в минимальных временных и материальных затратах проведения эксперимента, в повышении производительности лабораторного анализа в сравнении с используемым методом ГОСТ 12038-84. Но этот метод обладает низкой достоверностью данных о всхожести семян пшеницы. Метод основан на графоаналитической модели, которая, во-первых, не учитывает воздействие температуры на изменение мембранного потенциала, во-вторых, не позволяет оценить воздействие солевых растворов разной концентрации на изменение мембранного потенциала, так как при проращивании семян пшеницы используют только дистиллированную воду.

1.4 Особенности строения зерновки пшеницы

Зёрна пшеницы отличаются овальной формой. Выпуклая сторона зерновки, спинка, противоположная сторона, вдоль которой проходит бороздка (углубление), называется брюшком.

Строение зёрен пшеницы характеризуется следующими особенностями:

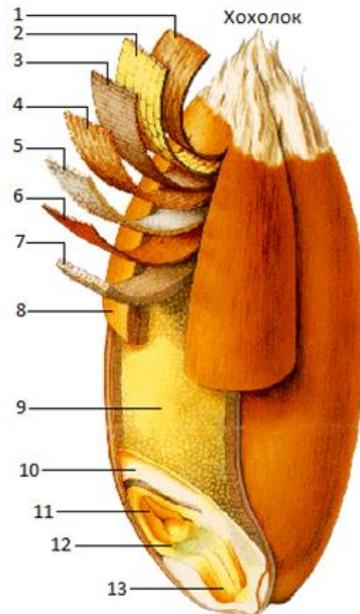
1. Зерновка пшеницы содержит несколько оболочек. Внешняя оболочка, так называемая плодовая, представляет собой три слоя крупных, полых и толстенных клеток (внешний слой клеток - эпидермис, затем следует эпикарпий, мезокарпий, эндокарпий). Плодовые оболочки - это от 3% до 6% всей массы зерновки. После плодовой оболочки идет семенная оболочка, которая включает в себя три отдельных слоя – водонепроницаемый (который плотно сросся со следующим слоем), пигментный и гиалиновый слой. Семенные оболочки составляют 1-2% от зерна.

2. Зерно пшеницы состоит на 70%-80% из эндосперма (или, так называемого мучнистого ядра), который ограничен алейроновым слоем. Чем ближе к зародышу клетки алейронового слоя, тем сильнее они уменьшаются в размере, а после и совсем исчезают. Масса алейронового слоя - 7-9 %.

3. В узкой части зерновки около эндосперма расположен зародыш, который содержит почечку, щиток и корешок. Зародыш всего составляет 1 – 3% от зерна пшеницы.

Таким образом, около 80% всей массы зерновки пшеницы составляет эндосперм. Соотношение остальных анатомических частей меняется в соответствии с рядом особенностей. К примеру, совокупность оболочек зёрен пшеницы твердых сортов значительно выше, чем мягких сортов.

На рисунке 1.1 представлена схема строения зерновки пшеницы:



1,2,3 – трехслойная плодовая оболочка; 4,5,6 – трехслойная семенная оболочка; 7 – алейроновый слой, который отделяет эндосперм; 8 – слои клеток плодовой оболочки пшеницы с поверхности; 9 – эндосперм (мучнистое ядро); 10 – щиток; 11 – почечка; 12 – осевая часть зародыша; 13 – корешок.

Рисунок 1.1 – Схема строения зерновки пшеницы

Для исследования изменения мембранного потенциала оболочки пшеницы (в сумме) выступают в роли мембраны.

1.5 Особенности изменения мембранного потенциала у растений

В настоящее время изучением биоэлектрических сигналов у растений занимаются многие лаборатории в нашей стране и за рубежом. Следует отметить, что в отличие от нервных импульсов животных, биоэлектрические сигналы в растениях более разнообразны по форме, длительности и скорости распространения. Процесс генерации биоэлектрических сигналов у животных и у растений помимо того, что воздействует на основные жизненно важные

биологические процессы, но и является главным в их протекании [5]. На сегодняшний день собран достаточно большой фактический материал, который свидетельствует о том, что мембранный потенциал у высших растений достаточно распространенная и очень важная функция. Получены и изучены данные о природе ионных токов, сопровождающих потенциал действия. При исследовании данного вопроса у высших растений главной задачей является исследование ионного обмена, который возникает в процессе генерации и распространения электрических импульсов, то есть потенциала действия.

Живые организмы представляют собой самоуправляемый и самоприспосабливающийся механизм, имеющий информационно-управляющую систему управления процессами жизнедеятельности как на генетическом уровне, так и на клеточном уровнях. Что, в свою очередь, позволит осуществлять контроль над многочисленными параметрами, отвечающими за жизнеобеспечение, что, в свою очередь, обеспечивает рост и биологическое развитие растения в изменяющихся внешних условиях окружающей среды [6]. Жизнь растений зависит, прежде всего, от влаги, поэтому возникновение электрических процессов в них наиболее полно наблюдаются при нормальном увлажнении, и, естественно, растения затухают при отсутствии влаги. Это объясняется обменом электрических зарядов между внешней жидкостью и стенками сосудов во время протекания питательных растворов по капиллярным сосудам растений, а также во время ионного обмена между клетками и внешней средой. В клетках образуются электрические поля, которые играют очень важную роль в жизнедеятельности.

Клетки растений, так же как и нервные или мышечные клетки животных, отличаются разностью потенциалов между внутренней и наружной поверхностями мембраны, которая обусловлена разным составом ионов внутриклеточной и внеклеточной сред [7].

1.5.1 Потенциал покоя

Электрогенез клеток высших растений, находящихся в состоянии покоя, имеет комплексную природу. Это объясняется как абсолютно различными механизмами (существуют активные и пассивные), которые лежат в основе генерации потенциала покоя, так и тем, что клетки высших растений отличаются многочисленными мембранными структурами, которые обладают определенными электрическими свойствами.

Роль внешней структуры, которая находится на границе между внутренним содержанием и окружающей средой, у клеток растений выполняется целлюлозной клеточной стенкой с аморфным матриксом из полимерных молекул пектина с отрицательным поверхностным зарядом.

В результате измерений потенциала внешней клеточной стенки с помощью микроэлектрода были получены потенциалы для харовых водорослей от -40 мВ до -70 мВ, когда у высших растений наблюдалась величина потенциала значительно ниже от -20 мВ до -30 мВ. Полученные результаты отражают способность клеточной стенки вносить довольно значительный вклад в общую величину потенциала покоя [15].

Плазматическая мембрана представляет собой основной структурный барьер, который отделяет внутреннее содержимое клеток растений от окружающей среды. В результате измерения потенциала плазмалеммы, используя микроэлектродную технику, получено значение более -100 мВ, что, в свою очередь, значительно превышает значение потенциала клеточной стенки у этих же объектов.

Тонопласт или вакуолярная мембрана представляет собой структурное образование, которое присуще только для растений и используется для отделения содержимого вакуоли от цитоплазмы. В результате исследований

получен отрицательный потенциал тонопласта, так как содержимое вакуоли заряжено положительно по отношению к цитоплазме.

Следовательно, измеренный с помощью микроэлектрода потенциал покоя включает в себя вклад потенциалов трех структурных образований – это потенциал клеточной стенки, плазмалеммы, а также потенциал тонопласта. При всем этом, клеточная стенка и плазмалемма, как правило, считается как единая мембрана. Вклад потенциалов плазмалеммы и тонопласта в потенциал покоя клетки, измеряемый с помощью микроэлектрода, характеризуется в большей мере электрическим сопротивлением каждой из трех мембран.

Многие водоросли отличаются более низким сопротивлением тонопласта, чем сопротивление плазмалеммы, а значит потенциал плазмалеммы определяет трансмембранную разность между вакуолью и внешней средой. В результате экспериментальных исследований на высших растениях получено сопротивление тонопласта, которое существенно превышает сопротивление плазмалеммы. Так как потенциал тонопласта небольшой - всего несколько десятков милливольт, и является противоположным по знаку потенциала на плазмалемме, то потенциал покоя высших растений может быть значительно занижен за счет влияния потенциала тонопласта. Что подтверждено результатами исследований, которые были выполнены, используя клетки паренхимы проростков овса. В результате полученный потенциал покоя был равен 100 мВ, когда клетка протыкалась микроэлектродом, наблюдалось низкое внутреннее сопротивление (2 – 4 Мом). Когда низкое значение измеренного потенциала покоя -50 мВ, наблюдалось совместно с высокими внутренними сопротивлениями при прокалывании (более 20 Мом). Следовательно, у высших растений при проведении опытов могут быть зарегистрированы потенциалы покоя со сведенными к минимуму потенциалами тонопласта. Это может произойти, когда микроэлектрод либо не проходит через тонопласт, либо проходит, но сильно шунтирует его.

Если потенциал покоя клеток высших растений измерен микроэлектродом, то он является алгебраической суммой потенциалов плазмалеммы и тонопласта [15]. И так как потенциал тонопласта уступает по величине потенциалу плазматической мембраны (потенциал тонопласта противоположен по знаку потенциалу плазмалеммы), измеренный потенциал со знаком «минус», всегда в той или иной степени опосредован потенциалом плазмалеммы. Доля потенциала плазмалеммы в общем потенциале покоя клетки возрастает при уменьшении вклада потенциала тонопласта и удачном шунтировании электродом плазматической мембраны.

Особенности потенциала покоя клеток растений, как и у животных, характеризуются двумя составляющими:

1) Диффузионная составляющая зависит от пассивного диффузионного перераспределения ионов на мембране, которое происходит под действием появившихся ранее ионных градиентов. И согласно уравнению Гольдмана-Ходжкина-Катца, имеют значение два фактора – градиент концентрации ионов и коэффициент их проницаемости через мембрану.

2) Метаболическая составляющая образуется под действием электрогенного насоса (также происходит у животных). Однако, у растений последний представлен не Na^+ , K^+ -АТФазой, а H^+ -АТФазой, которая транспортирует протоны из клетки наружу за счет энергии гидролиза АТФ.

Если клетка в состоянии покоя, то есть невозбуждённом состоянии, ионы на внешней и внутренней стороне мембраны создают относительно стабильную разность потенциалов, другими словами, между ее наружной и внутренней поверхностью возникает электрический потенциал, который в состоянии покоя, то есть неактивном состоянии, называется потенциалом покоя. Таким образом, потенциал покоя – это разность потенциалов между внутренним содержимым клетки (ткани или волокна) и наружной внеклеточной жидкостью [8].

Если с помощью электрода провести измерения мембранного потенциала в состоянии покоя, разместив его внутри живой клетки, то в результате мембранный потенциал будет иметь отрицательное значение (от -60 до -90 мВ). Отрицательные значения объясняются тем, что заряд на внутренней стороне мембраны в сумме значительно меньше, чем снаружи мембраны, несмотря на то, что с обеих сторон содержатся как катионы, так анионы. То есть, мембрана изнутри заряжена электроотрицательно по отношению к внешней стороне мембраны в тот момент, когда клетка в состоянии покоя [9].

Потенциал покоя определяется разными концентрациями ионов Na^+ , K^+ и Cl^- на внешней и внутренней стороне клеточной мембраны, а также неодинаковой её проницаемостью для этих ионов. На внешней стороне значительно больше ионов Na^+ , Ca^+ и Cl^- , на внутренней стороне мембраны находится больше положительно заряженных ионов K^+ и других составляющих (это отрицательные белковые молекулы, аминокислоты, органические кислоты, фосфаты и сульфаты).

Разница концентраций ионов K^+ и Na^+ на внутренней и внешней стороне мембраны клетки обеспечивается специальным механизмом, который отвечает за выталкивание ионов натрия Na^+ из клетки наружу и притягиванием ионов K^+ в протоплазму, что, в свою очередь, требует больших затрат энергии, которую клетка получает в процессе обмена веществ [10].

Потенциал покоя поддерживает состояние готовности молекул мембраны к процессу возбуждения в результате внешнего раздражительного воздействия. Все раздражающие воздействия на клетку, которые вызывают в результате длительное по времени понижение потенциала покоя, что может быть вызвано, к примеру, нарушением обмена веществ, повышением внеклеточного содержания положительных ионов калия K^+ , действием сильного электрического тока, приведут к снижению возбудимости клеток или к полной утрате способности к генерации электрических импульсов, так называемого

потенциала действия. Живые клетки характеризуются разностью потенциалов между внутренним содержимым клетки и наружным раствором в состоянии покоя в 60 – 90 мВ. Разность потенциалов определена на поверхности мембраны. Мембрана с внутренней стороны заряжена электроотрицательно по отношению к наружной стороне [11].

Концентрация положительных ионов калия K^+ в протоплазме приблизительно в 50 раз превышает концентрацию снаружи, в жидкости на внешней стороне клетки, поэтому, в процессе диффундирования из клеток ионы калия переносят на наружную сторону мембраны положительно заряженные ионы, при этом мембрана с внутренней стороны является практически непроницаемой для крупных органических анионов и, при этом, принимает отрицательный потенциал [12]. Так как проницаемость мембраны в состоянии покоя для положительно заряженных ионов Na^+ примерно в 100 раз ниже, чем для ионов K^+ , диффузия ионов натрия с внешней стороны мембраны (здесь ионы представляют собой основные катионы) в протоплазму очень мала. Диффузия немного уменьшает потенциал покоя, который, в свою очередь, обусловлен положительно заряженными ионами калия K^+ . В образовании потенциала покоя очень важную роль выполняют также отрицательно заряженные ионы Cl^- , которые диффундируют внутрь клетки.

Состояние покоя мембраны клеток характеризуется высокой концентрацией ионов Na^+ на внешней стороне мембраны и низкой концентрацией на внутренней стороне. Поляризация клеточной мембраны определяется действием этих ионных каналов и насосов (рисунок 1.2).

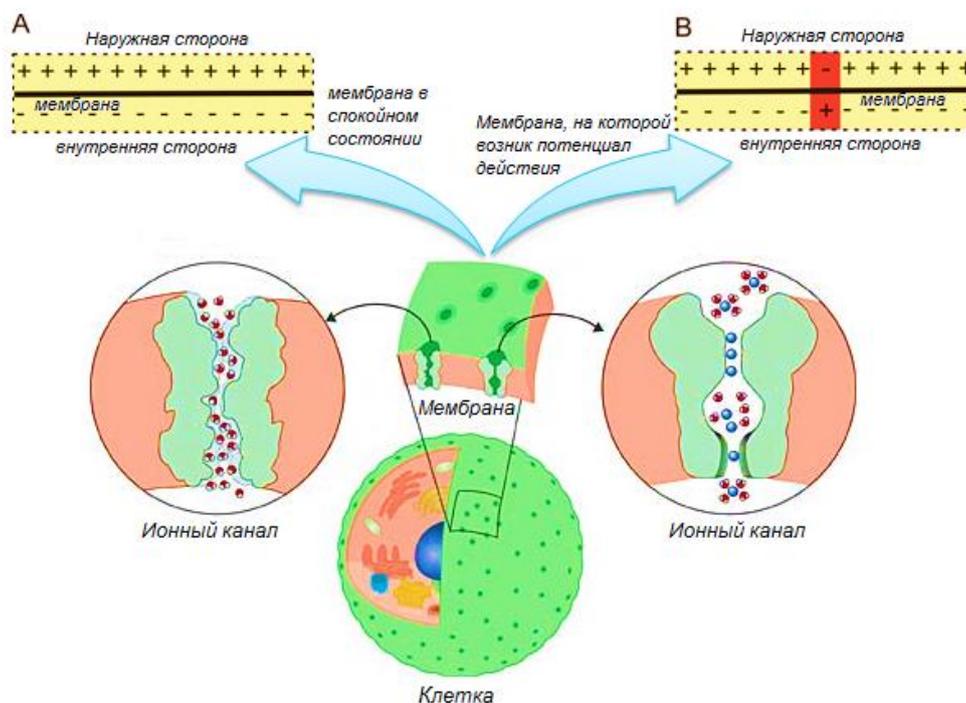


Рисунок 1.2 – Строение клеточной мембраны и схема распределения ионов с внутренней и внешней стороны мембраны возбудимой клетки в состоянии покоя (А) и при внешнем раздражающем воздействии, в процессе возникновения потенциала действия (В)

1.5.2 Потенциал действия

Мембранный потенциал зависит от воздействия различных раздражающих стимулов. В качестве раздражающего стимула может выступать электрический ток, который поступает как на внешнюю, так и на внутреннюю сторону мембраны через вводимый электрод. В естественных природных условиях раздражающее воздействие оказывает сигнал, в виде химической реакции, поступающий с помощью синапса или диффузной передачи через межклеточную среду от соседних клеток. В результате воздействия мембранный потенциал может сместиться как в отрицательную (деполяризация), так и в положительную (гиперполяризация) сторону [8].

Клеточные мембраны у возбудимых тканей содержат большое количество ионных каналов, которые способны быстро реагировать на

поляризацию мембранного потенциала и способны изменять ионную проницаемость клеточной мембраны [12]. То есть, при воздействии внешнего раздражителя на растение происходит изменение проницаемости его клеточных мембран для ионов K^+ и Na^+ .

С увеличением мембранного потенциала, то есть с гиперполяризацией мембраны, проницаемость поверхностных клеточных мембран для положительно заряженных ионов Na^+ и K^+ уменьшается, а при деполяризации мембранного потенциала, когда мембранный потенциал падает, происходит рост проницаемости, при этом скорость изменения проницаемости для ионов Na^+ существенно превосходит для ионов K^+ .

Таким образом, потенциал действия в клетках растений (и в нервных волокнах), появляется по причине быстрого роста проницаемости мембраны при достижении порогового уровня деполяризации [13]. Некоторое расхождение наблюдается у животных – у них деполяризующим является входящий поток ионов Na^+ , а у высших растений – выходящий поток ионов Cl^- . Фазу реполяризации потенциала действия в этих случаях формирует выходящий поток ионов K^+ . Потенциал-зависимые кальциевые каналы являются ответственными за возникновение процесса возбуждения в клетках растений.

Потенциал действия, как правило, возникает при деполяризации мембраны клетки, если деполяризация достигает некоторого порога или превышает его, тогда клетка возбуждается, происходит нарушение равновесного состояния в перераспределении электрических зарядов, и мембранный потенциал принимает максимальное значение, достигает пика, который в виде электрического импульса распространяется вдоль поверхности клеток [8].

Нарушение равновесия в распределение зарядов на внутренней и внешней стороне мембраны клетки и как следствие потенциал действия

происходят следующим образом. Когда клетка, находящаяся в состоянии покоя, стимулируется, разность потенциалов на клеточной мембране уменьшается по направлению к нулю, то есть происходит деполяризация. Деполяризация мембраны в первую очередь способствует открытию натриевых каналов, зависящих от потенциала.

Если падение напряжения достаточно, на небольшой промежуток времени одновременно раскрывается большое количество натриевых каналов, после чего ионы натрия с положительным зарядом проникают через них внутрь мембраны. Градиент концентрации и отрицательный заряд внутренней стороны мембраны, в данном случае, определяют движущую силу ионов натрия. Известно, что на внешней стороне мембраны содержится значительно больше ионов натрия, чем на внутренней стороне мембраны, то есть внутри клетки. Теперь внутренняя сторона мембраны оказывается заряженной положительно относительно внешней (рисунок 1.3). Поток ионов натрия способствует значительному изменению мембранного потенциала, которое, в свою очередь, называется потенциалом действия [8]. Потенциал действия представляет собой изменение мембранного потенциала, характеризующееся специфичной формой, вследствие раздражения клеток. Он длится недолго и вызывается закономерным изменением относительных концентраций ионов Na^+ и K^+ по обе стороны мембраны.

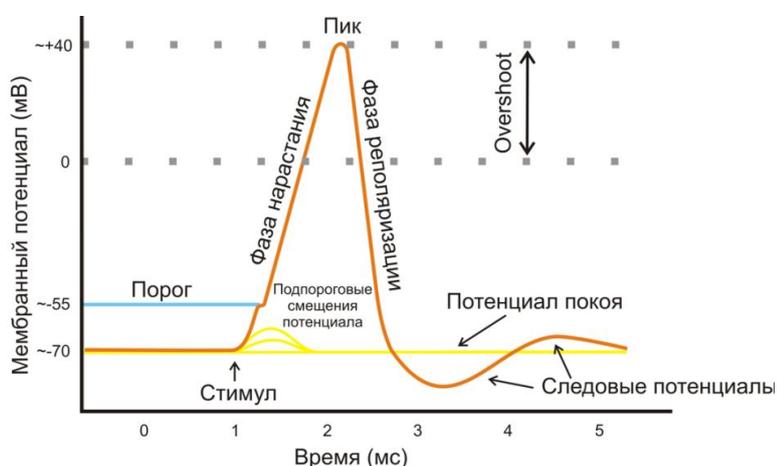


Рисунок 1.3 – Схематическое изображение потенциала действия

По мере продвижения электрического импульса по клетке натриевые каналы за ним закрываются, и открываются калиевые каналы, происходит выход ионов калия, что возвращает мембранный потенциал к равновесию. После чего включаются ионные насосы, быстро восстанавливающие исходную концентрацию ионов и состояние покоя в клеточной мембране. То есть, в течение действия потенциала натриевые каналы в мембране открыты, и ионы натрия входят внутрь, неся с собой положительный заряд. Когда натриевые каналы закрываются, открываются калиевые каналы, и ионы калия выходят, унося с собой положительный заряд [8].

После прохождения каждого потенциала возникает рефрактерный период, в течение которого мембрана восстанавливает свое нормальное ионное равновесие и нормальный потенциал покоя. В этот период новый потенциал действия возникнуть не может, так как клетка на определенный промежуток времени переходит в состояние абсолютной рефрактерности (в этом состоянии никакие сигналы не могут возбудить клетку снова), затем входит в фазу относительной рефрактерности, когда клетка стимулируется только сильными сигналами (амплитуда потенциала действия будет ниже, чем обычно). Инактивация натриевого тока, то есть инактивация натриевых каналов вызывает рефрактерный период [15].

Потенциал действия возникает согласно закону «все или ничего», то есть, возможно два варианта - мембрана клетки в случае раздражения ткани вообще не реагирует на стимул или реагирует, но с максимальной для неё на данный момент силой. Таким образом, если появившийся вследствие возбуждения клетки стимул является слишком слабым, и пороговое значение не достигнуто, в таком случае потенциал действия не появляется совсем, в то же самое время, пороговый стимул может вызвать потенциал действия точно такой же амплитуды, как и стимул, который превышает пороговый стимул. Это не значит, что амплитуда изменения потенциала действия мембраны всегда

идентична, в разном состоянии один участок мембраны может образовывать потенциалы действия с различной амплитудой.

Таким образом, свойства мембраны, отвечающие за возникновение потенциала действия, определяются поведением потенциал-зависимых натриевых (Na^+) и калиевых (K^+) каналов [15]. Входящий натриевый ток является основой формирования потенциала действия. После выходящий калиевый ток через открытые калиевые каналы возвращает потенциал мембраны к исходному уровню. Изначальную концентрацию ионов затем восстанавливает натрий-калиевый насос.

По ходу потенциала действия ионные каналы меняют свое состояние: у Na^+ -каналов три основных состояния – закрытое, открытое и инактивированное, у K^+ каналов два – закрытое и открытое.

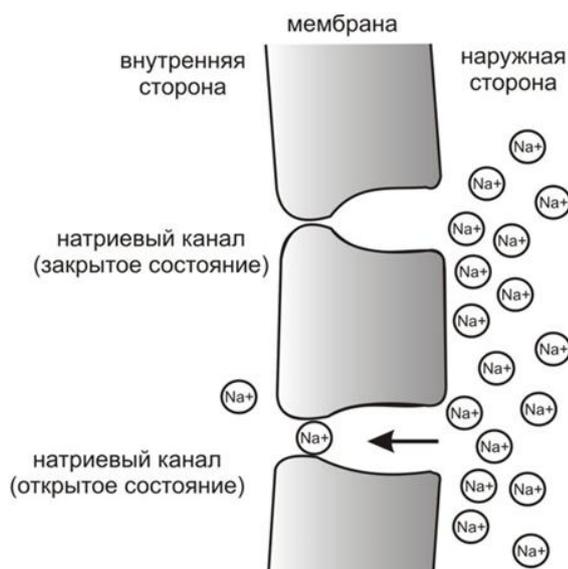


Рисунок 1.4 – Схема мембраны с двумя натриевыми каналами в открытом и закрытом состоянии

Поврежденный участок в тканях растений, как правило, заряжен отрицательно относительно неповрежденного. Заряженные семена растений обладают высокой электропроводностью, и поэтому заряд очень быстро теряется [16].

Продолжительность потенциала действия может насчитывать несколько десятков секунд. Потенциал действия может распространяться от одной клетки к другой как нервный импульс, однако скорость распространения гораздо меньше. Возникнув в любой определенной части высшего растения, потенциал действия начинает распространяться по нему, как правило, со скоростью в несколько сантиметров в секунду либо в минуту, и, таким образом, с помощью импульса передается сигнал о внешнем раздражении (известно, что по нервным клеткам животных сигнал о воздействии внешнего раздражителя распространяется в сто раз быстрее) [6]. Маленькая скорость распространения импульсов от внешних раздражений по клеткам высших растений обоснована их общей неподвижностью.

Результаты многочисленных исследований показали, что у растений распространение потенциала действия выполняет определенную функцию - это, прежде всего, сигнал об изменениях в среде их обитания [17].

При этом необходимо учитывать, что у растений отсутствует центральная нервная система, с помощью которой происходит распространение управляющих сигналов ко всем органам о внешнем раздражителе. Потенциал действия обладает возможностью самостоятельно воздействовать на выполнение функций всеми органами и тканями, по которым он был распространён. Это объясняется тем, что при возникновении потенциала действия на том или ином участке ткани, происходит изменение ионного состава, в особенности изменение содержания ионов калия и хлора. В результате концентрация ионов может увеличиваться в окружающих проводящий участок тканях. В процессе генерации импульса изменяется соотношение и других ионов, но это происходит в меньшей степени.

Известно, что обменные процессы в тканях очень сильно зависят от ионного состава. Поэтому потенциал действия может оказывать воздействие

как на органы, так и на ткани, так как по тканям распространяются импульсы, а органов импульсы достигают.

Необходимо учитывать, что в результате внешнего раздражающего воздействия происходит возникновение потенциала действия, при этом возникновение происходит неспецифично, то есть при разном раздражающем воздействии возникает, как правило, однотипная электрическая реакция. Необходимо отметить, что у высших растений обычно в ответ на внешнее раздражающее воздействие генерируются одиночные импульсы, тогда у животных при таком воздействии возникают ритмически повторяющиеся потенциалы действия [39].

Следовательно, можно заключить, что у высших растений потенциалы действия, которые возникают вследствие внешнего раздражения, не имеют специфической информационной нагрузки, а представляют собой сигнал о каком-то внешнем воздействии. Таким образом, потенциал действия, сам по себе, как сигнал является неспецифичным, однако в органах и тканях наряду с другими общими неспецифическими явлениями потенциал действия может вызывать изменения некоторых специфических процессов, которые свойственны данному органу (к примеру, в листьях растений изменение процесса фотосинтеза, а в корнях изменение поглощения питательных веществ).

Основной ролью потенциала действия является сигнальная роль, которая проявляется, прежде всего, в ряде естественных процессов. К примеру, возникновение многочисленных электрических импульсов вследствие попадания пыльцы на рыльце пестика, при этом импульсы распространяются по направлению к завязи. Это, в свою очередь, запускает цикл естественных процессов, которые подготавливают завязь растения к проникновению пыльцы и последующему оплодотворению [35, 36]. Следующий пример – у вьющихся растений потенциалы действия возникают также в усиках во время

механического соприкосновения с опорой и, таким образом, улучшают их ориентацию в пространстве. Умеренные изменения в состоянии окружающей среды также могут вызывать возникновение потенциалов действия, причем электрические сигналы могут генерироваться в ответ даже на очень слабые воздействия (к примеру, возникновение потенциала действия может вызвать перепад температуры всего от одного до двух градусов). Процесс генерации электрических импульсов растением в данном случае, казалось бы, лишен определенного смысла [7]. Но для растений, в данном случае, процесс генерации потенциала действия обладает определенным смыслом, который состоит в своеобразном определенном «предупреждении» для органов и тканей о том, что возникли существенные изменения во внешней среде. К примеру, незначительные изменения температуры в сторону охлаждения сами по себе могут быть и незначительными для растения, но они могут говорить о том, что предстоит значительное понижение температуры окружающей среды.

Роль «предупреждения» для образовавшихся электрических сигналов сводится, как получилось, к временному явлению повышения устойчивости всех органов и тканей растений к неблагоприятным для роста и развития внешним воздействиям. Это появившееся повышение устойчивости характеризуется, по-видимому, неспецифическим характером (то есть потенциал действия может проявляться по отношению к разным внешним раздражениям) и может быть представлен как своеобразный процесс перед адаптацией, так называемый преадаптация. Этот процесс служит как предварительной подготовкой к последующей глубокой адаптации. Если после «предупреждения», действительно, последует усиление воздействия данного внешнего фактора (например, после незначительного понижения температуры следует внезапное похолодание) [18].

Таким образом, следует отметить, что, наблюдая воздействие слабых и умеренных внешних раздражителей, мы имеем дело с ролью электрических

импульсов, то есть потенциалом действия, который связан с опережающим отражением действительности. Отсюда следует следующее заключение, высшим растениям свойственна элементарная недифференцированная чувствительность [78, 79].

Наблюдая у высших растений присутствие своеобразной чувствительности к внешнему воздействию, было бы неправильно согласиться с утверждением Бекстера, что эта чувствительность схожа с восприятием на эмоциональном уровне у животных. К примеру, высшие растения чувствуют того человека, который повредил их, и при его приближении к ним они реагируют усиленной генерацией электрических импульсов, то есть потенциала действия. Это объясняется именно элементарной чувствительностью, которая, в свою очередь, играет значительную и определяющую роль во взаимоотношениях между растениями и внешней среды [15].

В результате воздействия внешнего раздражителя появившиеся потенциалы действия выполняют функцию первичного экстренного сигнала, который позволяет растению оперативно перестроить все важные жизненные функции в экстраординарных условиях окружающей среды. Таким образом, по современным представлениям возникающему вследствие внешнего раздражения потенциалу действия присвоена вполне соответствующая роль сигнала для осуществления быстрых взаимодействий растительного мира с окружающей средой.

1.6 Анализ применения мембранного потенциала в качестве параметра контроля всхожести семян пшеницы, выбор уравнения изменения мембранного потенциала

Результаты исследований в области биоэлектрогенеза у высших растений все больше убеждают в том, что процесс генерации биопотенциалов играет ключевую роль в протекании жизненно важных процессов. Мембранные

потенциалы играют большую роль в протекании клеточных процессов, в осуществлении энергетических превращений, в процессе возбуждения при внешнем воздействии [15], что позволяет использовать мембранный потенциал для оценки всхожести семян пшеницы.

Исследование процесса возникновения биоэлектрических потенциалов внутри клеток стало возможным прежде всего благодаря использованию методов клеточной электрофизиологии. В развитии данных методов сыграла очень важную роль разработка техники микроэлектродных отведений, а также создание специальных усилителей биоэлектрических потенциалов, которые обладают высоким входным сопротивлением, малой постоянной времени (от 10 мс) и высокой чувствительностью (токи от 10-12 А) и, наконец, использование удачных объектов исследования - гигантский аксон кальмара и гигантские нейроны пресноводных моллюсков, а также разнообразные модельные мембраны.

Результаты многочисленных электрофизиологических опытов в совокупности с физическим и математическим моделированием транспортных процессов составляют основу современной теории электрогенеза в клетках.

Нормально функционирующая живая клетка в состоянии покоя всегда отличается разностью потенциалов между цитоплазмой и окружающей средой, так называемым потенциалом покоя. Основной вклад в создание потенциала покоя вносит выходящий калиевый ток, который осуществляется через специфические калиевые каналы. В состоянии покоя калиевые каналы открыты, тогда как натриевые каналы закрыты. Выход ионов калия из клеток происходит по градиенту концентрации. В результате это вызывает на внешней стороне мембраны скопление положительных зарядов, тогда как изнутри на мембране наблюдаются отрицательные заряды.

Возникновение потенциала покоя связано с неравенством концентрации ионов внутри клетки и в окружающей среде и неодинаковой проницаемостью

клеточных мембран для разных ионов. Внеклеточная жидкость имеет высокую концентрацию ионов натрия и хлора. Внутриклеточная жидкость имеет высокую концентрацию калия. В состоянии покоя наблюдается, что проницаемость мембраны для положительно заряженных ионов калия намного превышает проницаемость для ионов натрия.

Образование потенциала покоя происходит в два этапа. Первый этап заключается в создание незначительной (-10 мВ) отрицательности внутри клетки за счёт неравного асимметричного обмена Na^+ на K^+ в соотношении 3:2. В результате этого клетку покидает больше положительных зарядов с натрием, чем возвращается в неё с калием. Такая особенность работы натрий-калиевого насоса, осуществляющего взаимообмен этих ионов через мембрану с затратами энергии АТФ, обеспечивает его электрогенность.

Результаты деятельности мембранных ионных насосов-обменников на первом этапе формирования потенциала покоя включают дефицит ионов натрия (Na^+) в клетке, избыток ионов калия (K^+) в клетке, появление на мембране слабого электрического потенциала (-10 мВ).

Второй этап включает в себя создание значительной (-60 мВ) отрицательности внутри клетки за счёт утечки из неё через мембрану ионов K^+ . Ионы калия K^+ покидают клетку и уносят с собой из неё положительные заряды, доводя отрицательность до -70 мВ.

Таким образом, мембранный потенциал покоя - это дефицит положительных электрических зарядов внутри клетки, возникающий за счёт утечки из неё положительных ионов калия и электрогенного действия натрий-калиевого насоса. Переход ионов через клеточную мембрану даёт в результате клетке отрицательный заряд. После достижения равновесного состояния в перераспределении ионов калия мембранный потенциал, в результате, принимает значение потенциала покоя. Причины этой неравномерности

распределения ионов и ее влияние на потенциал покоя могут, однако, различаться у разных клеток.

Существует связь мембранного потенциала и поляризации клетки, что было доказано классическим опытом Бейкера, Ходжкина и Шоу с удалением аксоплазмы из гигантского аксона кальмара.

Мембрана обладает значительным электрическим сопротивлением и емкостью. Емкость мембраны довольно постоянна. Сопротивление же мембраны проходящему току сильно зависит от состояния ее ионных каналов.

С электрической точки зрения мембрана собой параллельное соединение конденсатора и два источника тока (калиевый и натриевый), характеризующиеся против направленными ЭДС и внутренними сопротивлениями R_K и R_{Na} . Сопротивления являются переменными и определяются калиевой g_K и натриевой проводимостями g_{Na} [4].

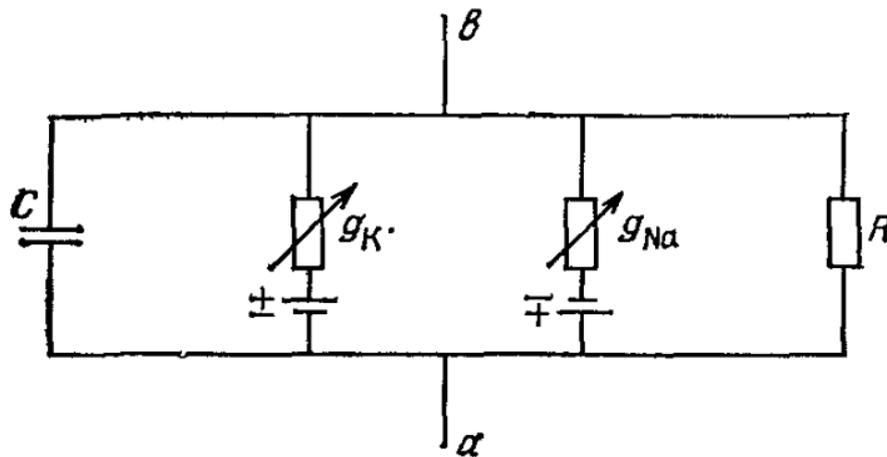


Рисунок 1.5 - Упрощенные схемы строения плазматической мембраны и ее механизмов, ответственных за формирование потенциала покоя и потенциала действия. Эквивалентная электрическая схема мембран, схема работы ионного насоса

Определенное состояние ионных каналов мембраны (закрытое у натриевых, открытое у значительной части калиевых) является очень важным фактором генерации мембранного потенциала. Вторым важным фактором

формирования потенциала является различие ионных составов внутри и снаружи мембраны, создаваемое непрерывной работой ионных насосов мембраны.

В результате ионного обмена положительно заряженные ионы калия, проникая через мембрану клетки, создают электрическое поле, которое, в свою очередь, задерживает диффузию других ионов калия. По мере проникновения из клетки ионов калия электрическое поле нарастает и, в результате, напряжённость поля достигает такого значения, когда поток ионов калия через мембрану прекращен. То состояние мембраны, при котором поток положительно заряженных ионов калия по их концентрационному градиенту уравновешен мембранным потенциалом, является состоянием электрохимического равновесия.

И величина такого мембранного потенциала в таком равновесном состоянии, может быть определена с использованием уравнением Нернста (но при этом считается, что мембрана проницаема только ионов калия):

$$\varphi = -\frac{RT}{zF} \ln \frac{[K^+]_i}{[K^+]_o}, \quad (1.3)$$

где φ – разность потенциалов на мембране; F – число Фарадея; R – газовая постоянная; T – температура; $[K^+]_i$ – концентрация ионов на внешней стороне мембраны клетки; $[K^+]_o$ – концентрация ионов на внутренней стороне мембраны клетки; z – валентность иона.

Любое возбуждение, вызванное внешним раздражением клетки растений, вызывает уменьшение на некоторое время концентрации положительно заряженных ионов калия во внутриклеточной жидкости и увеличением ее концентрации на внешней стороне клетки, что вызывает двигательную реакцию [46–50].

Мембранный потенциал, вычисленный на основании уравнения Нернста, указывает на то, что внутренняя и внешняя концентрация отрицательно

заряженных ионов хлора также соответствует состоянию электрохимического равновесия, но, при этом концентрация ионов натрия далека от равновесного состояния с мембранным потенциалом мембраны.

Таким образом, уравнение Нернста показывает, что концентрационный градиент ионов калия характеризует величину мембранного потенциала в состоянии покоя только в первом приближении. Расчетные значения равновесного мембранного потенциала совпадают с экспериментальными результатами только при наличии высокой концентрации ионов калия на внешней стороне мембраны клетки. Это показывает, что калиевая теория потенциала покоя несовершенна и не полностью объясняет наблюдаемые факты.

Установлено, что в возникновении потенциала в клетках высших растений играет существенную роль наличие отчетливо выраженной зависимости мембранного потенциала от ионов K^+ . Данная зависимость приближена к линейной в достаточно широком диапазоне концентраций ионов калия во внешней среде (от ~ 3 до 100 мМ) (отклонение от линейного характера наблюдается только при низких концентрациях иона калия (менее 3 мМ)). Наличие зависимости мембранного потенциала клеток высших растений от концентрации ионов K^+ во внешней среде подразумевает значительную проницаемость их мембран для этого иона.

Сравнивая относительные коэффициенты проницаемости клеток колеоптиля овса для ионов K^+ (PK), Na^+ (PNa) и Cl^- (PCl), получили, что мембрана клеток в большей степени проницаема для ионов калия: PK:PNa:PCl=1:0,68:0,034.

Плазматическая мембрана животных клеток также характеризуется более высокой степенью проницаемости для ионов калия, аналогичное соотношение можно наблюдать для аксона кальмара: PK:PNa:PCl=1:0,04:0,45.

Проницаемость мембраны к ионам калия определяется несколькими факторами. Основным модулятором проницаемости выступают ионы Ca_2^+ . Это связывают со способностью Ca_2^+ выступать в роли стабилизатора мембранной структуры. От присутствия ионов Ca_2^+ в среде зависят, в частности, величина заряда мембранной поверхности и текучесть липидного матрикса мембран. Электрофизиологические исследования показывают, что наличие Ca_2^+ в омывающей клетки среде заметно влияет на крутизну K^+ -зависимости потенциала покоя.

С учетом высокой физиологической калиевой значимости эти заключения позволяют считать, что изменения внутриклеточной концентрации ионов калия при различного рода воздействиях имеют приспособительный или регуляторный характер. Знание внутриклеточной концентрации K^+ и содержания K^+ снаружи клеток дает возможность с помощью уравнения Нернста судить о мембранном потенциале. Подход, основанный на феномене преимущественной проницаемости клеточной мембраны для калия, зачастую оказывается неудовлетворительным. Об этом свидетельствуют, в частности, расхождения в характере K^+ -зависимости теоретического потенциала и реального значения, измеренного в клетке высшего растения в условиях при низких концентрациях калия во внеклеточной среде.

Как оказалось, зависимость потенциала от концентрации K^+ в среде значительно лучше описывается уравнением Гольдмана. В состоянии покоя распределение Cl^- близко к равновесному, то есть потоки изнутри клетки и внутрь одинаковы. В этом случае потенциал покоя вычисляется по формуле:

$$\varphi = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_K[K_0] + P_{Na}[Na_0]}{P_K[K_i] + P_{Na}[Na_i]}, \quad (1.4)$$

где φ – разность потенциалов на мембране; F – число Фарадея; R – газовая постоянная; T – температура; P_K, P_{Na} – коэффициенты проницаемости для ионов K^+, Na^+ ; $[K_0], [Na_0]$ – концентрация ионов K^+, Na^+ на внешней стороне мембраны; $[K_i], [Na_i]$ – концентрация ионов K^+, Na^+ внутри мембраны.

Потенциал на мембране в состоянии покоя приближается к равновесному потенциалу для K^+ , так как проницаемость для K^+ в этих условиях значительно больше, чем для Na^+ ($P_K: P_{Na} = 1: 0,04$) [92, 93].

Более полно потенциал клетки высшего растения может быть описан с учетом вклада в его формирование других ионов, прежде всего Na^+ и Cl^- . Поэтому величина мембранного потенциала покоя для клеток растений может быть определена используя уравнение Гольдмана-Ходжкина-Катца, в котором учтена концентрация ионов и проницаемость мембраны:

$$\varphi = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_K[K^+]_{out} + P_{Na}[Na^+]_{out} + P_{Cl}[Cl^-]_{in}}{P_K[K^+]_{in} + P_{Na}[Na^+]_{in} + P_{Cl}[Cl^-]_{out}} \quad (1.5)$$

где R - универсальная газовая постоянная, равная 8,31 Дж/(моль·К); T - абсолютная температура; F - постоянная Фарадея, равная 96485,35 Кл·моль⁻¹; P_K, P_{Na}, P_{Cl} - коэффициенты проницаемости для ионов K^+, Na^+, Cl^- ; $[K^+]_{out}, [Na^+]_{out}, [Cl^-]_{out}$ - концентрация ионов K^+, Na^+, Cl^- на внешней стороне мембраны; $[K^+]_{in}, [Na^+]_{in}, [Cl^-]_{in}$ - концентрация ионов K^+, Na^+, Cl^- внутри мембраны.

Таким образом, на величину рассчитываемого с помощью уравнения Гольдмана-Ходжкина-Катца мембранного потенциала существенное влияние оказывает проницаемость мембраны для каждого из ионов, участвующих в формировании потенциала. Очевидно, что в величину потенциала наибольший вклад вносит тот ион, проницаемость мембраны для которого больше. Если коэффициенты проницаемости установлены (или подобраны правильно), то и величина рассчитываемого потенциала будет близка к величине измеряемого потенциала. Так, к примеру, натриевая проницаемость для клеток высших растений близка к калиевой: $\frac{P_{Na}}{P_K} = 0,68$ [21]. Согласно другим исследованиям растения могут иметь довольно низкую натриевую проницаемость $\frac{P_{Na}}{P_K} = 0,06$ [22].

Согласно уравнению Гольдмана-Ходжкина-Катца мембранный потенциал зависит от внешней температуры - с ростом температуры происходит увеличение мембранного потенциала.

Примем за постоянную в формуле (1.5):

$$C = \frac{R}{F} \ln \frac{P_K[K^+]_{out} + P_{Na}[Na^+]_{out} + P_{Cl}[Cl^-]_{in}}{P_K[K^+]_{in} + P_{Na}[Na^+]_{in} + P_{Cl}[Cl^-]_{out}} . \quad (1.6)$$

В результате получим уравнение, которое дает возможность оценить воздействие температуры на изменение мембранного потенциала:

$$\varphi = C_0 T. \quad (1.7)$$

Погрешность измерения потенциала $\Delta\varphi$ в зависимости от изменения температуры составит:

$$\Delta\varphi_i = C_0 \frac{\partial T}{\partial T} \Delta T = C_0 \Delta T , \quad (1.8)$$

а относительное значение изменения потенциала действия будет равно:

$$\delta\varphi_i = \frac{\Delta\varphi}{\varphi} 100\% = \frac{\Delta T}{T} 100\% . \quad (1.9)$$

Из уравнения (1.9) следует, что изменение температуры на $0,5^\circ\text{C}$ повлечет за собой изменение мембранного потенциала на 2%. Это говорит о том, что при оценке всхожести по мембранному потенциалу необходимо стабилизировать температурные условия с целью повышения точности контроля.

Таким образом, уравнение (1.5) позволяет определить мембранный потенциал, учитывая воздействие температуры, проницаемость оболочки зерна пшеницы, а также изменение концентрации на внешней и внутренней стороне оболочки.

Выводы

Проведен анализ методов оценки всхожести семян пшеницы. Методы, рекомендованные ГОСТ, а именно, метод проращивания семян и метод определения жизнеспособности [1,2] отличаются длительностью проведения исследования, трудоемкостью и применением опасных химических реагентов. Альтернативный метод контроля всхожести по изменению потенциала действия сокращает сроки анализа, прост в технической реализации, но не учитывает воздействие температуры на результаты исследования, что понижает достоверность данных.

Проведен анализ математических моделей изменения мембранного потенциала. Уравнение Нернста показывает, что концентрационный градиент ионов калия определяет величину мембранного потенциала покоя только в первом приближении. Расчетные значения равновесного мембранного потенциала совпадают с экспериментальными только при высокой концентрации калия вне клетки. Более точная величина мембранного потенциала растений может быть вычислена из уравнения Гольдмана-Ходжкина-Катца, в котором учитываются концентрации и проницаемость мембраны для трёх основных ионов на внешней поверхности оболочки зерна. Оба уравнения учитывают воздействие температуры на изменение мембранного потенциала, но последнее позволяет также определить мембранный потенциал, учитывая проницаемость оболочки зерна пшеницы, а также изменение концентрации на внешней и внутренней стороне оболочки, что может быть использовано в качестве модели контроля мембранного потенциала семян пшеницы, как показателя их всхожести.

2 РАЗРАБОТКА МОДЕЛИ КОНТРОЛЯ МЕМБРАННОГО ПОТЕНЦИАЛА

Экспериментальные исследования таких известных ученых, как Бос, Бердон-Сандерсон, Дюбуа-Реймон [9] показали, что электрические явления в растениях играют важную роль в процессах жизнедеятельности и заслуживают детального изучения.

Благодаря трудам А.Л. Ходжкина, А.Ф. Хаксли и Б. Катца, посвященным изучению механизма ионного обмена в обычном и в возбужденном состоянии мембраны гигантского аксона кальмара [13], было выявлено, что изменение мембранного потенциала зависит от нескольких факторов. Первым фактором, определяющим значение мембранного потенциала, является концентрация основных ионов внутри клетки и в окружающей среде, а также проницаемость клеточной мембраны. Вторым фактором является воздействие внешней температуры.

Таким образом, изменение мембранного потенциала зависит от температуры $\varphi = f(T)$ и от концентрации ионов с учетом коэффициентов проницаемости мембраны $\varphi = f(P_K[K^+], P_{Na}[Na^+], P_{Cl}[Cl^-])$.

Учитывая вышеперечисленные факторы, в качестве модели контроля мембранного потенциала семян пшеницы, как показателя их всхожести, выбрано уравнение Гольдмана-Ходжкина-Катца, которое позволяет учитывать воздействие температуры на изменение мембранного потенциала семян пшеницы, а также позволяет учитывать влияние внутренней и внешней концентрации ионов и ее коэффициентов проницаемости на значение мембранного потенциала.

Поскольку зерно пшеницы состоит из нескольких анатомических частей - оболочек, которые можно рассматривать в качестве мембраны, то уравнение Гольдмана-Ходжкина-Катца может быть применено для количественного описания мембранного потенциала семян пшеницы:

$$\varphi = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_K[K^+]_{out} + P_{Na}[Na^+]_{out} + P_{Cl}[Cl^-]_{in}}{P_K[K^+]_{in} + P_{Na}[Na^+]_{in} + P_{Cl}[Cl^-]_{out}} \quad (2.1)$$

где R - универсальная газовая постоянная; T - абсолютная температура; F - постоянная Фарадея; P_K, P_{Na}, P_{Cl} – коэффициенты проницаемости для ионов K^+, Na^+, Cl^- ; $[K^+]_{out}, [Na^+]_{out}, [Cl^-]_{out}$ – концентрация ионов K^+, Na^+, Cl^- на внешней стороне мембраны; $[K^+]_{in}, [Na^+]_{in}, [Cl^-]_{in}$ – концентрация ионов K^+, Na^+, Cl^- внутри мембраны.

Так как ранее установлено, что изменение температуры на $0,5^\circ C$ повлечет за собой изменение мембранного потенциала на 2%, согласно уравнению Гольдмана-Ходжкина-Катца, при оценке всхожести по мембранному потенциалу необходимо стабилизировать температурные условия с целью повышения точности контроля.

Исходя из уравнения Гольдмана-Ходжкина-Катца, значение мембранного потенциала зависит также от внутренней и внешней концентрации ионов, проницаемости оболочки.

Чтобы установить зависимость мембранного потенциала зерен пшеницы от соотношения концентрации ионов внутри и снаружи, необходимо провести ряд экспериментальных исследований с использованием дистиллированной воды и других внешних растворов разной концентрации для проращивания семян пшеницы, что в свою очередь позволит определить новые методы контроля мембранного потенциала и их применения для оценки качества семенного материала.

Применение дистиллированной воды на этапе проращивания зерен пшеницы при стабильных температурных условиях позволит проанализировать изменение внешней концентрации ионов. В данном случае в соответствии с уравнением (2.1) внешняя концентрация ионов определяется за счет ионов на внутренней стороне мембраны.

Уравнение (2.1) в данном случае принимает следующий вид:

$$\varphi = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_K[K^+]_{in} + P_{Na}[Na^+]_{in} + P_{Cl}[Cl^-]_{in}}{P_K[K^+]_{in} + P_{Na}[Na^+]_{in} + P_{Cl}[Cl^-]_{in}} = 0. \quad (2.2)$$

Таким образом, используя дистиллированную воду для проращивания семян, получаем, что с учетом коэффициентов мембранной проницаемости, согласно уравнению (2.2), значение мембранного потенциала равно нулю, что, в свою очередь, противоречит экспериментальным результатам. При экспериментальных исследованиях с использованием дистиллированной воды при проращивании семян наблюдаются высокие значения мембранных потенциалов.

Поскольку экспериментальные результаты не соответствуют теоретическим заключениям, необходимо внести поправки в уравнение (2.1).

Пусть на внутренней стороне мембраны зерен пшеницы концентрации ионов K^+ , Na^+ , Cl^- составляют соответственно $[K^+]_{in}$, $[Na^+]_{in}$, $[Cl^-]_{in}$. При коэффициентах проницаемости P_K, P_{Na}, P_{Cl} на внешней стороне мембраны концентрации ионов составят $P_K[K^+]_{in}$, $P_{Na}[Na^+]_{in}$, $P_{Cl}[Cl^-]_{in}$. Тогда на внутренней стороне мембраны концентрация ионов K^+ будет определяться: $[K^+]_{in} - P_K[K^+]_{in} = (1 - P_K)[K^+]_{in}$. Концентрация ионов Na^+ будет определяться: $[Na^+]_{in} - P_{Na}[Na^+]_{in} = (1 - P_{Na})[Na^+]_{in}$, а концентрации ионов Cl^- : $[Cl^-]_{in} - P_{Cl}[Cl^-]_{in} = (1 - P_{Cl})[Cl^-]_{in}$.

Для дистиллированной воды уравнение (2.1) примет вид:

$$\varphi = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_K[K^+]_{in} + P_{Na}[Na^+]_{in} + (1 - P_{Cl})[Cl^-]_{in}}{(1 - P_K)[K^+]_{in} + (1 - P_{Na})[Na^+]_{in} + P_{Cl}[Cl^-]_{in}}. \quad (2.3)$$

В числителе выражения, стоящего под знаком логарифма представлены концентрации $P_K[K^+]_{in}$, $P_{Na}[Na^+]_{in}$, но $(1 - P_{Cl})[Cl^-]_{in}$, а в знаменателе - $(1 - P_K)[K^+]_{in}$, $(1 - P_{Na})[Na^+]_{in}$, но $P_{Cl}[Cl^-]_{in}$, так как ионы хлора отрицательно заряжены.

Данное уравнение формально позволяет вычислить и сравнить значения мембранного потенциала зерен пшеницы, проницаемости их мембран и концентрацию ионов.

Однако воспользоваться уравнением (2.3) для определения коэффициентов проницаемости и концентрации ионов невозможно, так как в уравнении содержится 6 неизвестных. Следовательно, должно быть не менее 6 уравнений.

Дополнительные уравнения можно составить, если будут известны внешние концентрации $[K^+]_{out}$, $[Na^+]_{out}$, $[Cl^-]_{out}$. Тогда с учетом внешних концентраций и вышеприведенных рассуждений о проницаемости ионов K^+ , Na^+ , Cl^- уравнение (2.4) примет вид:

$$\varphi = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_K K_{in} + (1 - P_K) K_{jout} + P_{Na} Na_{in} + (1 - P_{Na}) Na_{out} + (1 - P_{Cl}) Cl_{in} + P_{Cl} Cl_{jout}}{(1 - P_K) K_{in} + P_K K_{jout} + (1 - P_{Na}) Na_{in} + P_{Na} Na_{out} + P_{Cl} Cl_{in} + (1 - P_{Cl}) Cl_{jout}}, \quad (2.4)$$

где K_{jout} , Cl_{jout} - концентрации ионов в солевом растворе, используемом при проращивании зерен пшеницы, Na_{out} - концентрация ионов во внешнем растворе, используемом при проращивании зерен пшеницы, j – номер солевого раствора с заданной концентрацией.

Таким образом, модифицированное уравнение (2.4) позволяет учитывать воздействие температуры на изменение мембранного потенциала семян пшеницы, а также определить зависимость всхожести семян пшеницы от концентрации ионов на внутренней оболочке и ее проницаемости.

Изменение мембранного потенциала с учетом воздействия внешней температуры и использования дистиллированной воды, а также разных растворов при проращивании может выступать как основной отличительный признак с целью оценки всхожести семенного материала пшеницы.

Выводы

В качестве модели контроля мембранного потенциала, как показателя всхожести семян пшеницы, выбрано уравнение Гольдмана-Ходжкина-Катца, которое позволяет учитывать воздействие температуры на изменение мембранного потенциала зерен пшеницы, а также определить зависимость всхожести семян пшеницы от концентрации ионов на внешней и внутренней оболочках и ее проницаемости.

Изменение мембранного потенциала семян пшеницы может выступать как основной отличительный признак с целью оценки всхожести семенного материала пшеницы.

Поскольку экспериментальные результаты не соответствовали теоретическим выводам, в уравнение Гольдмана-Ходжкина-Катца были внесены поправки. Используя модифицированное уравнение Гольдмана-Ходжкина-Катца, можно определять концентрации ионов K^+ , Na^+ , Cl^- на внутренней стороне оболочки и ее коэффициенты проницаемости, используя внешние растворы разной концентрации.

3 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для исследования зависимости мембранного потенциала семян пшеницы от их всхожести было разработано средство контроля, которое позволяет исключить воздействие температуры на изменение мембранного потенциала, а, следовательно, повысить точность измерения.

Были проведены многократные экспериментальные исследования изменения мембранного потенциала семян пшеницы с изменением температуры при проращивании, а также с использованием дистиллированной воды и растворов KCl разной концентрации при стабильных температурных условиях.

3.1 Описание средства контроля мембранного потенциала зерен пшеницы, как показателя их всхожести

Разработанное средство контроля мембранного потенциала семян пшеницы представляет собой экспериментальную установку с возможностью регулирования начальной температуры при подготовке зерен к эксперименту и проведения измерений мембранного потенциала.

Экспериментальная установка состоит из двух частей: герметичной термокамеры, которая позволяет поддерживать заданную начальную температуру, и измерительного блока для измерения мембранного потенциала семян пшеницы (рисунок 3.1).

В состав измерительного блока входят плата сбора данных LA-50USB, два стальных измерительных электрода, программное обеспечение для регистрации сигнала, конвертирования данных в необходимый формат.

Термокамера представляет собой каркас, выполненный из ДСП толщиной 16 мм, обшитый пластиком с внутренней стороны. Все внутренние швы и стыки для герметичности камеры промазаны силиконовым герметиком «Виом -

5». Лицевые отверстия для рук по диаметру были полакированы лаком для дерева «Универсал – Д» с целью обеспечения влагонепроницаемости ДСП.

Между собой плиты ДСП крепятся на клей и саморезы с колпачком. Пластиковые панели крепятся к ДСП на клей.

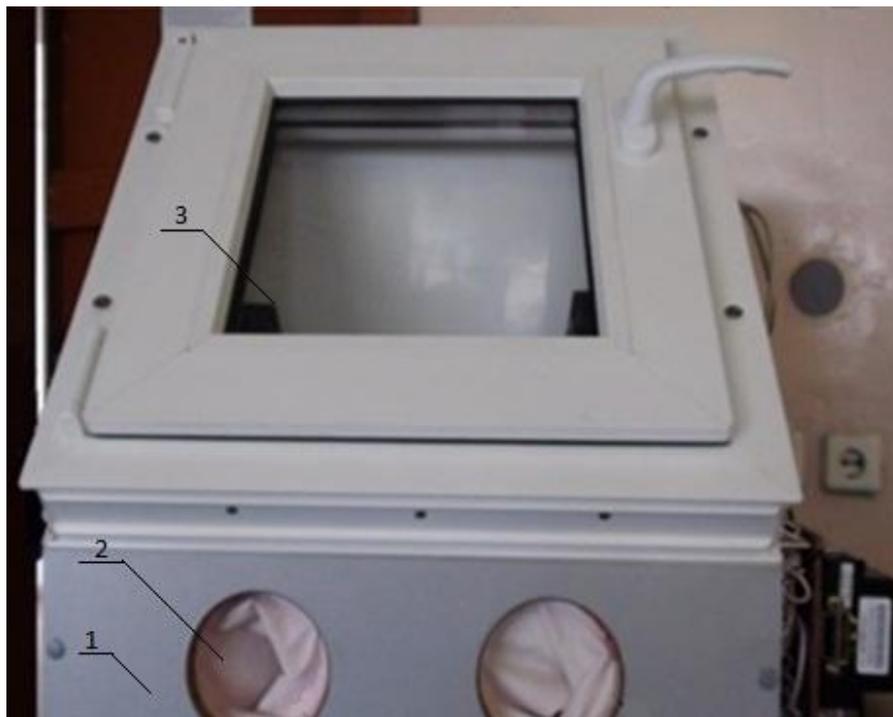
Верхний проем экспериментальной установки закрыт пластиковым окном размерами 480х490х58мм.

Для поддержания начальной температуры в заданных пределах внутри экспериментальной установки используется терморегулятор «ОВЕН 2ТРМ1», к которому подключены две термопары.

В качестве нагревательного элемента выбран остеклованный резистор марки С5-36 Вт, управляющие сигналы на который поступают через твердотельное реле, включаемое с помощью терморегулятора ОВЕН 2ТРМ1 [84].

Внутри термокамеры по обе стороны установлены вентиляторы для равномерной циркуляции воздуха. В качестве источников освещения были встроены в установку две светодиодные матрицы. Контроль над освещением и циркуляцией воздуха внутри установки осуществляется двухкнопочным выключателем, находящимся на боковой панели снаружи экспериментальной установки.

На рисунке 3.1 изображена экспериментальная установка вид спереди.



1 - каркас установки; 2 - отверстия для рук с резиновыми перчатками;
3 - пластиковое окно

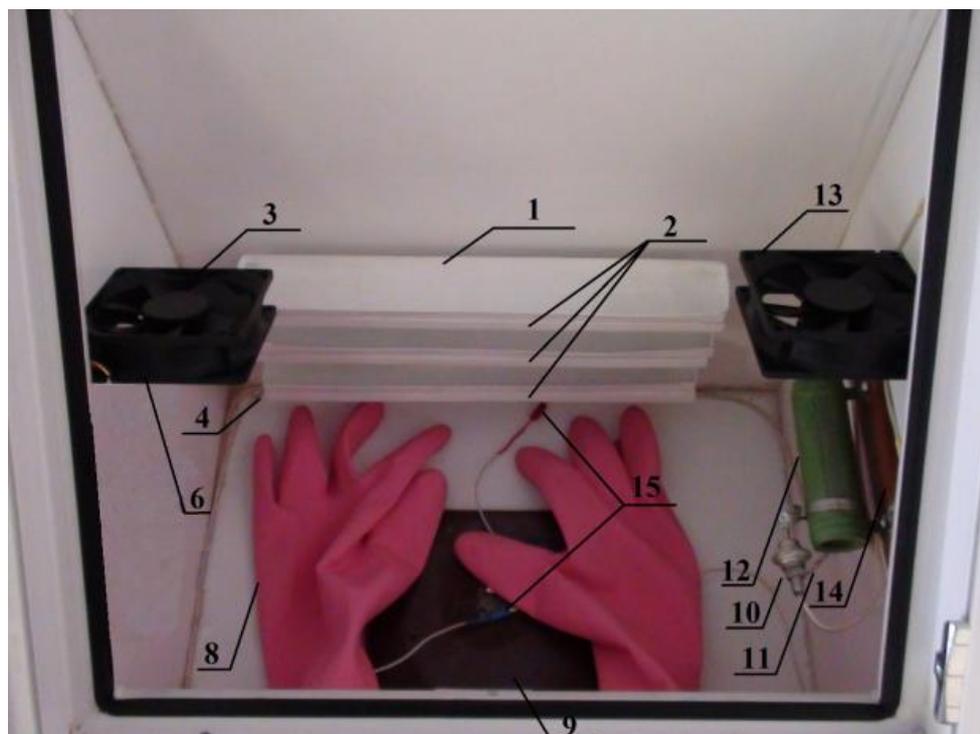
Рисунок 3.1 – Экспериментальная установка. Вид спереди

Для проведения экспериментальных работ внутри установки предусмотрены отверстия для рук с закрепленными на них резиновыми перчатками. Использование перчаток позволяет предотвратить влияние статического электричества на руках человека при измерении мембранного потенциала зерна. Пластиковое окно предназначено для герметичного закрывания проема и наблюдения за проведением эксперимента.

Внутри экспериментальной установки закреплены три специальных полки для пластиковых лотков с семенами. Пластиковые лотки, размером 300x35x20 мм, предназначены для размещения ячеистых поролоновых форм с целью предотвращения протекания воды (в один лоток помещаются две формы).

Стальные измерительные электроды, расположенные на текстолитовой площадке, предназначены для измерения изменения мембранного потенциала зёрен пшеницы.

На рисунке 3.2 представлен вид сверху экспериментальной установки.



1 – Пластмассовый лоток; 2 - Пластиковые полочки; 3 – Вентилятор для конвекции воздуха внутри установки; 4 – Горячий спай термопары; 8 – Резиновые перчатки; 9 – Текстолитовая площадка, предназначенная для проведения замеров; 10 – Диод, служащий для понижения напряжения; 11 - Горячий спай термопары; 12 – Остеклованный резистор; 13 – Вентилятор для конвекции воздуха внутри установки; 14 – Текстолитовая площадка; 15 – Измерительные щупы

Рисунок 3.2 – Экспериментальная установка. Вид сверху

На рисунке 3.3 изображена экспериментальная установка, вид справа.



1 - двухкнопочный выключатель; 2 - плата сбора данных «ЛА–50USB; 3 – розетка; 4 - блок питания; 5 - кабель USB; 6 - автомат S231R C10; 7 - ОВЕН 2ТРМ1; 8 - реле 600DSKY RK307 ALT установленное на релейную базу PF 113В-Е

Рисунок 3.3 – Экспериментальная установка. Вид справа

Для света и вентиляторов внутри установки используется блок питания на 12В. Автомат S231R C10 предназначен для отключения питания при замыкании цепи. ОВЕН 2ТРМ1 предназначен для программирования режима работы электрооборудования во всех проводимых работах. Реле 600DSKY RK307 ALT установленное на релейную базу PF 113В-Е предназначено для включения остеклованного резистора при поступлении управляющего сигнала с ОВЕН 2ТРМ1.

В качестве внешнего устройства для первичной обработки входных сигналов выбрана плата сбора данных ЛА–50USB, которая позволяет преобразовывать непрерывные аналоговые входные сигналы в цифровую форму для последующего изучения и обработки сигнала при помощи ПК

Передача данных от платы сбора данных «ЛИА–50USB» к персональному компьютеру осуществляется по кабелю USB.

Разработанная экспериментальная установка позволяет в автоматическом режиме поддерживать температуру в диапазоне от 18°C до 30°C, $\Delta T = 0,1^\circ\text{C}$. Температура поддерживается в течение 12 часов, при этом не требуется дополнительное участие оператора системы. Диапазон измерения мембранного потенциала составляет от 20 мВ до -200 мВ, $\Delta\phi = 2\%$. Калибровка средства контроля осуществлялась с помощью двух магазинов сопротивления P4831 класса точности 0,02, источником напряжения выступал калибратор П320 (погрешность калибратора 0,04%).

3.2 Методика проведения экспериментального исследования

Для контроля мембранного потенциала семян пшеницы, как показателя их всхожести, разработана экспериментальная установка, позволяющая проводить многократные измерения мембранного потенциала при установленных начальных температурных условиях.

Метод контроля включает в себя три основных этапа:

Первый этап – это подготовка семян пшеницы к проведению исследований путем замачивания их в дистиллированной воде или в определенном растворе при установленной начальной температуре.

Второй этап – это измерение мембранного потенциала зерен пшеницы с помощью измерительных электродов.

Заключительный этап – это обработка полученных данных с применением статистических методов анализа, оценка всхожести.

Перед проведением экспериментального исследования семена пшеницы замачивают в дистиллированной воде, исключая воздействие внешней концентрации на значение мембранного потенциала или наоборот в

специальном растворе (в экспериментальных исследованиях используется раствор KCl).

Для экспериментального исследования используется 150 зерен пшеницы (по методу, описанному в ГОСТ 12038-84, анализируется 4 партии по 100 зерен). Зерна раскладывают на фильтровальной бумаге (либо используется прокаленный песок) на расстоянии не менее 15 мм между зерновками. В исследуемом методе используется альтернативный вариант размещения семян на ячеистой поролоновой форме (рисунок 3.4) размером 150x20x20 мм, которая хорошо впитывает и удерживает влагу, позволяет проводить многократные эксперименты, сокращая тем самым расходы на бумагу и песок. Поролоновые формы тщательно промываются перед использованием, сушатся.

В каждую ячейку поролоновой формы выкладывается по одной зерновке на расстоянии 10 мм. В одной поролоновой форме помещается 25 зерновок.

Затем формы помещаются в пластиковые лотки для предотвращения протекания (в один лоток помещаются две формы) и заливаются дистиллированной водой в объеме 150 мл.



Рисунок 3.4 – Размещение зерен на специальной ячеистой поролоновой форме

Для проведения одного эксперимента подготавливаются три пластиковых лотка, в каждый из которых помещается по 2 поролоновые формы с зернами, пропитанные раствором или дистиллированной водой.

Перед проведением экспериментального исследования необходимо подготовить к работе средство контроля, которое состоит из термокамеры,

платы сбора данных ЛА-50USB, измерительных стальных электродов, а также программного обеспечения для управления режимом работы платы сбора данных, регистрации изменения мембранного потенциала семян пшеницы и конвертирования данных в нужный формат для дальнейшей обработки.

Подготовка разработанного средства контроля состоит из установки начальной температуры на терморегуляторе ОВЕН 2ТРМ1 и установка программного обеспечения платы сбора данных ЛА-50USB для дальнейшей регистрации мембранного потенциала (установку программного обеспечения нужно выполнить один раз).

Плата сбора данных к персональному компьютеру подключается с помощью USB-кабеля.

Так как источник сигнала удален на расстояние менее полутора метров, то применяется однополюсное соединение с разъемами аналогового входа. Провод может быть подключен к любому из первых 16 контактов (AIN 1 – AIN 16). Аналоговая земля – это контакты 17–20 (рисунок 3.5).

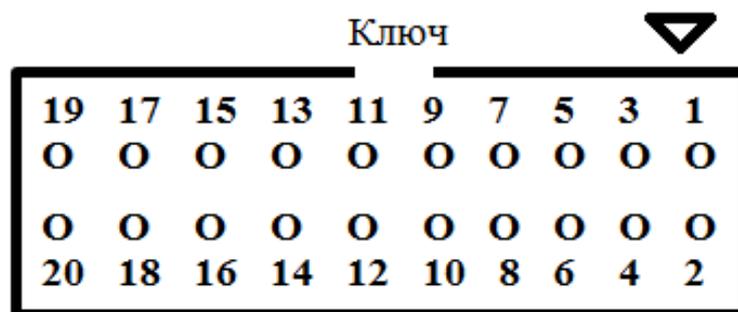


Рисунок 3.5 – Разъемы аналогового входа платы сбора данных ЛА-50USB

Все остальные свободные аналоговые входы заземлены, что позволит устранить наводку помех со стороны неподключенных каналов. Если свободные каналы оставить без заземления, то на входе аналого-цифрового преобразователя будет возникать дополнительный шум вследствие прохождения сигнала через мультиплексор, который, в свою очередь, ухудшает

соотношение сигнал-шум и, следовательно, приводит к сокращению количества эффективных разрядов для сигналов в используемых каналах.

После подготовки экспериментальной установки формы помещаются в термокамеру на 12 часов с установленной начальной температурой (рисунок 3.6).



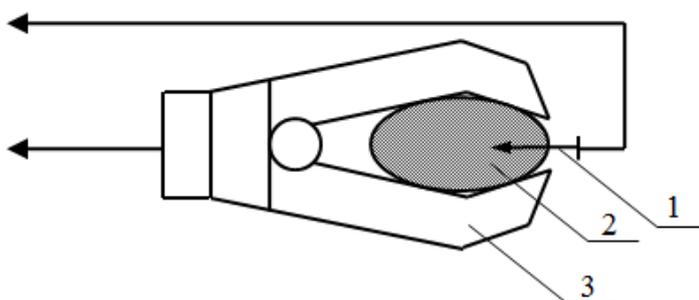
Рисунок 3.6 – Экспериментальная установка

По истечении указанного времени проводится измерение мембранного потенциала семян пшеницы. Регистрация показаний осуществляется с помощью системы сбора и обработки данных *Saver*.

При измерении мембранного потенциала семян пшеницы используется монофазное отведение мембранного потенциала, то есть электрод-игла является измерительным электродом (активным), а электрод-держатель является пассивным электродом, который находится в контакте с поверхностью зерновки и является электродом сравнения.

Измерение мембранного потенциала семян пшеницы происходит следующим образом. По истечении 12 часов каждое зерно по очереди достают руками в перчатках из поролоновой формы и устанавливают вертикально хохолком кверху в электрод-держатель, который выполнен в виде зажима.

Второй электрод выполнен в форме тонкой иглы. Данным электродом протыкается зерновка, игла помещается в одну из семядолей зерна. Измерительные электроды выполнены из стали. Электрод-иглу следует вводить непосредственно в зародыш корешка и стебля на глубину 2 мм, т.к. при проращивании здесь образуется наиболее мягкое место для введения электрода, что в свою очередь обеспечивает свободное прокалывание зерна. При введении иглы с брюшной или спинной сторон зерно рассыпается.



1 – электрод-игла; 2 – зерно; 3 – электрод-зажим.

Рисунок 3.7 – Держатель зерна с измерительными электродами

В процессе измерения мембранного потенциала зерна пшеницы, осуществляется сбор данных, поступающих на ПК.

Перед началом работы с платой сбора данных необходимо поставить с установочного диска драйвер платы, а также необходимо установить специальное программное обеспечение, позволяющее осуществлять сбор (программа Saver) и последующую обработку (программа Converter) полученных данных. Установочный диск идет в комплекте вместе с прибором.

С помощью программы Saver проводится конфигурирование всех параметров измерительного прибора ЛА-50USB, а также происходит регистрация сигналов в режиме реального времени, одновременно записывая все данные на жесткий диск персонального компьютера, согласно указанной папки.

Перед проведением измерения необходимо на вкладке «Параметры платы» выбрать из списка «LA-50USB» и указать базовый адрес канала. Установка параметров изображена на рисунке 3.8.

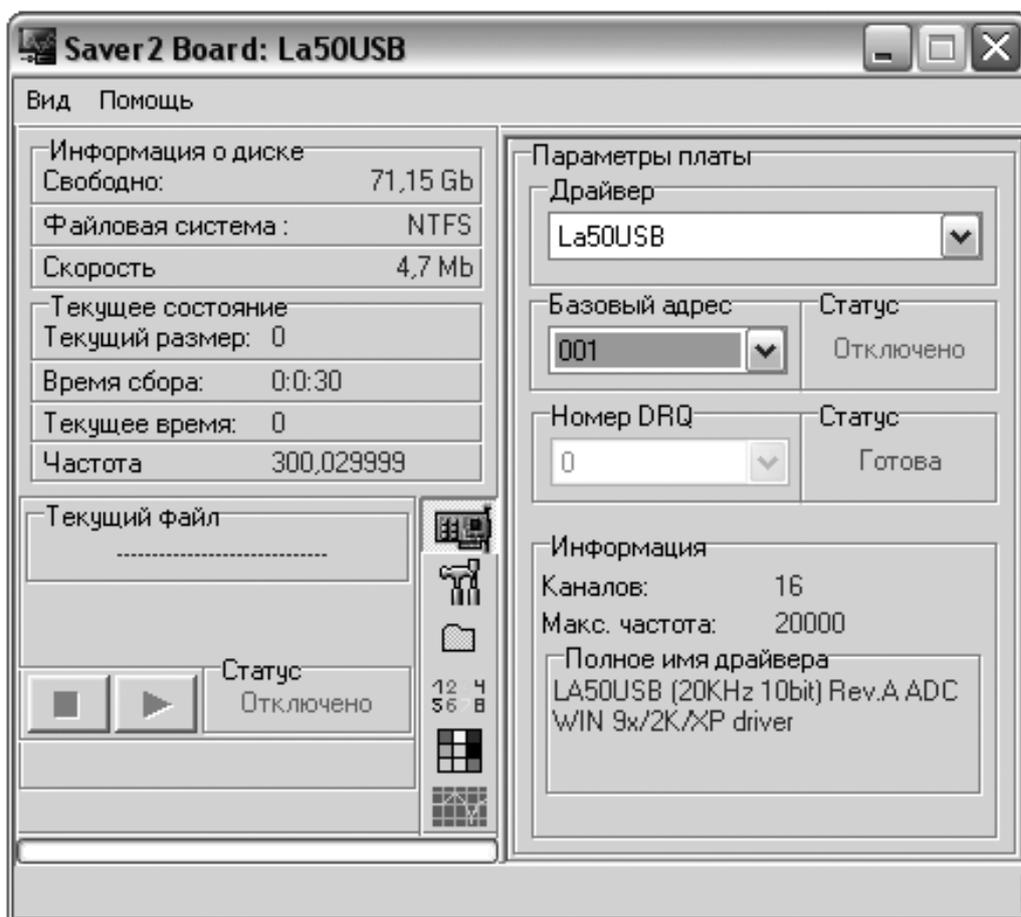


Рисунок 3.8 – Вкладка программы Saver «Параметры платы»

Следующим шагом необходимо установить на вкладке «Параметры измерений» значение частоты дискретизации (устанавливаем 300 Гц), затем снимаем все галочки с полей, как изображено на рисунке 3.9.

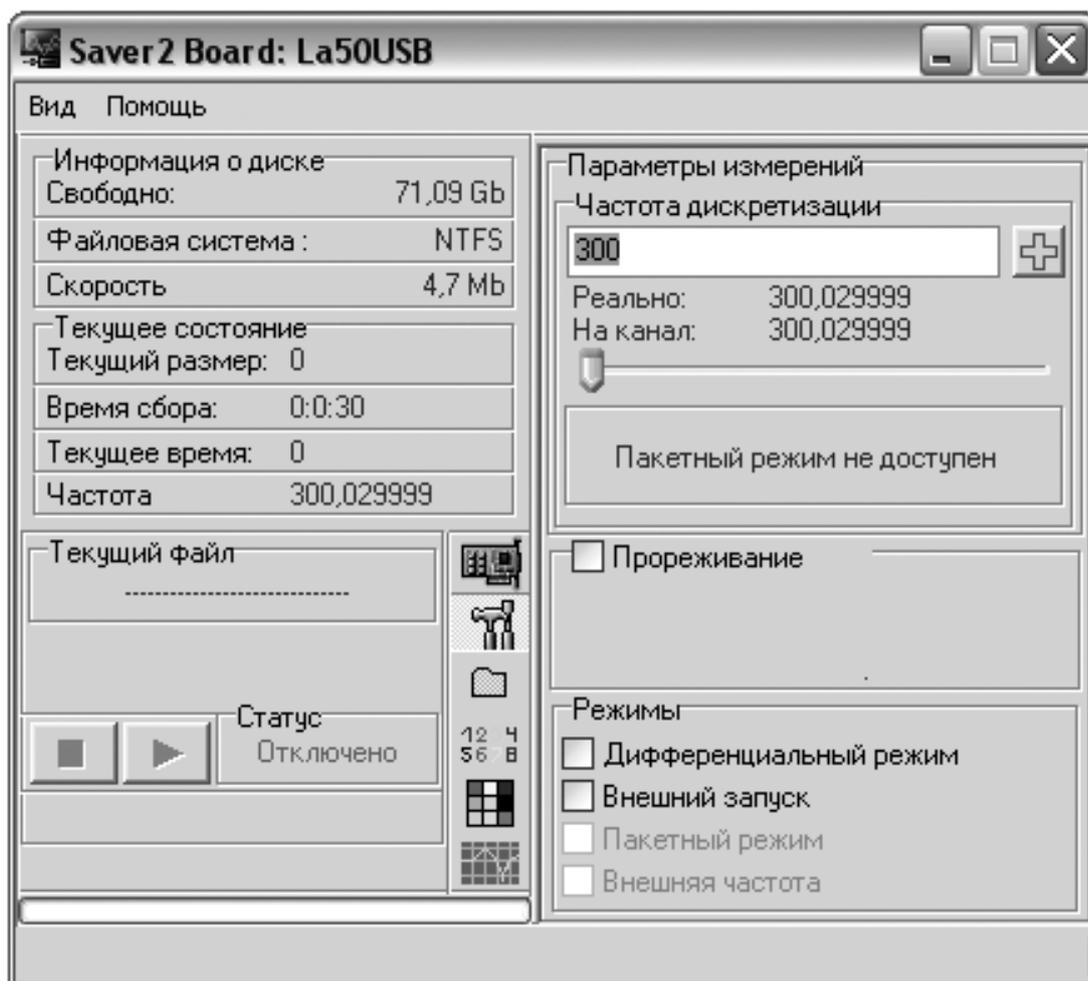


Рисунок 3.9 – Вкладка программы Saver «Параметры измерений»

Установленная частота обеспечивает запись процесса изменения мембранного потенциала с высокой точностью.

Настройку режима работы платы сбора данных необходимо завершить указанием папки, куда будут сохраняться результаты измерения, а также необходимо установить время сбора данных. В данном случае время сбора данных с аналогового входа платы продолжается 3 секунды после старта, затем автоматически останавливается, после чего сигнал сохраняется в папку. Такого ограничения по времени достаточно, так как анализируется начальное значение мембранного потенциала. На рисунке 3.10 показаны настройки вкладки «Параметры файлов».

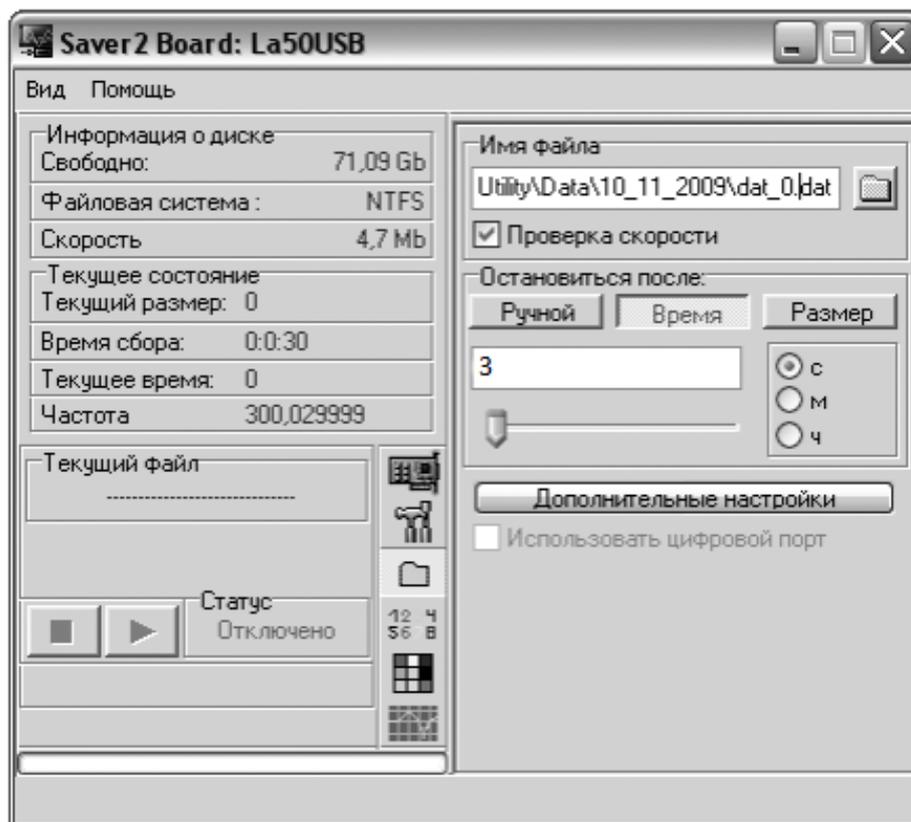


Рисунок 3.10 – Вкладка программы Saver «Параметры файлов»

Каждый раз после завершения измерений при выходе из программы (если программы без ошибок сохранила последний результат) конфигурация записывается в специальный файл Saver2.cfg. И при следующей загрузке программы произойдет проверка на наличие данного файла с конфигурацией, и, если он имеется, то программа считывает оттуда все необходимые настройки. В другом случае будут восстановлены настройки по умолчанию, и нужно будет установить все заново.

Процедура измерения мембранного потенциала предварительно подготовленных к исследованию семян пшеницы заключается в следующем:

1. Сначала необходимо установить подготовленную зерновку в электрод-держатель (устанавливаем вертикально, хохолком вверх).

2. Затем настроенной программой Saver необходимо запустить сбор данных с аналогового входа платы сбора данных.
3. Электродом, выполненном в виде иглы, необходимо проткнуть одну из семядолей сверху вниз.
4. Сбор данных с аналогового входа платы длится 3 секунды, затем останавливается, и сигнал записывается в папку.
5. После этого зерновка удаляется из электрода-зажима. Электрод-игла и электрод-зажим протираются чистой бумажной салфеткой, удаляются остатки проростков, если таковые имеются.
6. Данные записываются в файл в формате .dat с помощью программы Saver. Затем сформированный файл конвертируется в формат MS Excel, используя установленную программу Converter (программа идет в комплекте с платой сбора данных).

Перед конвертированием данных из .dat формата в .csv необходимо установить нужные параметры (рисунок 3.11).

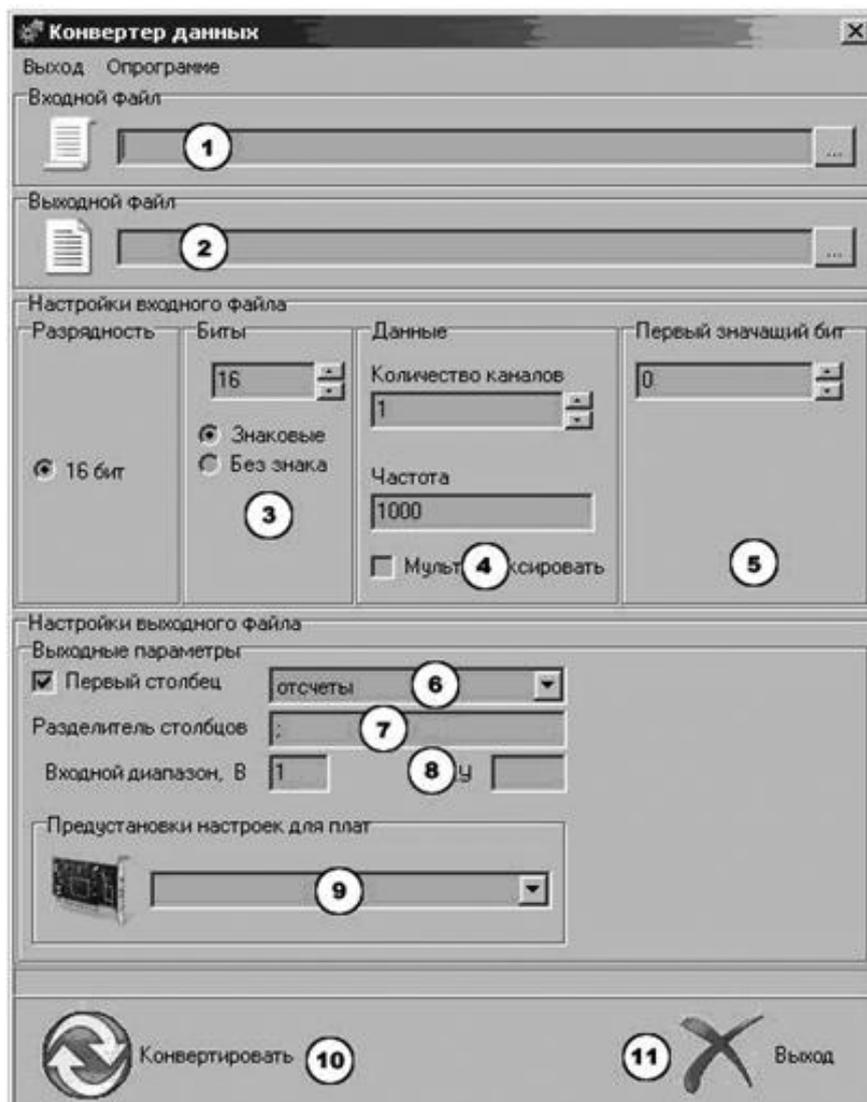


Рисунок 3.11 – Разъемы аналогового входа платы сбора данных

Для конвертирования необходимо выполнить действия, описанные ниже.

Задать входной файл в поле «1» (при этом можно прописать путь к файлу или выбрать его через диалоговое окно, щелкнув по кнопке справа).

Задать выходной файл в поле «2» (при этом можно прописать путь к файлу или выбрать его через диалоговое окно, щелкнув по кнопке справа).

В группе настроек «3» установить количество битов на одно измерение и формат представления результата.

В поле «4» указать количество каналов равное 1 и частоту дискретизации 300.

В блок под номером «5» задать первый значащий бит равный нулю.

«6» - здесь нужно снять галочку с «Первый столбец».

В поле «7» настроить разделитель столбцов. Для конвертирования в формат CSV файла нужно задать «;» (точка с запятой).

В группе полей «8» нужно задать входной диапазон платы. Коэффициент усиления необходимо задать равным единице, а входной диапазон равным десяти.

Группу под номером «9» с выбором предустановок параметров плат оставить пустым.

По кнопке «Конвертировать» запускается конвертирование данных.

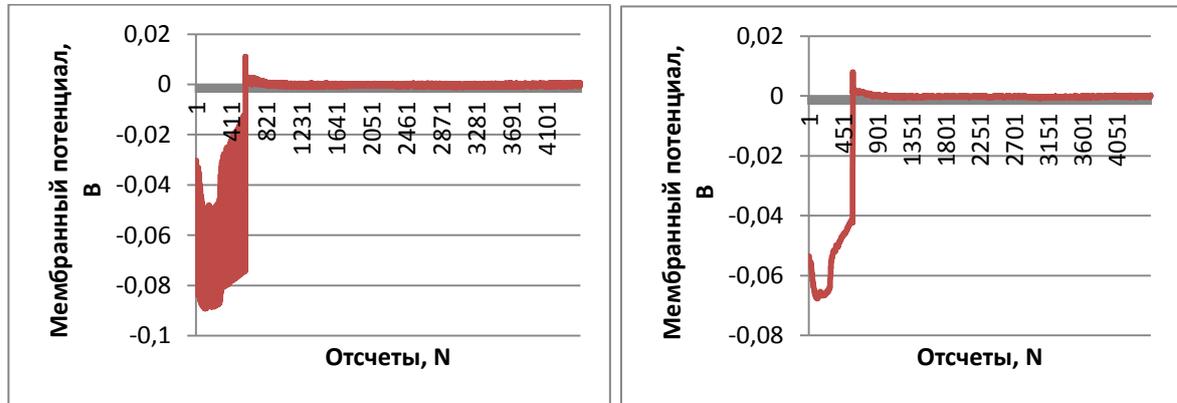
3.3 Статистический анализ полученных экспериментальных данных

Контроль мембранного потенциала семян пшеницы одной партии осуществляется по 150 зернам. Из 150 полученных сигналов до 30% в среднем исключаются, так как они не соответствуют обобщенной типичной форме, что может быть вызвано ошибками оператора (неудачный прокол, зерно пшеницы разрушилось, не записали сигнал), а также вследствие присутствия легковесных и пустых семян в исследуемой партии.

Подтверждение достоверности полученных данных проводится с применением доверительных интервалов и проверки гипотезы распределения Пуассона.

Так как в регистрируемых сигналах присутствует высокий уровень шума, снизить уровень шума, а тем самым и значение доверительного интервала позволяет метод низкочастотной фильтрации.

Отфильтрованный сигнал показан на рисунке 3.12б. Использование низкочастотной фильтрации позволило снизить уровень шума до 1 мВ.

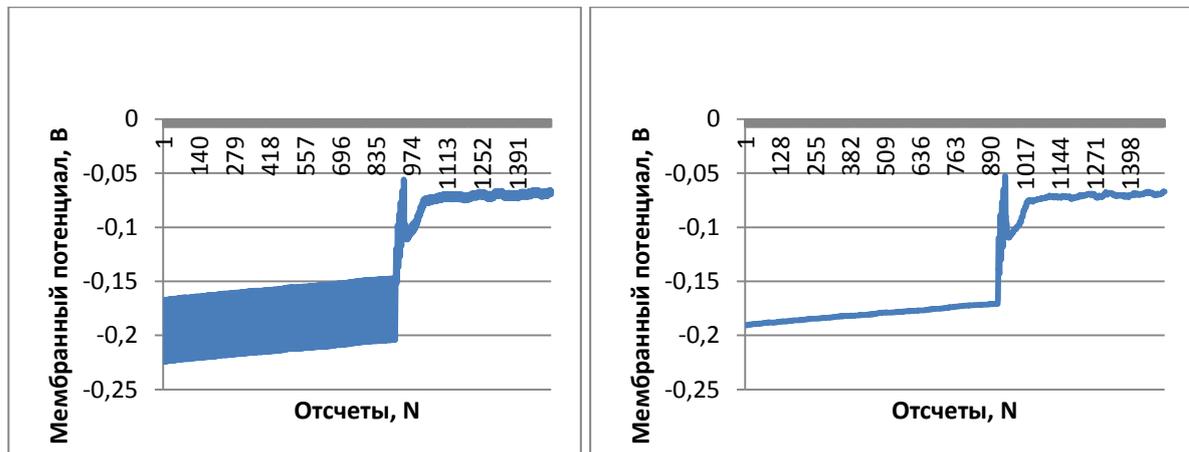


а)

б)

Рисунок 3.12 – Изменение мембранного потенциала зерна пшеницы со всхожестью 97%: а - исходный сигнал; б – отфильтрованный сигнал

На рисунке 3.13 показана типичная форма сигнала для зерен пшеницы со всхожестью 87%, замоченных дистиллированной водой.



а)

б)

Рисунок 3.13 – Изменение мембранного потенциала зерен пшеницы со всхожестью 87%: а - исходный сигнал; б – отфильтрованный сигнал

Алгоритм низкочастотной фильтрации заключается в следующем анализе.

Определяем размер исследуемой зоны:

$$N = (c - a) + 1, \quad (3.1)$$

где N – количество произведенных измерений; a, c – значения неизменного периода модулирующей функции $K(x)$, соответствующей T -элементам в пределах произведенных измерений.

Затем задаем частоту выборки:

$$f_c = \frac{1}{p}, \quad (3.2)$$

где f_c – частота выборки; p – расстояние между центрами выборок.

Обозначив определенное число измерений через A , сумма выборок в зоне группы N будет определяться целым числом от деления $\frac{N}{A}$.

Таким образом, получаем:

$$R_B = \frac{N}{A}, \quad (3.3)$$

Обозначим Q_{mi} -ое значение измерения через массив Q_{mi} . Тогда отфильтрованный и скомпенсированный сигнал Q_j будет равен сумме измерений, распределенных по апертуре A :

$$Q_j = \frac{1}{A} \sum Q_{mi}, \quad (3.4)$$

где Q_j – скомпенсированный сигнал; A – количество измерений; Q_{mi} - массив значений измерения; j – номер выборки; $j = 1, 2 \dots R_B$.

В формуле определяем границы. Нижняя граница первой выборки начинается с a -ого измерения. В следующей выборке номер первого элемента будет дублироваться через период p , тогда нижняя граница суммы Q_j -ой выборки равна:

$$i_H = a + (j - 1)p, \quad (3.5)$$

где i_H – нижняя граница выборки.

Верхняя граница суммы первой выборки завершается элементом выборки $(a + A - 1)$, который, в свою очередь, дублируется через период p . Таким образом, верхняя граница выборки равна:

$$i_B = (a + A - 1) + (j - 1)p, \quad (3.6)$$

где i_B – верхняя граница выборки.

Окончательно алгоритм низкочастотной фильтрации запишется в виде:

$$Q_j = \frac{1}{A} \sum_{i_H}^{i_B} Q_{mi}. \quad (3.7)$$

В качестве контрольной точки было выбрано значение мембранного потенциала в начальный момент времени.

Исследуемые значения мембранного потенциала имеют распределение Пуассона при уровне значимости 0,05.

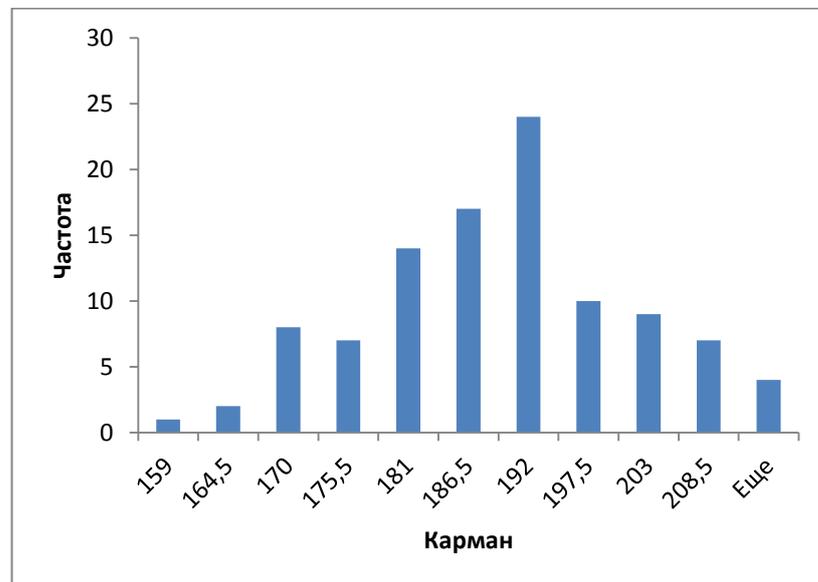


Рисунок 3.14 – Гистограмма распределения результатов измерения мембранного потенциала зерен пшеницы со всхожестью 87%

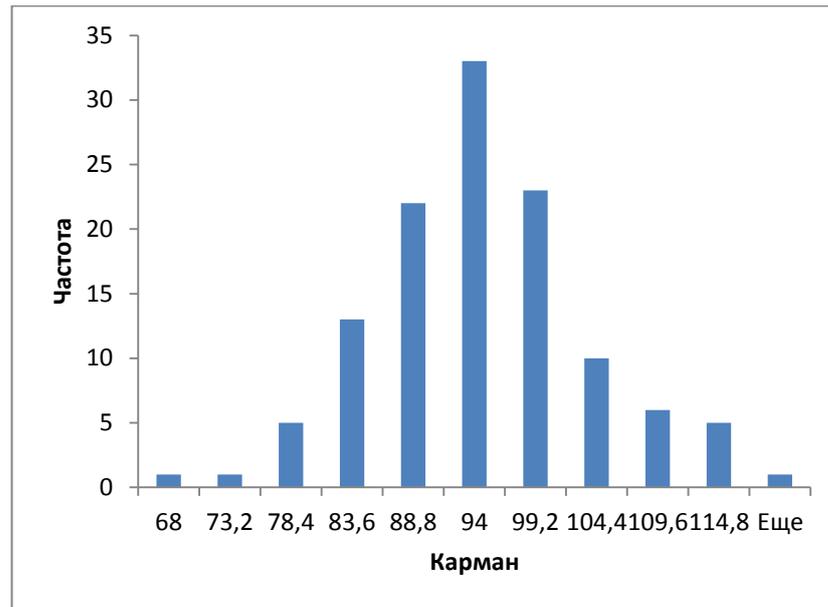


Рисунок 3.15 – Гистограмма распределения результатов измерения мембранного потенциала зерен пшеницы со всхожестью 93%

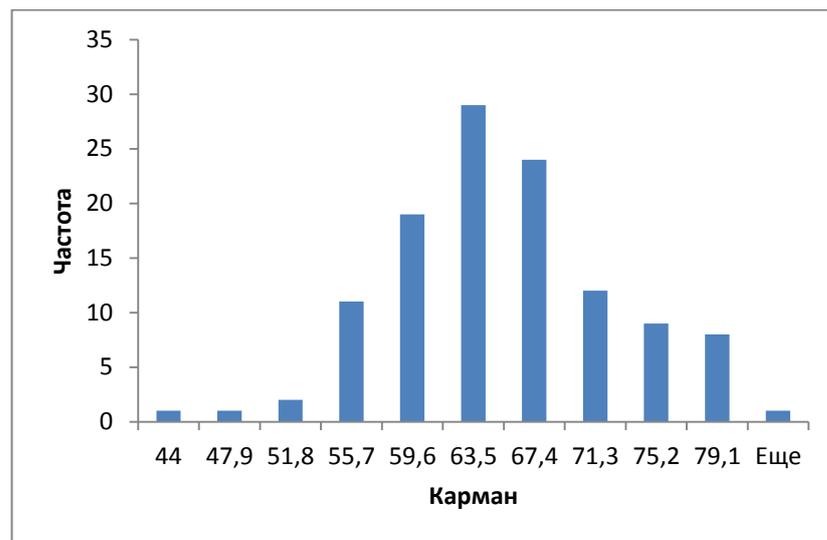


Рисунок 3.16 – Гистограмма распределения результатов измерения мембранного потенциала зерен пшеницы со всхожестью 97%

С помощью критерия согласия Хи-квадрат Пирсона была осуществлена проверка закона распределения.

Из n значений ($n > 50$) оценивают среднее \bar{X} и стандартное отклонение S , а затем разбивают n значений на $m\sqrt{n}$ классов.

Для каждого полученного класса определяют абсолютную частоту h попавших в него значений и сопоставляют ее с теоретической частотой h_t . Из эмпирических и теоретических частот составляют выражение:

$$\chi^2 = \sum_{n=1}^m \frac{(h_i - h_{ti})^2}{h_{ti}}, \quad (3.8)$$

где m – количество классов; h_t – теоретическая частота; h – абсолютная частота.

Найденное выражение будет следовать хи-квадрат распределению с $m - k$ степенями свободы. Где m – количество классов, а k представляет число параметров, необходимых для описания выборки. Для нормального распределения $k = 3$ (среднее, стандартное отклонение и объем выборки), для распределения Пуассона $k = 2$ (среднее и объем выборки). Исходя из уровня значимости α и числа степеней свободы находим критическую точку.

Если при проверке получается, что $\chi^2 > \chi_{кр}^2$, то проверяемая гипотеза отбрасывается; между эмпирическим и теоретическим распределением существует значимое различие. Различие не значимо, если $\chi^2 < \chi_{кр}^2$. Условием использования критерия “хи-квадрат” является достаточно большое число измерений ($n > 50$).

Оценку средних значений проводили с помощью определения доверительных интервалов для параметра $\lambda = \varphi$ распределения Пуассона по формуле:

$$\left((\sqrt{\lambda} - \frac{x_\alpha}{2\sqrt{n}})^2, (\sqrt{\lambda} + \frac{x_\alpha}{2\sqrt{n}})^2 \right), \quad (3.9)$$

где λ – точечная оценка параметра распределения Пуассона, равная среднему значению ($\lambda = \varphi$); x_α – квантиль уровня $1 - \frac{\alpha}{2}$ стандартного нормального распределения; n – объем выборки.

3.4 Результаты экспериментального исследования мембранного потенциала семян пшеницы с использованием уравнения Гольдмана-Ходжкина-Катца

Для экспериментальных исследований использовались следующие сорта мягкой пшеницы: Алтайский янтарь, Омская 28, Алтайский янтарь, Алтайская 88.

Экспериментально установлено, что значения мембранного потенциала для зерен пшеницы, пророщенных с использованием дистиллированной воды, с высокой и низкой всхожестью отличаются между собой при одинаковых температурных условиях [98].

Известно, что семена пшеницы по посевным качествам подразделяются на три класса, учитывая всхожесть и чистоту. Первый класс семян пшеницы характеризуется высокой всхожестью – 95% и более, второй класс присваивается при всхожести семян в 92% и более, а третий класс содержит границу всхожести семян пшеницы в 90%. Семена со всхожестью ниже 90% являются некондиционными.

Чем ниже всхожесть семян пшеницы, тем выше норма высева. Если использовать для высева семена с максимально достоверной всхожестью, то можно сэкономить в будущем тысячи тонн зерна.

Зная граничные значения для экспериментальных исследований, выбраны семена со всхожестью 87% (некондиционные семена), 90%, 92%, 95% и 97%.

Таблица 3.1 – Значения мембранного потенциала при использовании дистиллированной воды для зерен пшеницы различной всхожести

Всхожесть, %	Значение мембранного потенциала, мВ	Доверительный интервал, мВ
97%	-64	(-65,58;-62,44)
95%	-76	(-77,55;-74,47)
92%	-105	(-107,02;-103,00)
90%	-125	(-127,25;-122,87)
87%	-187	(-189,81;-184,52)

Это объясняется тем, что проницаемость оболочки для зерен пшеницы высокой всхожести 97% выше, чем для зерен пшеницы с низкой всхожестью 87%. Внутренняя концентрация ионов для зерен пшеницы высокой всхожести 97% выше, чем для зерен пшеницы с низкой всхожестью 87%.

Из уравнения Гольдмана-Ходжкина-Катца следует, что на результаты мембранного потенциала влияет как изменение температуры, так и изменение концентрации ионов на внешней стороне оболочки зерна.

Использование дистиллированной воды для замачивания зерен обеспечивает нулевую концентрацию ионов на внешней стороне оболочки зерна. С течением времени соотношение концентраций ионов внутри и снаружи зерна будет определяться внутренней концентрацией ионов и свойствами мембраны (оболочки зерна), которые и определяют качество семян, включая всхожесть.

Важным подтверждением воздействия температуры стали эксперименты по регистрации мембранного потенциала зерен пшеницы в диапазоне температур от 20°C до 25°C с шагом через 1°C.

График зависимости изменения мембранного потенциала представлен на рисунке 3.17. На основе экспериментальных данных была выбрана линейная аппроксимирующая функция. Степень близости аппроксимации экспериментальных данных выбранной функцией характеризует высокий коэффициент корреляции 0,99. Таким образом, для зерен пшеницы со всхожестью 87% изменение мембранного потенциала от температуры представляет собой линейную зависимость.

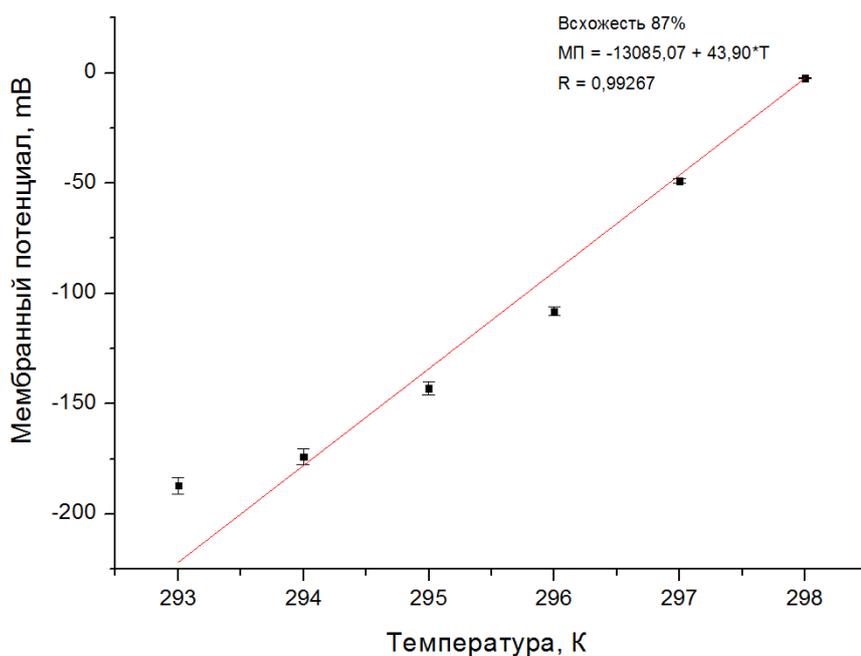


Рисунок 3.17 - Зависимость изменения мембранного потенциала от температуры для зерен пшеницы со всхожестью 87%

Для зерен пшеницы со всхожестью 93% зависимость мембранного потенциала от температуры представлена на рисунке 3.18.

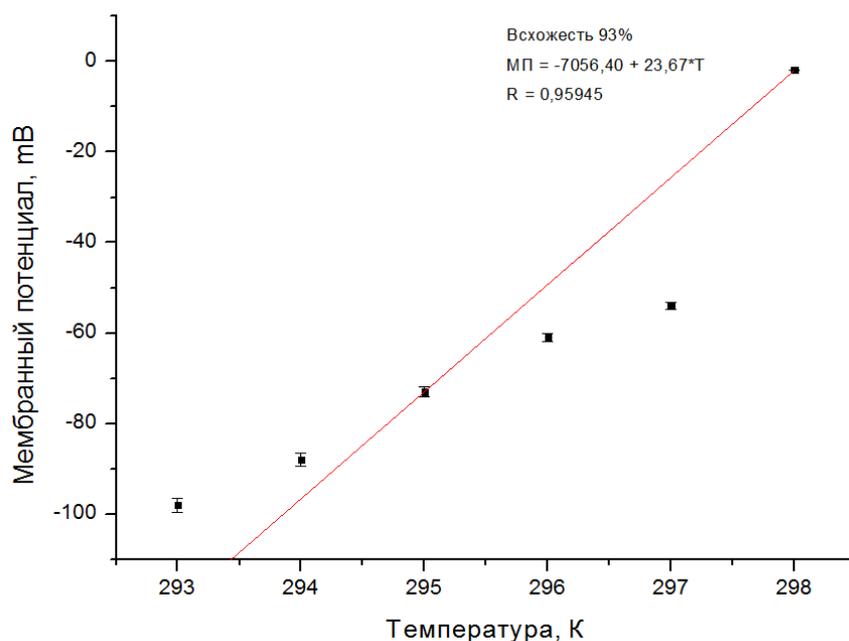


Рисунок 3.18 - Зависимость изменения мембранного потенциала от температуры для зерен пшеницы со всхожестью 93%

Аналогичное изменение мембранного потенциала от температуры наблюдается у зерен пшеницы со всхожестью 95%.

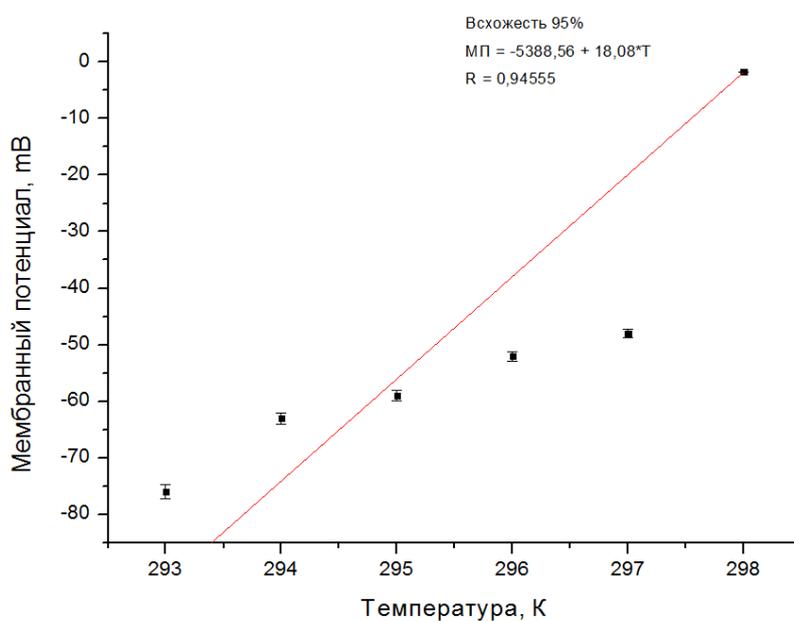


Рисунок 3.19 - Зависимость изменения мембранного потенциала от температуры для зерен пшеницы со всхожестью 95%

Для зерен пшеницы со всхожестью 97% зависимость мембранного потенциала от температуры представлено на рисунке.

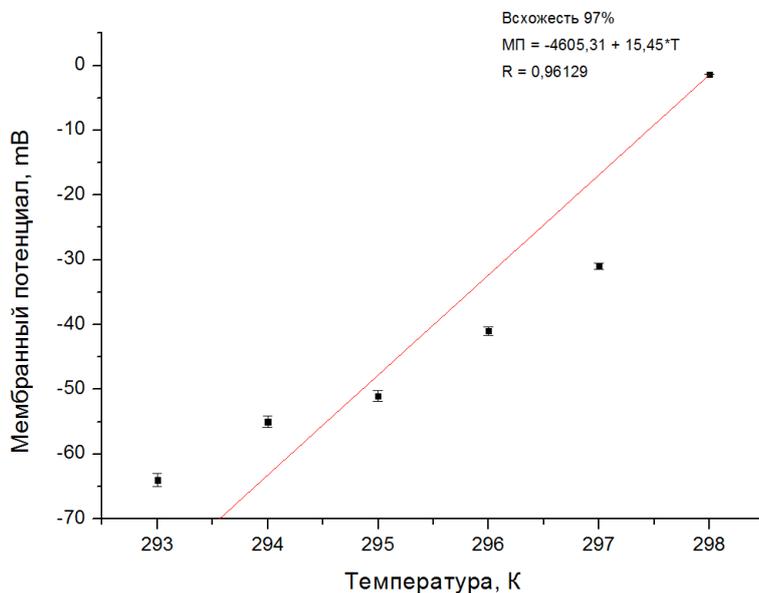


Рисунок 3.20 - Зависимость изменения мембранного потенциала от температуры для зерен пшеницы со всхожестью 97%

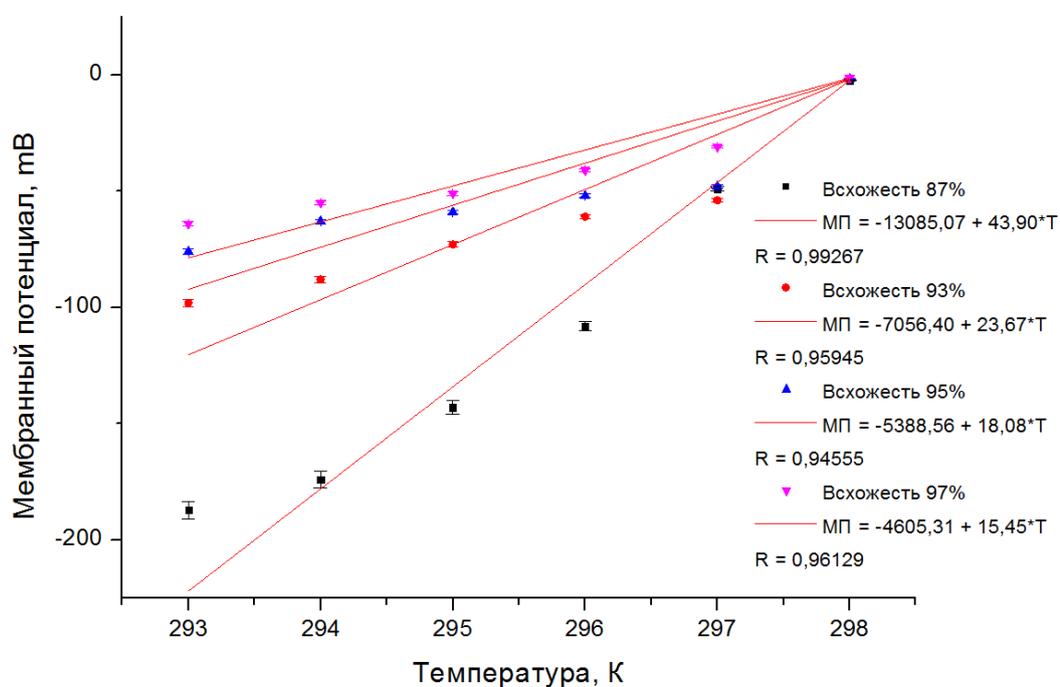


Рисунок 3.21 - Зависимость изменения мембранного потенциала от температуры для зерен пшеницы с различной всхожестью

Аппроксимируя экспериментальные данные, получены следующие зависимости изменения мембранного потенциала от температуры, которые, в свою очередь, соответствуют теоретическим заключениям о воздействии температуры на мембранный потенциал, согласно уравнению (1.1). Для семян с низкой всхожестью (87%):

$$\varphi = -13085,07 + 43,90 \cdot T \quad (3.10)$$

Для семян со всхожестью 93%:

$$\varphi = -7055,40 + 23,67 \cdot T \quad (3.11)$$

Для семян со всхожестью 95%:

$$\varphi = -5388,56 + 18,08 \cdot T \quad (3.12)$$

Для семян со всхожестью 97%:

$$\varphi = -4605,31 + 15,45 \cdot T \quad (3.13)$$

Чем выше всхожесть семян пшеницы, тем ниже коэффициент.

В результате исследования воздействия температуры на изменение мембранного потенциала зерен пшеницы с различной всхожестью выявлен оптимальный диапазон температур для проращивания семян по критерию максимального диапазона изменения мембранного потенциала в зависимости от всхожести.

С целью контроля всхожести зерен необходимо обеспечить диапазон температур от 293К (20°C) до 295К (22°C), что не противоречит нормам, указанным в ГОСТ 12038-84. Для повышения точности контроля всхожести необходимо обеспечить температуру 293К (20°C). Контроль всхожести зерен пшеницы по мембранному потенциалу при температуре свыше 23°C не даст достоверных результатов, так как при температуре 23°C свойства зерен пшеницы всхожестью 97%, 95%, 93% и 87% становятся идентичным.

Проведенные эксперименты с точки зрения мембранного потенциала научно обосновывают регламентируемый ГОСТом диапазон температур

проращивания зерен пшеницы от 20°C до 22°C. Именно в этом диапазоне температур наблюдается существенная разница значений мембранного потенциала в зависимости от всхожести зерен пшеницы. Однако время исследования всхожести зерен пшеницы по методу, изложенному в ГОСТ, составляет 10-12 дней, в разработанном методе контроля всхожести время на подготовку зерен пшеницы сокращено до 12 часов.

3.5 Результаты экспериментальных исследований мембранных потенциалов, полученных при проращивании зерен пшеницы с использованием растворов KCl различной концентрации

Согласно уравнению Гольдмана-Ходжкина-Катца, значение мембранного потенциала зависит от как температуры, так и от проницаемости мембраны и изменения концентраций ионов внутри и снаружи оболочки зерна пшеницы.

Уравнение Гольдмана-Ходжкина-Катца, в котором учитываются коэффициенты проницаемости мембраны и концентрации ионов [4]:

$$\varphi = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_K[K^+]_{out} + P_{Na}[Na^+]_{out} + P_{Cl}[Cl^-]_{in}}{P_K[K^+]_{in} + P_{Na}[Na^+]_{in} + P_{Cl}[Cl^-]_{out}}, \quad (3.14)$$

где R - универсальная газовая постоянная; T - абсолютная температура; F - постоянная Фарадея; P_K, P_{Na}, P_{Cl} - коэффициенты проницаемости для ионов K^+, Na^+, Cl^- ; $[K^+]_{out}, [Na^+]_{out}, [Cl^-]_{out}$ - концентрации ионов K^+, Na^+, Cl^- на внешней стороне мембраны; $[K^+]_{in}, [Na^+]_{in}, [Cl^-]_{in}$ - концентрации ионов K^+, Na^+, Cl^- внутри мембраны.

Однако сравнить экспериментальные значения мембранного потенциала $\varphi_{\text{э}}$ с теоретическими значениями $\varphi_{\text{т}}$, вычисленными по формуле (3.14), невозможно, потому что для зерен, во-первых, неизвестны проницаемости мембран, во-вторых, неизвестны концентрации ионов.

Применение дистиллированной воды на этапе проращивания зерен пшеницы при стабильных температурных условиях обеспечивает в

соответствии с уравнением (27) внешнюю концентрацию ионов за счет ионов на внутренней стороне мембраны. Уравнение (27) в данном случае принимает следующий вид:

$$\varphi = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_K[K^+]_{in} + P_{Na}[Na^+]_{in} + P_{Cl}[Cl^-]_{in}}{P_K[K^+]_{in} + P_{Na}[Na^+]_{in} + P_{Cl}[Cl^-]_{in}} = 0. \quad (3.15)$$

Таким образом, используя абсолютные значения коэффициентов мембранной проницаемости, согласно уравнению (3.15), получаем значение мембранного потенциала, равного нулю, что противоречит экспериментальным результатам, представленным в таблице 1. При использовании дистиллированной воды наблюдались высокие значения мембранных потенциалов.

Поскольку экспериментальные результаты не соответствуют теоретическому заключению, необходимо внести поправки в уравнение (3.14).

Пусть на внутренней стороне мембраны зерен пшеницы концентрации ионов K^+ , Na^+ , Cl^- составляют соответственно $[K^+]_{in}$, $[Na^+]_{in}$, $[Cl^-]_{in}$. При коэффициентах проницаемости P_K, P_{Na}, P_{Cl} на внешней стороне мембраны концентрации ионов составят $P_K[K^+]_{in}$, $P_{Na}[Na^+]_{in}$, $P_{Cl}[Cl^-]_{in}$. Тогда на внутренней стороне мембраны концентрация ионов K^+ будет определяться: $[K^+]_{in} - P_K[K^+]_{in} = (1 - P_K)[K^+]_{in}$. Концентрации ионов Na^+ будет определяться: $[Na^+]_{in} - P_{Na}[Na^+]_{in} = (1 - P_{Na})[Na^+]_{in}$, а концентрации ионов Cl^- : $[Cl^-]_{in} - P_{Cl}[Cl^-]_{in} = (1 - P_{Cl})[Cl^-]_{in}$. При замачивании зерен дистиллированной водой уравнение (3.14) примет вид:

$$\varphi = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_K[K^+]_{in} + P_{Na}[Na^+]_{in} + (1 - P_{Cl})Cl_{in}}{(1 - P_K)[K^+]_{in} + (1 - P_{Na})[Na^+]_{in} + P_{Cl}[Cl^-]_{in}}. \quad (3.16)$$

В числителе выражения, стоящего под знаком логарифма, представлены концентрации $P_K[K^+]_{in}$, $P_{Na}[Na^+]_{in}$, но $(1 - P_{Cl})Cl_{in}$, а в знаменателе - $(1 - P_K)[K^+]_{in}$, $(1 - P_{Na})[Na^+]_{in}$, но $P_{Cl}[Cl^-]_{in}$, так как ионы хлора отрицательно заряжены.

Данное уравнение формально позволяет вычислить и сравнить значения мембранного потенциала зерен пшеницы, проницаемости их мембран и концентрацию ионов.

Однако воспользоваться уравнением (3.16) для определения коэффициентов проницаемости и концентрации ионов невозможно, так как в уравнении содержится 6 неизвестных. Следовательно, должно быть не менее 6 уравнений.

Дополнительные уравнения можно составить, если будут известны внешние концентрации $[K^+]_{out}$, $[Na^+]_{out}$, $[Cl^-]_{out}$. Тогда с учетом внешних концентраций и вышеприведенных рассуждений о проницаемости ионов K^+ , Na^+ , Cl^- уравнение (3.15) примет вид:

$$\varphi = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_K[K]_{in} + (1-P_K)[K]_{jout} + P_{Na}[Na]_{in} + (1-P_{Na})[Na]_{out} + (1-P_{Cl})[Cl]_{in} + P_{Cl}[Cl]_{jout}}{(1-P_K)[K]_{in} + P_K[K]_{jout} + (1-P_{Na})[Na]_{in} + P_{Na}[Na]_{out} + P_{Cl}[Cl]_{in} + (1-P_{Cl})[Cl]_{jout}}, \quad (3.17)$$

где $[K]_{jout}$, $[Cl]_{jout}$, Na_{jout} - концентрации ионов во внешних солевых растворах, используемых при проращивании зерен пшеницы, j - номер солевого раствора с заданной концентрацией.

Так как для экспериментального исследования выбран раствор KCl, поэтому $[Na]_{jout} = 0$, и тогда уравнение (3.17) примет вид:

$$\varphi = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_K[K]_{in} + (1-P_K)[K]_{jout} + P_{Na}[Na]_{in} + (1-P_{Cl})[Cl]_{in} + P_{Cl}[Cl]_{jout}}{(1-P_K)[K]_{in} + P_K[K]_{jout} + (1-P_{Na})[Na]_{in} + P_{Cl}[Cl]_{in} + (1-P_{Cl})[Cl]_{jout}}. \quad (3.18)$$

Для того, чтобы проанализировать воздействие изменения внешней концентрации ионов на изменение мембранного потенциала для семян различной всхожести, выбран раствор KCl для проращивания семян. Раствор KCl выбран согласно теоретической модели контроля всхожести, а именно уравнению Гольдмана-Ходжкина-Катца (1.5), в котором изменение мембранного потенциала определяется соотношением основных ионов K^+ , Na^+ , Cl^- . Раствор NaCl использовать для проращивания не рекомендуется, так как он действует губительно на семенной материал. В клетках растений происходит

увеличение концентрации ионов Na^+ и Cl^- , что приводит к нарушению основных жизненных процессов в клетках.

Для экспериментального исследования использовалась разработанное средство контроля с возможностью регулирования начальной температуры при подготовке зерен к эксперименту и проведения измерений мембранного потенциала.

Для экспериментальных исследований использовались партии семян мягких сортов пшеницы с различными значениями всхожести – 87%, 93%, 95% и 97%.

Перед проведением исследований на всхожесть семена выводили из состояния покоя путем замачивания при температуре 20°C по методике ГОСТ 12038–84.

Для исследования были выбраны значения мембранного потенциала в начальный момент времени, т.е. мембранные потенциалы покоя.

Из общего количества измерений в результате для каждой исследуемой партии указано количество сигналов (n) для зерен пшеницы с различной всхожестью (таблица 3.2).

В таблице приведены концентрации растворов, средние значения мембранных потенциалов, полученных в результате экспериментальных исследований, и доверительные интервалы средних значений φ распределения Пуассона. Величинами $\varphi_{87\%}$ и $\varphi_{97\%}$ обозначены средние значения мембранных потенциалов зерен пшеницы со всхожестью 87% и 97% соответственно.

Таблица 3.2 - Результаты экспериментальных исследований для зерен пшеницы со всхожестью 87%

j	Концентрация КСІ, мг/л	Количество сигналов выборки $\Phi_{j87\%}$	$\Phi_{j87\%}$, мВ	Доверительный интервал для $\Phi_{j87\%}$, мВ
1	0,0000	103	-187,15	(-189,81;-184,52)
2	0,0005	107	0,39	(0,28;0,52)
3	0,0100	109	1,90	(1,65;2,17)
4	0,0500	101	2,12	(1,84;2,41)
5	0,2500	105	5,13	(4,70;5,57)
6	0,5000	108	5,59	(5,15;6,04)

Таблица 3.3 - Результаты экспериментальных исследований для зерен пшеницы 90% всхожести

j	Концентрация КСІ, мг/л	Количество сигналов выборки $\Phi_{j90\%}$	$\Phi_{j90\%}$, мВ	Доверительный интервал для $\Phi_{j87\%}$, мВ
1	0,0000	100	-125,05	(-127,25;-122,87)
2	0,0005	100	-3,70	(-4,08;-3,33)
3	0,0100	100	-1,89	(-2,17;-1,63)
4	0,0500	101	-1,65	(-1,91;-1,41)
5	0,2500	105	-0,51	(-0,66;-0,38)
6	0,5000	108	-0,05	(-0,1;-0,02)

Таблица 3.4 Результаты экспериментальных исследований для зерен пшеницы 92% всхожести

j	Концентрация КСI, мг/л	Количество сигналов выборки $\Phi_{j92\%}$	$\Phi_{j92\%}$, мВ	Доверительный интервал для $\Phi_{j93\%}$, мВ
1	0,0000	100	-105,00	(-107,02;-103,00)
2	0,0005	100	-6,58	(-7,09;-6,09)
3	0,0100	115	-3,32	(-3,65;-2,98)
4	0,0500	110	-3,11	(-3,43;-2,78)
5	0,2500	106	-0,21	(-0,29;-0,12)
6	0,5000	121	-0,11	(-0,16;-0,05)

Таблица 3.5 Результаты экспериментальных исследований для зерен пшеницы 95% всхожести

j	Концентрация КСI, мг/л	Количество сигналов выборки $\Phi_{j95\%}$	$\Phi_{j95\%}$, мВ	Доверительный интервал для $\Phi_{j95\%}$, мВ
1	0,0000	100	-76,00	(-77,55;-74,47)
2	0,0005	100	-10,47	(-11,11;-9,85)
3	0,0100	111	-4,45	(-4,85;-4,07)
4	0,0500	117	-4,32	(-4,70;-3,94)
5	0,2500	115	-0,51	(-0,64;-0,38)
6	0,5000	120	-0,17	(-0,25;-0,10)

Таблица 3.6 Результаты экспериментальных исследований для зерен пшеницы 97% всхожести

j	Концентрация КСI, мг/л	Количество сигналов выборки $\Phi_{j97\%}$	$\Phi_{j97\%}$, мВ	Доверительный интервал для $\Phi_{j97\%}$, мВ
1	0,0000	100	-64,00	(-65,58;-62,44)
2	0,0005	100	-13,54	(-14,27;-12,83)
3	0,0100	109	-5,05	(-5,48;-4,64)
4	0,0500	115	-4,80	(-5,21;-4,41)
5	0,2500	113	-0,63	(-0,78;-0,49)
6	0,5000	129	-0,21	(-0,30;-0,13)

Установлено, что значения мембранных потенциалов зерен пшеницы со всхожестями 90%, 92%, 95%, 97% и 87%, замоченных дистиллированной водой, находятся в области отрицательных значений. При этом значения мембранного потенциала покоя у зерен пшеницы с высокой всхожестью составляет значительно ниже, чем с высокой всхожестью.

Применение растворов КСИ с различной концентрацией при замачивании семян обеспечивает положительные значения мембранных потенциалов для зерен пшеницы с низкой всхожестью 87% и отрицательные значения с высокой всхожестью (90%, 92%, 95%, 97%).

На основании экспериментальных данных, представленных в таблице, можно составить 6 уравнений, которые справедливы для разной всхожести.

Первое уравнение при нулевой внешней концентрации ионов $[K^+]_{out}$, $[Na^+]_{out}$, $[Cl^-]_{out}$ примет вид:

$$\varphi_1 = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_K[K]_{in} + P_{Na}[Na]_{in} + (1 - P_{Cl})[Cl]_{in}}{(1 - P_K)[K]_{in} + (1 - P_{Na})[Na]_{in} + P_{Cl}[Cl]_{in}}. \quad (3.19)$$

Следующее уравнение получено при использовании солевого раствора KCl с концентрацией 0,0005 мг/л:

$$\varphi_2 = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_K[K]_{in} + (1 - P_K)0,00026 + P_{Na}[Na]_{in} + (1 - P_{Cl})[Cl]_{in} + P_{Cl}0,00024}{(1 - P_K)[K]_{in} + P_K0,00026 + (1 - P_{Na})[Na]_{in} + P_{Cl}[Cl]_{in} + (1 - P_{Cl})0,00024}. \quad (3.20)$$

Следующие четыре уравнения составляются аналогично.

$$\varphi_3 = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_K[K]_{in} + (1 - P_K)0,0052 + P_{Na}[Na]_{in} + (1 - P_{Cl})[Cl]_{in} + P_{Cl}0,0048}{(1 - P_K)[K]_{in} + P_K0,0052 + (1 - P_{Na})[Na]_{in} + P_{Cl}[Cl]_{in} + (1 - P_{Cl})0,0048}. \quad (3.21)$$

$$\varphi_4 = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_K[K]_{in} + (1 - P_K)0,0026 + P_{Na}[Na]_{in} + (1 - P_{Cl})[Cl]_{in} + P_{Cl}0,0024}{(1 - P_K)[K]_{in} + P_K0,0026 + (1 - P_{Na})[Na]_{in} + P_{Cl}[Cl]_{in} + (1 - P_{Cl})0,0024}. \quad (3.22)$$

$$\varphi_5 = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_K[K]_{in} + (1 - P_K)0,13 + P_{Na}[Na]_{in} + (1 - P_{Cl})[Cl]_{in} + P_{Cl}0,12}{(1 - P_K)[K]_{in} + P_K0,13 + (1 - P_{Na})[Na]_{in} + P_{Cl}[Cl]_{in} + (1 - P_{Cl})0,12}. \quad (3.23)$$

$$\varphi_6 = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_K[K]_{in} + (1 - P_K)0,26 + P_{Na}[Na]_{in} + (1 - P_{Cl})[Cl]_{in} + P_{Cl}0,24}{(1 - P_K)[K]_{in} + P_K0,26 + (1 - P_{Na})[Na]_{in} + P_{Cl}[Cl]_{in} + (1 - P_{Cl})0,24}. \quad (3.24)$$

В результате математического моделирования в среде Mathcad с использованием экспериментальных данных и системы уравнений (3.19)-(3.24) были получены абсолютные значения коэффициентов проницаемости, а также концентрации ионов.

Изменение экспериментальных значений φ в указанных пределах доверительных интервалов влечет изменении коэффициентов на 15%, что подтверждено перебором различных вариантов значений мембранного потенциала в системе уравнений. Исключая средние значения, количество проверенных вариантов по границам доверительных интервалов составило 924.

Для зерен пшеницы со всхожестью 97% коэффициенты проницаемости составили $P_K = 0,51$, $P_{Na} = 0,02$, $P_{Cl} = 0,45$. Относительные коэффициенты проницаемости: $P_K : P_{Na} : P_{Cl} = 1 : 0,04 : 0,88$.

Полученные результаты для зерен пшеницы с высокой всхожестью очень близки к фундаментальным исследованиям проницаемости мембраны аксона кальмара, где относительные коэффициенты проницаемости составляют: $P_K : P_{Na} : P_{Cl} = 1 : 0,04 : 0,45$ [5].

Для зерен пшеницы со всхожестью 97% концентрации ионов на внутренней стороне мембраны $[K^+]_{in} = 1 \cdot 10^{-5}$ мг/л, $[Na^+]_{in} = 1 \cdot 10^{-3}$ мг/л, $[Cl^-]_{in} = 1 \cdot 10^{-4}$ мг/л.

Для зерен пшеницы со всхожестью 87% коэффициенты проницаемости равны: $P_K = 0,0260$, $P_{Na} = 0,0001$, $P_{Cl} = 0,1000$.

Относительные коэффициенты проницаемости составляют: $P_K : P_{Na} : P_{Cl} = 1 : 0,004 : 0,400$. Для зерен пшеницы с низкой всхожестью концентрации ионов на внутренней стороне мембраны $[K^+]_{in} = 1 \cdot 10^{-7}$ мг/л, $[Na^+]_{in} = 1 \cdot 10^{-5}$ мг/л, $[Cl^-]_{in} = 1 \cdot 10^{-9}$ мг/л.

Таблица 3.7 - Коэффициенты проницаемости для оболочек семян пшеницы мягких сортов различной всхожести

Всхожесть, %	Коэффициенты проницаемости		
	P_K	P_{Na}	P_{Cl}
87%	0,026	0,0001	0,1
90%	0,065	0,001	0,12
92%	0,12	0,005	0,17
95%	0,45	0,015	0,23
97%	0,51	0,02	0,45

В результате экспериментальных исследований с использованием растворов KCl с различной концентрацией были определены значения мембранных потенциалов, коэффициенты проницаемости оболочки зерен

пшеницы мягких сортов для разной всхожести, а также концентрации ионов на внутренней стороне оболочки.

Исследования показали, что коэффициенты проницаемости и концентрации ионов для зерен пшеницы со всхожестью 87% значительно ниже, чем для зерен с высокой всхожестью.

Исходя из экспериментальных данных, получено, что при использовании дистиллированной воды значения мембранного потенциала по модулю для зерен с высокой всхожестью значительно ниже, чем для зерен с низкой всхожестью. Факт существенного различия потенциалов покоя объясняется высокой проницаемостью оболочки у зерен со всхожестью 97%. Согласно уравнению (6), числитель под знаком логарифма для зерен пшеницы со всхожестью 97% оказывается выше, чем для зерен пшеницы 87% всхожестью. Поэтому и мембранный потенциал получаем меньше: $|\varphi_{97\%}| < |\varphi_{87\%}|$.

Из приведенных в таблице экспериментальных данных с использованием растворов KCl с различной концентрацией видно, что мембранные потенциалы зерен пшеницы со всхожестью 97% лежат в области отрицательных величин. С увеличением внешней концентрации ионов калия K^+ значения мембранного потенциала приближаются к нулю. У зерен пшеницы со всхожестью 87% наблюдаются положительные значения мембранных потенциалов, что связано с более низкой проницаемостью ионных каналов. Согласно уравнению (5) внешняя концентрация ионов увеличивается с каждым увеличением концентрации раствора KCl.

3.6 Сравнение теоретических заключений и экспериментальных результатов

В качестве модели контроля мембранного потенциала зерен пшеницы, как показателя их всхожести, выбрана зависимость мембранного потенциала от температуры, а также от концентрации ионов и проницаемости оболочки, согласно уравнению Гольдмана-Ходжкина-Катца.

Для подтверждения правильности выбора модели, подставим рассчитанные коэффициенты проницаемости и концентрации ионов внутри мембраны в вышеуказанное уравнение и сравним с полученными в результате эксперимента данными.

На рисунке 3.22 представлены рассчитанные значения мембранного потенциала по уравнению Гольдмана-Ходжкина-Катца (пунктирная линия) и результаты эксперимента с использованием дистиллированной воды при проращивании зерен пшеницы (сплошная линия).

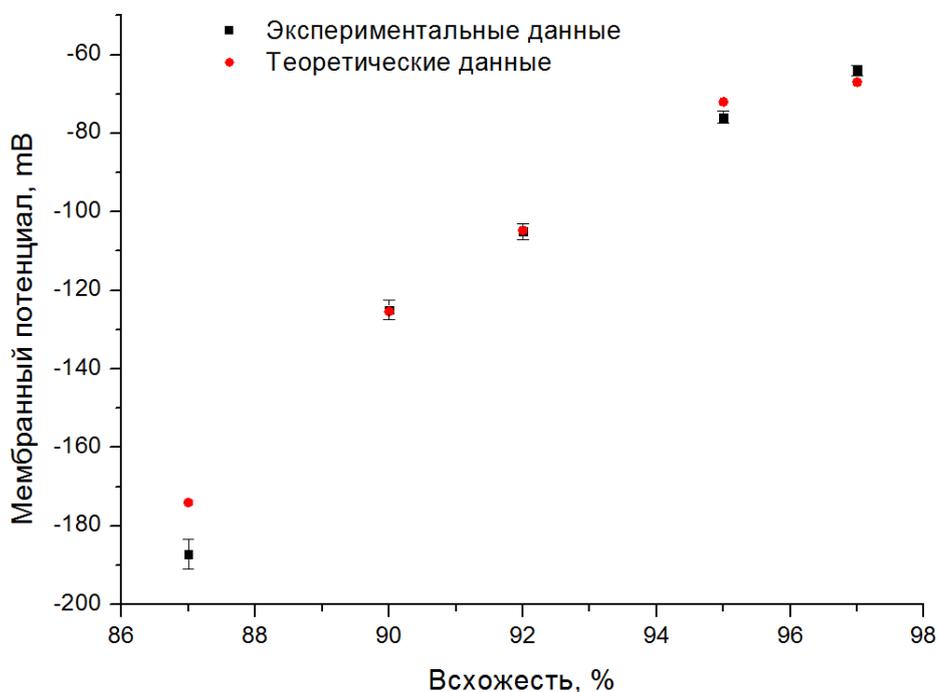


Рисунок 3.22 – Теоретические и экспериментальные значения мембранного потенциала

Полученные результаты исследований дают основание для формирования гипотезы о зависимости всхожести зерен пшеницы мягких сортов от концентрации ионов и проницаемости оболочки зерен пшеницы.

Выводы

Разработано средство контроля мембранного потенциала зерен пшеницы, как показателя их всхожести. Разработанная экспериментальная установка позволяет в автоматическом режиме поддерживать температуру в диапазоне от 18°C до 30°C, $\Delta T = 0,1^\circ\text{C}$. Температура поддерживается в течение 12 часов, при этом не требуется дополнительное участие оператора системы. Диапазон измерения мембранного потенциала составляет от 20 мВ до -200 мВ, $\Delta\varphi = 2\%$. Калибровка средства контроля осуществлялась с помощью двух магазинов резисторов R-4831 класса точности 0,02, источником напряжения выступал калибратор П320 (погрешность калибратора 0,04%).

Подготовка семян пшеницы к проведению исследований представляет собой их замачивание в дистиллированной воде или в растворе KCl с заданной концентрацией в поролоновых формах, расположенных в термокамере в течение на 12 часов с установленной температурой.

В результате исследования воздействия температуры на изменение мембранного потенциала зерен пшеницы с различной всхожестью выявлен оптимальный диапазон температуры для проращивания семян по критерию максимального диапазона изменения мембранного потенциала в зависимости от всхожести.

С целью контроля всхожести зерен необходимо обеспечить диапазон температур от 293К (20°C) до 295К (22°C), что не противоречит нормам, указанным в ГОСТ 12038-84. Для повышения точности контроля всхожести необходимо обеспечить температуру 293К (20°C). Контроль всхожести зерен пшеницы по мембранному потенциалу при температуре свыше 23°C не даст достоверных результатов, так как при температуре 23°C свойства зерен пшеницы всхожестью 97%, 95%, 93% и 87% становятся идентичным.

Проведенные эксперименты научно обосновывают регламентируемый ГОСТом диапазон температур проращивания зерен пшеницы от 20°C до 22°C.

Именно в этом диапазоне температур наблюдается существенная разница значений мембранного потенциала в зависимости от всхожести зерен пшеницы. Однако время исследования всхожести зерен пшеницы по методу, изложенному в ГОСТ, составляет 10-12 дней, в разработанном методе контроля всхожести время на подготовку зерен пшеницы сокращено до 12 часов.

Для проведения контроля мембранного потенциала семян пшеницы рекомендуется температура 20°C.

Исходя из экспериментальных данных, получено, что при использовании дистиллированной воды значения мембранного потенциала по модулю для зерен с высокой всхожестью значительно ниже, чем для зерен с низкой всхожестью. Факт существенного различия потенциалов объясняется высокой проницаемостью оболочки у зерен со всхожестью 97%. Согласно уравнению (7), числитель под знаком логарифма для зерен пшеницы со всхожестью 97% оказывается выше, чем для зерен пшеницы 87% всхожестью. Поэтому и мембранный потенциал получаем меньше: $|\varphi_{97\%}| < |\varphi_{87\%}|$.

Из приведенных в таблице экспериментальных данных с использованием растворов KCl с различной концентрацией видно, что мембранные потенциалы зерен пшеницы со всхожестью 97% лежат в области отрицательных величин. С увеличением внешней концентрации ионов калия K^+ значения мембранного потенциала приближаются к нулю. У зерен пшеницы со всхожестью 87% наблюдаются положительные значения мембранных потенциалов, что связано с более низкой проницаемостью ионных каналов. Согласно уравнению Гольдмана-Ходжкина-Катца внешняя концентрация ионов увеличивается с каждым увеличением концентрации раствора KCl.

4 МЕТОД КОНТРОЛЯ МЕМБРАННОГО ПОТЕНЦИАЛА ЗЕРЕН ПШЕНИЦЫ И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ ОЦЕНКИ ВСХОЖЕСТИ

С целью оценки всхожести зерен пшеницы был разработан метод контроля мембранного потенциала семян пшеницы, как показателя их всхожести, в основе которого лежит модель изменения мембранного потенциала по уравнению Гольдмана-Ходжкина-Катца.

Контроль мембранного потенциала семян пшеницы, как показателя их всхожести, осуществляется с помощью разработанной экспериментальной установки, состоящей из герметичной термокамеры и измерительного блока.

Усовершенствованный метод позволяет осуществлять контроль мембранного потенциала семян пшеницы, пророщенных как в дистиллированной воде, так и в растворе KCl разной концентрации при установленной начальной температуре, что позволяет повысить точность измерений.

Метод контроля мембранного потенциала семян пшеницы состоит из следующих этапов – это подготовка зерен пшеницы к экспериментальным исследованиям, затем измерение начального значения мембранного потенциала семян пшеницы с помощью измерительных электродов и статистический анализ полученных значений мембранного потенциала, оценка всхожести.

4.1 Подготовка семян пшеницы к проведению исследований

Первый этап заключается в подготовке семян к проведению исследования путем их замачивания. Перед осуществлением контроля всхожести семена пшеницы размещают в термокамеру на 12 часов.

Из исследуемой партии отбирается 150 зерен, семена размещаются на специальных ячеистых поролоновых формах размером 150x20x20 мм. Выкладывается по одному зерну в каждую ячейку, расстояние между ячейками - 10 мм. В одной поролоновой форме может быть расположено по 25 зерновок.

Поролонковые формы перед каждым экспериментом тщательно промывают дистиллированной водой и просушивают.

Перед проведением исследований термошкаф и пластиковые лотки моют горячей водой и дезинфицируют спиртом (по ГОСТу через каждые 10 дней) [1].

Затем формы помещаются в пластиковые лотки для предотвращения протекания (в один лоток помещаются две формы), после этого формы равномерно заливаются дистиллированной водой или раствором KCl в объеме 150 мл. Температура раствора или дистиллированной воды должна соответствовать температуре, установленной в термокамере.

Лотки укладывают на специальных полочках в термокамере, с помощью терморегулятора ОВЕН 2ТРМ-1 задается нижний диапазон температур 20°C, затем плотно закрывается пластиковое окно, и семена оставляют на 12 часов прорасти.

Для проведения исследований с использованием растворов KCl для замачивания зерен пшеницы, заранее подготавливаются реактивы.

В качестве основного препарата, используемого для исследовательских работ, выбран раствор KCl. Согласно теоретической модели контроля всхожести, а именно уравнению Гольдмана-Ходжкина-Катца (3.18), изменение мембранного потенциала определяется соотношением основных ионов K^+ , Na^+ , Cl^- . Для того, чтобы проанализировать воздействие изменения внешней концентрации ионов на изменение мембранного потенциала для семян различной всхожести, выбран раствор KCl для проращивания семян. Раствор NaCl использовать для проращивания не рекомендуется, так как он действует губительно на семенной материал.

Для исследований раствор KCl 4%, приобретенный в аптеке, разводится до необходимой концентрации с помощью дистиллированной воды.

4.2 Измерение мембранного потенциала и статистическая обработка результатов

Следующий этап – это измерение начального значения мембранного потенциала семян пшеницы с помощью измерительных электродов.

Сначала устанавливается программное обеспечение для платы сбора данных LA-50USB, позволяющее осуществлять сбор (программа Saver) и последующую обработку (программа Converter) полученных данных. Плата сбора данных к персональному компьютеру подключается с помощью USB-кабеля.

Измерение мембранного потенциала зерна происходит следующим образом. Руками в резиновых перчатках по одному зерну извлекаются семена пшеницы из формы и поочередно устанавливаются вертикально хохолком кверху в электрод-держатель, который выполнен в виде зажима. Программой Saver запускается сбор данных, поступающих с аналогового входа платы сбора данных. Вторым электродом, выполненным в форме тонкой иглы, прокалывается зерно на глубину 2 мм, в одну из семядолей. Сбор данных продолжается в течение 3 секунд. Затем зерно удаляется из электрода-держателя. Электрод-игла и электрод-зажим протираются чистой бумажной салфеткой, удаляются остатки проростков, если таковые имеются.

После этого производится конвертирование данных в формат Microsoft Excel посредством программы Converter.

Для контроля всхожести предлагается исследовать мембранный потенциал в начальный момент времени. Для уменьшения шума необходимо применить метод низкочастотной фильтрации.

Входной сигнал отличается высокой равномерной зашумленностью. С целью минимизации шумов и выделения полезной составляющей сигнала осуществляется низкочастотная (НЧ) фильтрация данных. Используя редактор формул MS Excel, в каждом столбце считается среднее значение:

=СРЗНАЧ($X_i:X_{i+199}$), где X – имя столбца с данными от A до AX , i – порядковый номер строки соответствующего столбца.

Усреднение отфильтрованных данных производится с помощью формулы: =СРЗНАЧ($A_i:AX_i$), где A и AX – последовательность из 100 столбцов от A до AX , i – порядковый номер строки соответствующего столбца.

4.3 Контроль мембранного потенциала семян пшеницы, пророщенных с использованием дистиллированной воды, и оценка их всхожести

В результате многочисленных экспериментальных исследований выявлена зависимость всхожести семян пшеницы, пророщенных с использованием дистиллированной воды, от значений мембранного потенциала в начальный момент времени.

На рисунке 4.1 представлен график зависимости всхожести семян пшеницы от изменения мембранного потенциала с использованием дистиллированной воды при проращивании.

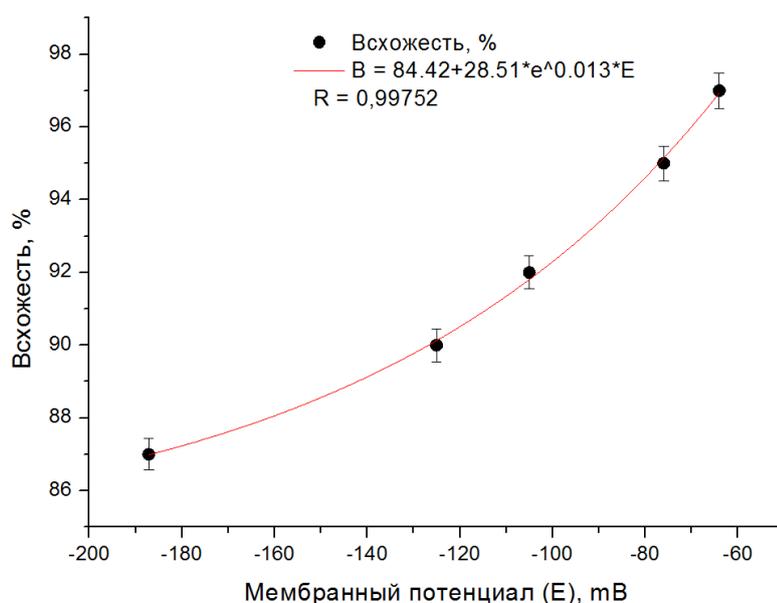


Рисунок 4.1 – Зависимости всхожести семян пшеницы от среднего значения мембранного потенциала с использованием дистиллированной воды

Аппроксимируя экспериментальные данные, получена зависимость всхожести семян пшеницы от мембранного потенциала:

$$B_d = 84,42 + 28,51e^{0.013\varphi}. \quad (4.1)$$

Согласно уравнению Гольдмана-Ходжкина-Катца, изменение мембранного потенциала зависит как от температуры, так и от соотношения концентраций ионов внутри и снаружи оболочки. Стабилизируя температуру, получаем, что мембранный потенциал, определяется только параметрами под логарифмом, а именно внешней и внутренней концентрацией ионов. Поэтому для аппроксимации данных выбрана показательная функция.

На основании формул теории ошибок рассчитана погрешность косвенно измеряемой всхожести семян пшеницы (ΔB_d) путем дифференцирования полученной функции:

$$\Delta B_d = \left| \frac{\partial B}{\partial \varphi} \right| \cdot \Delta \varphi = \left| \frac{dB}{d\varphi} \right| \cdot \Delta \varphi, \quad (4.2)$$

где $B(\varphi)$ – косвенно измеряемая величина, зависящая от измеряемого мембранного потенциала φ ; $\Delta \varphi$ – погрешность непосредственного измерения мембранного потенциала φ .

Относительную погрешность вычислили по формуле:

$$\varepsilon B_d = \frac{\Delta B_d}{B_d} \cdot 100\% = 0,5\%. \quad (4.3)$$

Таким образом, учитывая погрешность прибора, погрешность измерений (2%), а также погрешность метода (0,5%), погрешность разработанного метода контроля составляет:

$$\Delta B_d = \sqrt{(0,02)^2 + (0,02)^2 + (0,04)^2 + (0,5)^2 + (2)^2} = 2\%. \quad (4.4)$$

4.4 Контроль мембранного потенциала семян пшеницы, пророщенных с использованием раствора KCl, и оценка их всхожести

В результате многочисленных экспериментальных исследований выявлена зависимость всхожести семян пшеницы, пророщенных с использованием раствора KCl, от значений мембранного потенциала в начальный момент времени.

Для экспериментальных исследований был выбран раствор KCl с концентрацией 0,0005 мг/л по критерию максимального диапазона изменения мембранного потенциала в зависимости от всхожести.

На рисунке 4.2 представлен график зависимости всхожести семян пшеницы от среднего значения мембранного потенциала семян пшеницы, пророщенных с использованием раствора KCl.

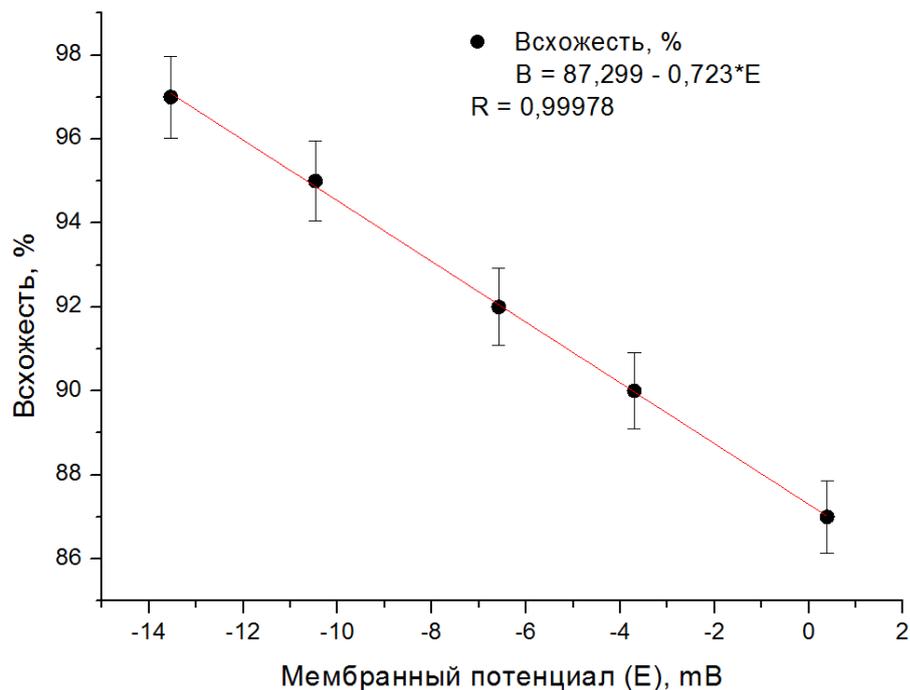


Рисунок 4.2 – Зависимости всхожести семян пшеницы от средних значений мембранного потенциала с использованием раствора KCl

Аппроксимируя экспериментальные данные с помощью показательной функции, получена зависимость всхожести семян пшеницы от мембранного потенциала:

$$V_{\text{KCl}} = 276,42 - 189,14e^{0,004\varphi}. \quad (4.5)$$

Относительная погрешность составляет: $\varepsilon V_{\text{KCl}} = 1,4\%$.

Погрешность метода в данном случае будет составлять: $\Delta V_{\text{д}} = 2,5\%$.

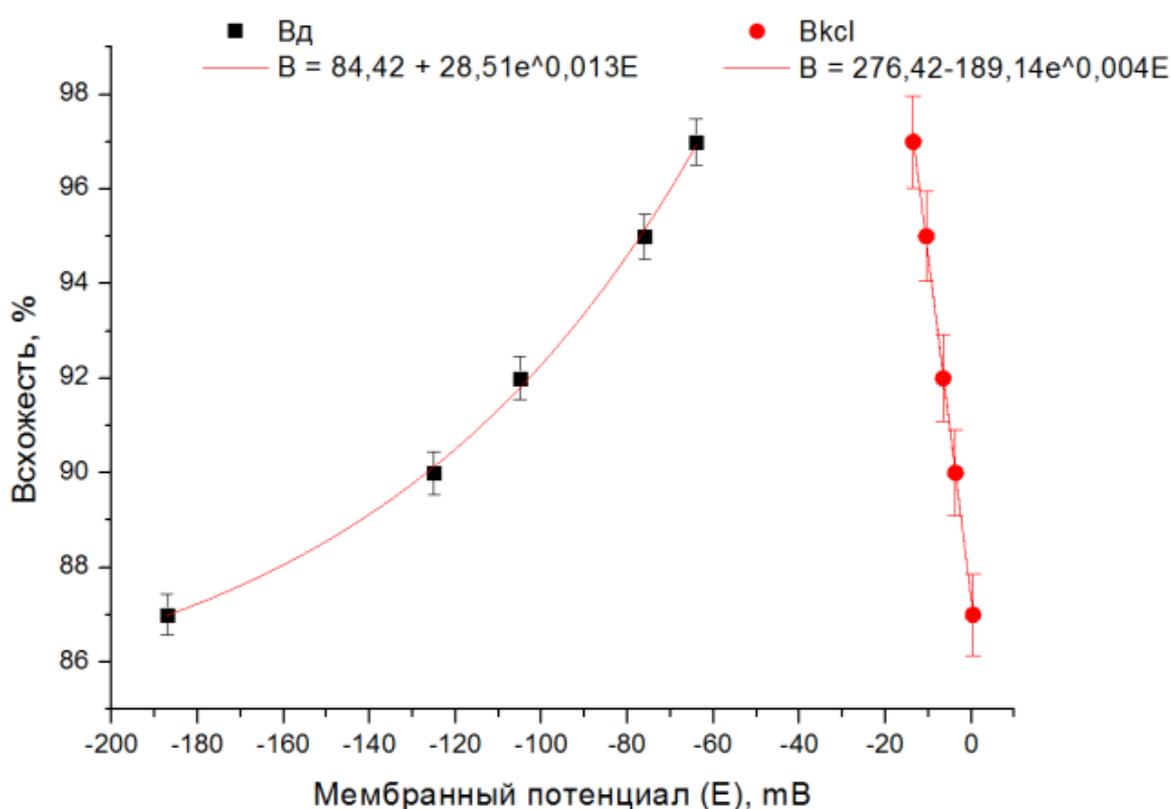


Рисунок 4.3 – Зависимости всхожести семян пшеницы от мембранного потенциала с использованием раствора KCl (Вкcl) и дистиллированной воды (ВД)

Согласно полученным результатам, для оценки всхожести семян пшеницы выбран метод контроля с использованием дистиллированной воды для проращивания. Так как погрешность данного метода ниже, чем погрешность метода с использованием раствора KCl при проращивании семян.

Выводы

Согласно полученным результатам, для оценки всхожести семян пшеницы выбран метод контроля с использованием дистиллированной воды при проращивании, так как погрешность данного метода ниже, чем погрешность метода с использованием раствора KCl при проращивании семян. Погрешность метода составляет 2%.

Метод включает в себя подготовку семян к экспериментальным исследованиям путем замачивания их в течении 12 часов при температуре 20°C в дистиллированной воде, измерение начальных значений мембранного потенциала семян пшеницы, обработку полученных данных с применением статистических методов анализа, оценку всхожести с помощью формулы (4.1).

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ РАБОТЫ

1. Решена актуальная задача оценки всхожести семян пшеницы путем разработки метода и средства контроля мембранного потенциала зерен пшеницы, как показателя их всхожести, с учетом температуры и солевых растворов, что дает возможность определять всхожесть семян пшеницы в короткие сроки с более высокой степенью достоверности.

2. На основе уравнения Гольдмана-Ходжкина-Катца, разработана модель контроля мембранного потенциала семян пшеницы, которая позволяет учесть воздействие температуры, определить зависимость мембранного потенциала от изменения концентрации ионов K^+ , Na^+ , Cl^- на внешней стороне оболочки зерна пшеницы с помощью солевых растворов, что дает теоретическую основу для разработки новых методов контроля всхожести семян пшеницы.

3. Разработано средство контроля мембранного потенциала семян пшеницы, которое позволяет устанавливать начальную температуру и стабилизировать ее при проращивании семян пшеницы и измерении мембранного потенциала. Разработанная экспериментальная установка позволяет в автоматическом режиме поддерживать температуру в диапазоне от $18^{\circ}C$ до $30^{\circ}C$, $\Delta T = 0,1^{\circ}C$. Температура поддерживается в течение 12 часов, при этом не требуется дополнительное участие оператора системы. Диапазон измерения мембранного потенциала составляет от 20 мВ до -200 мВ, $\Delta \varphi = 2\%$. Калибровка средства контроля осуществлялась с помощью двух магазинов сопротивления Р4831 класса точности 0,02, источником напряжения выступал калибратор ПЗ20 (погрешность калибратора 0,04%).

4. Экспериментальные исследования изменений мембранного потенциала в диапазоне температур от $20^{\circ}C$ до $25^{\circ}C$ позволили установить следующую закономерность: при температуре от $20^{\circ}C$ до $22^{\circ}C$ наблюдается существенная разница значений мембранного потенциала семян пшеницы в зависимости от

всхожести, при температуре 23°C и выше свойства зерен пшеницы всхожестью 97%, 93% и 87% становятся идентичными. Оценка всхожести зерен пшеницы по мембранному потенциалу при температуре свыше 23°C не дает достоверных результатов. Проведенные эксперименты с точки зрения мембранного потенциала научно обосновывают регламентируемый ГОСТ 12038-84 диапазон температур проращивания зерен пшеницы от 20°C до 22°C. Для проведения контроля мембранного потенциала семян пшеницы рекомендуется температура 20°C.

5. На основе полученных экспериментальных результатов разработан метод контроля мембранного потенциала зерен пшеницы, как показателя их всхожести. Метод включает в себя подготовку семян к экспериментальным исследованиям путем замачивания их в течении 12 часов при температуре 20°C в дистиллированной воде, измерение начальных значений мембранного потенциала семян пшеницы, обработку полученных данных с применением статистических методов анализа, расчет всхожести по математической формуле (4.1). Для зерен пшеницы со всхожестью 97% мембранный потенциал составляет: -64 мВ, для зерен пшеницы со всхожестью 95%: -76 мВ, со всхожестью 92%: -105 мВ, со всхожестью 90%: -125 мВ, для зерен пшеницы со всхожестью 87%: -187 мВ. Погрешность разработанного метода составляет 2%.

6. В результате экспериментальных исследований с растворами KCl с различной концентрацией и математического моделирования с использованием модифицированного уравнения Гольдмана-Ходжкина-Катца впервые были определены коэффициенты проницаемости оболочки зерен пшеницы мягких сортов для семян разной всхожести, а также концентрации ионов на внутренней стороне оболочки. Полученные результаты дают теоретическую базу для дальнейших разработок методов оценки качества семян как мягких, так и твердых сортов.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. ГОСТ 12038–84 Семена сельскохозяйственных культур. Методы определения всхожести. – М.: Изд-во стандартов, 1986. – 57 с.
2. ГОСТ 12039–82 Семена сельскохозяйственных культур. Методы определения жизнеспособности. – М.: Изд-во стандартов, 1983. – 41 с.
3. Арабаджи, В.И. Загадки простой воды / В.И. Арабаджи. – М.: Знание, 1973. – 195 с.
4. Беркинблит, М.Б. Электричество в живых организмах / М.Б. Беркинблит, Е.Г. Глаголева. – М.: Наука, 1988. – 283 с.
5. Дудки, И.А. Словарь ботанических терминов / И.А. Дудки. – Киев: Наукова Думка, 1984. – 254 с.
6. Максимов, Н.А. Краткий курс физиологии растений / Н.А. Максимов. – М.: 9 изд., 1958. – 215 с.
7. Галактионов, С.Г. Ботаники с гальванометром / С.Г. Галактионов, В.М. Юрин. – М.: Знание, 1979. – 144 с.
8. Нестеров, Я.С. Период покоя плодовых культур / Я.С. Нестеров. – М.: Сельхозиздат, 1962. – 150 с.
9. Кефели, В.И. Рост растений и природные регуляторы / В. И. Кефели. – М.: Наука, 1977. – 295 с.
10. Гальвани, Л. Избранные работы о животном электричестве / Л. Гальвани, А. Вольта. – М.: Л.: Гос. Изд-во биол. и мед. лит., 1937. – 124 с.
11. Ходжкин, А. Нервный импульс [Текст] / А. Ходжкин; пер. с англ. Л.М. Цофиной; ред. Е.А. Либерман. – М.: Мир, 1965. – 125 с.
12. Экклс, Дж. Физиология синапсов / Дж. Экклс; пер. с англ. О. Виноградова. – М.: Мир, 1966. – 396 с.
13. Катц, Б. Нерв, мышца и синапс / Б. Катц. – М.: Мир, 1968. – 220 с.
14. Ходоров, Б.И. Проблема возбудимости / Б.И. Ходоров. – Л.: Медицина, 1969. – 189 с.

15. Оприотов, В.А. Биоэлектrogenез у высших растений / В.А. Оприотов, С.С. Пятыгин. – М.: Наука, 1991. – 215 с.
16. Кедров, Б.М. Предмет и взаимосвязь естественных наук / Б.М. Кедров. – М.: Наука. 1967. – 436 с.
17. Куражсковский, Ю.Н. Основные проблемы и методы природопользования / Ю.Н. Куражсковский // Природа и общество. – М.: Наука, 1968. – С. 207–221.
18. Кузнецов, В.И. Естествознание / В.И. Кузнецов, Г.М. Идлис, В.Н. Гутина. – М.: Агар, 1996. – 384 с.
19. Hodgkin, AL. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve / AL. Hodgkin, AF. Huxley. – J. Physiol. (Lond.), 1952. – pp. 500–544.
20. Malmivuo, J. Bioelectromagnetism / J. Malmivuo, R. Plonsey. – Oxford University Press. New York, Oxford, 1995. – 220 p.
21. Медведев, С.С. Электрофизиология растений / С.С. Медведев. – СПб.: Издательство С–Пб. университета, 1998. – 184 с.
22. Сакман, Б. Регистрация одиночных каналов / Б. Сакман, Э. Неер. – М.: Мир, 1991. – 165 с.
23. Эккерт, Р. Физиология животных, механизмы и адаптация / Р. Эккерт, Д. Рэнделл, Дж. Огастин. – М.: Мир, 1991. – 193 с.
24. Hedrich, R. Patch-clamp studies on higher plant cells: a perspective/ R. Hedrich, J.I. Schroeder, J.M. Fernandez // Trends biochemistry science. –1987. – v.12. pp. 49–52
25. Абуталыбов, М.Г. Регуляция активности ионов калия в клетках эпидермиса корня при изменении солевого состава среды / М.Г. Абуталыбов, П.В. Мельников, Т.С. Ахундова // Физиология растений. – 1979. – т. 29. – С. 568-578.
26. Александров, В.Я. Реактивность клеток и белки / В.Я. Александров. – Л.: Наука, 1985. – 318 с.

27. Али-заде, В.М. Гормональная регуляция движущих сил транспорта ионов калия и водорода в клетках эпидермиса корня / В.М. Али-заде, Т.С. Ахундова, Ф.К. Алиева // Известия АН Азерб. ССР, сер. биол. – 1986. – №6. – С. 16-21.
28. Андреев, И.М. Са /pH антипорт в везикулах тонопласта из листьев гороха / И.М. Андреев, В.Д. Кореньков, Ю.Г. Молотковский // Биологические мембраны. – 1989. – Т.6. – №2. – С. 153–158.
29. Антоненко, Ю.Н. Электронейтральный транспорт катионов через бислойную липидную мембрану индуцированный нигерицином / Ю.Н. Антоненко, Л.С. Ягужинский // Биологические мембраны. – 1988. – Т.5. – №7.– С. 718-727.
30. Антонов, В.Ф. Липиды и ионная проницаемость мембран / В.Ф. Антонов. – М.: Наука, 1982. – 151 с.
31. Лукьяненко, А.И. Электрические параметры бислойной липидной мембраны модифицированной Са связывающим гликопротеином митохондрий / А.И. Лукьяненко, Г.Н. Берестовский, Ю.К. Евстафиенко // Биофизика. – 1980. – Т.25. – вып. 1. – С.82-86.
32. Болдырев, А.А. Биологические мембраны и транспорт ионов / А.А. Болдырев. – М.: Изд-во МГУ, 1985. – 208 с.
33. Вайнар, Р. Движения у растений / Р. Вайнар. – М.: Знание, 1987. – 174 с.
34. Владимиров, Ю.А. Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран / Ю.А. Владимиров, Г.Е. Добрецов. – М.: Наука, 1980. – 320 с.
35. Воробьев, Л.Н. Регулирование ионного транспорта: теоретические и практические аспекты минерального питания растений / Л.Н. Воробьев // Итоги науки и техники. Сер. Физиол. растений. Т.5. – 1988. – С. 179.

36. Галактионов, С.Г. Регуляция функций мембран растительных клеток / С.Г. Галактионов, В.М. Юрин, В.М. Иванченко. – Минск: Наука и техника, 1979. – 199 с.
37. Гизе, А. Физиология клетки / А. Гизе. – М.: Издательство иностранной литературы, 1959. – 455 с.
38. Горчаков, В.В. Физико–химические основы происхождения биопотенциалов / В.В. Горчаков. – М.: Наука, 1964. – С. 155–158.
39. Гастон, А. Жизнь зеленого растения / А. Гастон, П. Девис, Р. Сэттер. – М.: Мир, 1983. – 552 с.
40. Духовный, А.И. Электрофизиология опыления у высших растений (на примере кукурузы) / А.И. Духовный. – Кишинев: Штиица, 1973. – 100 с.
41. Жерелова, О.М. Регуляция кальциевых каналов плазмалеммы *Nitellopsis obtusa* внутриклеточным кальцием / О.М. Жерелова, А.А. Катаев, Т.И. Берестовский // Биофизика. - 1987. – Т. 32. - №2. – С. 348–349.
42. Ивков, В.Г. Динамическая структура липидного бислоя / В.Г. Ивков, Г.Н. Берестовский. – М.: Наука, 1981. – 293 с.
43. Ивков, В.Г. Липидный бислой биологических мембран / В.Г. Ивков, Г.Н. Берестовский. – М.: Наука, 1982. – 224 с.
44. Конев, С.В. Структурная лабильность биологических мембран и регуляторные процессы / С.В. Конев. – Минск: Наука и техника, 1987. – 240 с.
45. Конев, С.В. Биомембраны: Структура, функции, методы исследования / С.В. Конев, И. Волотковский. – Рига: Зинатие, 1977. – С. 42–76.
46. Конев, С.В. Межклеточные контакты / С.В. Конев, В.М. Мажуль. – Минск: Наука и техника, 1977. – 312 с.
47. Латманизова, Л.В. Очерк физиологии возбуждения / Л.В. Латманизова. – М.: Высшая Школа, 1972. – 272 с.
48. Лев, А.А. Ионная избирательность клеточных мембран / А.А. Лев. – Л.: Наука, 1975. – 323 с.

49. Леваковский, Н.Ф. О движении раздражимых растений / Н.Ф. Леваковский. – Харьков, 1967. – 286 с.
50. Левин, С.В. Структурные изменения клеточных мембран / С.В. Левин. – Л.: Наука, 1976. – 224 с.
51. Либерман, Е.А. Живая клетка / Е.А. Либерман. – М.: Наука, 1982. – 160 с.
52. Максимов, Г.Б. АТФ – зависимый мембранный транспорт катионов и роль цитокининов в его регуляции у растений: автореф. дис. доктора биол. наук: 03.00.12 / Максимов Гемир Борисович. – Москва, 1989. – 47 с.
53. Полевой, В.В. Методы изучения мембран растительных клеток / В.В. Полевой. – Л.: Издательство ЛГУ. - 1986. – С. 72–78.
54. Пятыгин, С.С. Биоэлектрогенез клеток стебля тыквы при умеренном охлаждении: Автореф. дисс. канд биол. наук: 03.00.02 / Пятыгин Сергей Станиславович. - Минск: ИФБ АН БССР, 1986. - 23 с.
55. Саламатова, Т.С. Физиология растительной клетки / Т.С. Саламатова. – Л.: Издательство ЛГУ, 1983. – 232 с.
56. Скулачев, В.П. Энергетика биологических мембран / В.П. Скулачев. – М.: Наука, 1989. – 564 с.
57. Тимирязев, К.А. Жизнь растения: Десять общедоступных лекций / К.А. Тимирязев. – М.: Издательство АН СССР, 1962. – 290 с.
58. Шеперд, Г. Нейробиология / Г. Шеперд. – М.: Мир, 1987. – Т. 1. – 454 с.
59. Берк, К. Анализ данных с помощью MS Excel / К. Берк, П. Кейри. – М.: Вильямс, 2005. – 560 с.
60. Васильев, А.Н. Научные вычисления в Microsoft Excel / А.Н. Васильев. – М.; СПб.; Киев: Диалектика, 2004. – 512 с.
61. Вуколов, Э.А. Основы статистического анализа: Практикум по статистическим методам и исследованию операций с использованием пакетов STATISTICA и Excel / Э.А. Вуколов. – М.: Форум; Инфа-М, 2004. – 464 с.

62. Лапач, С.Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с помощью Excel / С.Н. Вуколов, А.В. Чубенко, П.Н. Бабич. – Киев: Морион, 2001. – 408 с.
63. Макарова, Н.В. Статистика в Excel / Н.В. Макарова, В.Я. Трофимец. – М.: Финансы и статистика, 2002. – 368 с.
64. Минько, А.А. Статистический анализ в среде Excel / А.А. Минько. – М.; СПб.; Киев: Диалектика, 2004. – 448 с.
65. Тюрин, Ю.Н. Статистический анализ данных на компьютере / Ю.Н. Тюрин, А.А. Макаров. – М.: Инфра-М, 1998. – 528 с.
66. ГОСТ–11.004–74 (СТ СЭВ 876–78) Прикладная статистика. Правила определения оценок и доверительных границ для параметров нормального распределения. – М.: Изд-во стандартов, 1981.
67. Браунли, К.А. Статистическая теория и методология в науке и технике / К.А. Браунли. – М.: Наука, 1977. – 407 с.
68. Румшицкий, Д.З. Математическая обработка результатов эксперимента. Справочное руководство / Д.З. Румшицкий. – М.: Наука, 1971. – 170 с.
69. Гайдышев, И. Анализ и обработка данных / И. Гайдышев. – СПб.; М.: Питер, 2001. – 752 с.
70. Ивченко, Г.Н. Математическая статистика / Г.Н. Ивченко, Ю.И. Медведев. – М.: Высшая школа, 1984. – 318 с.
71. Поллард, Дж. Справочник по вычислительным методам статистики / Дж. Поллард. – М.: Финансы и статистика, 1982. – 344 с.
72. Иванова, В.М. Математическая статистика / В.М. Иванова, В.Н. Калинина, Л.А. Нешумова, И.О. Решетников. – М.: Высшая школа, 1975. – 372 с.
73. Воденеев В.А. Механизмы генерации и функциональная роль потенциалов возбуждения у высших растений: Автореф. дисс. доктора биол. наук: 03.00.12 / Воденеев Владимир Анатольевич. - Москва, 2009. - 42 с.

74. Кассандрова, О.Н. Обработка результатов наблюдений / О.Н. Кассандрова, В.В. Лебедев. – М.: Наука, 1970. – 104 с.
75. Гутер, Р.С. Элементы численного анализа и математической обработки результатов опыта / Р.С. Гутер, Б.В. Овчинский. – М.: Физматгиз, 1962. – 356с.
76. Рыжов, Э.В. Математические методы в технологических исследованиях / Э.В. Рыжов, О.А. Горленко. – Киев: Наук. думка, 1990. – 184 с.
77. Бос, Д.Ч. Избранные произведения по раздражимости растений / Д.Ч. Бом. - М.: Наука, 1964. - Т. 1, 2. – 395 с.
78. Булычев, А.А. Изменения электрического потенциала на фотосинтетической и клеточной мембранах *Anthoncero* при действии света / А.А. Булычев // Физиология растений. - 1989. Т. 36, - №3. С. 479-486.
79. Коган, А.Б. Электрофизиология / А.Б. Коган. - М.: Высш. Школа, 1969. 368 с.
80. Костюк, П.Г. Биофизика / П.Г. Костюк, Д.М. Гродзинский, В.Л. Зима, Б.С. Магура, Е.П. Сидорик, М.Ф. Шуба. - Киев: Выш. Школа, 1988. 504 с.
81. Богданов, К.Ю. Физик в гостях у биолога / К.Ю. Богданов. - М.: Наука, 1986. - 144 с.
82. Чебышев, Н.В. Биологический тематический словарь / Н.В. Чебышев и др. – М.: Издательский центр «Академия», 2006. – 336 с.
83. Кларксон, Д. Транспорт ионов и структура растительной клетки / Д. Кларксон. – М.: Мир, 1978. – 368 с.
84. Измеритель-регулятор двухканальный ОВЕН 2ТРМ1 [Электронный ресурс] / Краткое описание. – Режим доступа: <http://www.owen.ru>.
85. Плата сбора и обработки данных LA-50USB [Электронный ресурс] / Краткое описание. – Режим доступа: [http:// http://www.rudshel.ru](http://www.rudshel.ru).
86. Тарчевский, И.А. Метаболизм растений при стрессе [Текст] / И.А. Тарчевский. – Казань: ФЭН, 2001. – 448 с.

87. Сухов, В.С. Математическая модель потенциалов действия у высших растений [Текст] / В.С. Сухов, В.А. Воденеев // Физиология растений. – 2005. – С. 967-977.
88. Рощина, В.Д. Физиология растительной клетки [Текст] / В.Д. Рощина. – Воронеж.: Издательство ВГУ, 1970. – 97 с.
89. Пятыгин, С.С. Распространяющиеся электрические сигналы в растениях [Текст] / С.С. Пятыгин // Цитология. – 2008. – № 2. – С. 154-159.
90. Изаков, В.Я. Основы электробиологии [Текст] / В.Я. Изаков, И.А. Рыбин. – Свердловск, 1973. – 200 с.
91. Данжар, П. Цитология растений и общая цитология [Текст] / П. Данжар. – М.: Издательство иностранной литературы, 1950. – 652 с.
92. Рубин, А.Б. Биофизика: учебник для биологических спец. вузов. В 2 т. Т. 1. Теоретическая биофизика / А.Б. Рубин. - 2-е изд., испр. и доп. - М.: Университет, 1999. - 448 с.
93. Рубин, А.Б. Биофизика: учебник для биологических спец. вузов. В 2 т. Т. 2. Биофизика клеточных процессов / А.Б. Рубин. - М.: Университет, 2000. - 467 с.
94. Берестовский, Т.Н. Характеристики возбудимых мембран харовых водорослей / Т.Н. Берестовский, И.Я. Востриков, О.Н. Жерелова, В.З. Луневский. // Ионный транспорт в растениях: Труды II Всесоюзного симпозиума. - Киев: Наукова думка, 1979. С. 8-9.
95. Кожечкин, С.Н. Микроэлектроды / С.Н. Кожечкин; под ред. Б.Н. Вепринцева // Приборы и методы для микроэлектродного исследования клеток. – Пушино. - 1975. - С. 62-83.
96. Воденеев, В.А. Анализ участия электрогенного насоса плазматических мембран в формировании потенциала действия у высших растений: Автореф. дисс. канд. биол. наук: 03.00.12 / Воденеев Владимир Анатольевич. - Нижний Новгород, 2002. 26 с.

97. Зацепина, Г.Н. Природа электрической полярности высшего растения / Г.Н. Зацепина, Ю.Б. Цаплиев // Биофизика. - 1980. - Т. 25. - №1. - С. 144-147.
98. Квасов, Д.Г. Материалы физиологии раздражения растительных клеток / Д.Г. Квасов // Ученые записки ЛГУ. Сер. биол. - 1949. - вып. 16. - №99. - С. 257-275.
99. ГОСТ 12037–81 Семена сельскохозяйственных культур. Методы определения чистоты и отхода семян. – М.: Изд-во стандартов, 1981. – 34 с.
100. ГОСТ 12036–85 Семена сельскохозяйственных культур. Правила приемки и методы отбора проб. – М.: Изд-во стандартов, 1985. – 14 с.
101. Матлаев, А.Г. Контроль всхожести семян пшеницы по параметрам потенциала действия / А.Г. Матлаев, С.П. Пронин // Естественные и технические науки. - 2009. – С. 305–308.
102. Матлаев, А.Г. Зависимость изменения потенциала действия зерна пшеницы от всхожести / А.Г. Матлаев, С.П. Пронин // Ползуновский альманах. – 2009. – №2. – С. 138–140.
103. Матлаев, А.Г. Метод контроля всхожести зерна пшеницы по нернстовскому потенциалу / А.Г. Матлаев // Международная научная конференция молодых ученых «Актуальные задачи современной науки»: Тез. докл. Красноярск, 2009 – С. 20–22.
104. Пустыльник, Е.И. Статистические методы анализа и обработки наблюдений / Е.И. Пустыльник. – М.: Наука, 1968. – 288 с.
105. Матлаев, А.Г. Метод и средство контроля всхожести семян пшеницы по изменению потенциала действия: автореф. дис. кандидата тех. наук: 05.11.13 / Матлаев Александр Геннадьевич. – Барнаул, 2009. – 19 с.
106. Мерченко, Н.Н. Разработка метода контроля всхожести зерен пшеницы по мембранному потенциалу / Н.Н. Мерченко, С.П. Пронин, А.Г. Зрюмова // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. – 2013. - № 10 (108). – С. 103-106.

107. Мерченко, Н.Н. Зависимость мембранного потенциала зерен пшеницы от концентрации ионов на внутренней стороне оболочки и ее проницаемости / Н.Н. Мерченко, С.П. Пронин // Фундаментальные исследования. – 2014. - № 8. – С. 1539-1544.

108. Барышева, Н.Н. Метод контроля мембранного потенциала семян пшеницы и его применение для оценки всхожести / Н.Н. Барышева, С.П. Пронин // Ползуновский вестник. – 2015. - № 2. - С. 70-74.

109. Мерченко, Н.Н. Исследование изменения потенциала действия семян пшеницы в зависимости от их всхожести при заданной температуре / Н.Н. Мерченко, С.П. Пронин, А.Г. Зрюмова // Естественные и технические науки. - 2013. - №2. – С. 189-192.

110. Мерченко, Н.Н. Влияние температуры на изменение мембранного потенциала зерна пшеницы / Н.Н. Мерченко, А.Г. Зрюмова // Материалы XL научно-технической конференции по итогам работы профессорско-преподавательского состава СевКавГТУ за 2010 год. Естественные и точные науки. – СевКавГТУ.: 2011. - С. 202-204.

111. Мерченко, Н.Н. Исследование изменения потенциала действия зерна пшеницы / С. П. Пронин, А. Г. Зрюмова, Н. Н. Мерченко, Л. М. Башук, И. А. Гребенникова, А. Н. Каратеева // Ползуновский альманах. - 2010. - № 2. С. 204-206.

112. Мерченко, Н.Н. Экспериментальная установка для исследования потенциала действия зерен пшеницы / Н.Н. Мерченко, С.П. Пронин, А.Г. Зрюмова, Е.А. Долженко // Всероссийская научная школа-семинар «Методы компьютерной диагностики в биологии и медицине 2011» на базе Саратовского государственного университета им. Н.Г. Чернышевского. - 2011. - С.163-166.

113. Мерченко, Н.Н. Экспериментальная установка для исследования потенциала действия зерен пшеницы / М. В. Шереметьев, А. А. Зырянов, Н. Н. Мерченко, А. Г. Зрюмова, С. П. Пронин // Ползуновский альманах. - 2011. - № 1. С. 177-178.

114. Мерченко, Н.Н. Исследование изменения потенциала действия семян пшеницы в зависимости от их всхожести при заданной температуре / Н.Н. Мерченко, С.П. Пронин, А.Г. Зрюмова // Ползуновский альманах. - 2011. - № 1. С. 170-172.

115. Мерченко, Н.Н. Контроль всхожести семян пшеницы при заданной начальной температуре / Н.Н. Мерченко // Материалы Всерос. молодеж. конф. / под ред. проф. Д. А. Усанова. – Саратов: Изд-во Сарат. Университета. - 2012. – С.195-198.

116. Мерченко, Н.Н. Отличительные признаки всхожести семян пшеницы / Н.Н. Мерченко, С.П. Пронин, А.Г. Зрюмова // Материалы IX Всероссийской научно-технической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Наука и молодежь». – Барнаул: изд-во АлтГТУ. - 2012. - 1 с.

117. Мерченко, Н.Н. Исследование воздействия температуры на изменение переменного потенциала зерна пшеницы / Н.Н. Мерченко, С.П. Пронин, А.Г. Зрюмова // Ползуновский альманах. - 2012. - № 2. С. 153-155.

118. Мерченко, Н.Н. Обзор методов контроля всхожести семян пшеницы по изменению мембранного потенциала / Н.Н. Мерченко, С.П. Пронин, А.Г. Зрюмова // Ползуновский альманах. - 2013. - № 1. С. 142-144.

119. Барышева, Н.Н. Разработка модели контроля всхожести семян пшеницы по изменению мембранного потенциала / Н.Н. Барышева, С.П. Пронин // Ползуновский альманах. - 2014. - № 1. С. 103-105.

ПРИЛОЖЕНИЕ А. УСЛОВИЯ ПРОРАЩИВАНИЯ СЕМЯН СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ КУЛЬТУР

ГОСТ 12038—84 С. 18

Продолжение

Культура	Условие проращивания				Срок определения, сут		Дополнительное условие для семян, находящихся в состоянии покоя
	Ложе	Температура, °С		Освещенность	энергия прорастания	всхожесть	
		постоянная	переменная				
1	2	3		4	5	6	7
121. Пажитник сеной (тригонелла) <i>Trigonella foenum-graecum</i> L.	НБ	—	20—30	Т	3	7	
122. Пастернак посевной <i>Pastinaca sativa</i> L.	МБ; НП	—	20—30	Т	10	21	Свет
123. Патиссон <i>Cucurbita pepo</i> L.	МБ; НП	25	20—30	Т	3	10	Свет
124. Пелюшка <i>Pisum arvense</i> L.	ВП; НП	20	—	Т	4	8	Предварительное охлаждение
125. Перец <i>Capsicum annuum</i> L.	НБ; Р; МБ	—	20—30	Т	7	15	Свет; KNO ₃
126. Перилла <i>Perilla ocimoides</i> L.	НБ	—	20—30	Т	4	7	
127. Петрушка кудрявая <i>Petroselinum crispum</i> (Mill.) Nym.	НБ	—	20—30	Т	7	14	Свет; предварительное прогревание
128. Подсолнечник <i>Helianthus annuus</i> L.	Р; НП	25	20—30	Т	3	5	Предварительное прогревание при 30 °С в течение 10 сут
129. Полба двузернянка <i>Triticum dicoccum</i> Fl.	НП	20	—	Т	4	10	Предварительное охлаждение
130. Полевица гигантская (белая) <i>Agrostis gigantea</i> Roth	НБ	—	20—30	С	7	14	Предварительное охлаждение; KNO ₃ ; проращивание при 10 °С — 30 °С в течение 15 сут
131. Полевица тонкая (обыкновенная) <i>Agrostis tenuis</i> Sibth. (<i>A. vulgaris</i> With.)	НБ	—	20—30	С	7	14	Предварительное охлаждение; KNO ₃ ; проращивание при 10 °С — 30 °С в течение 15 сут
132. Полевичка тэф (абиссинская) <i>Eragrostis tef</i> (Zucc.) Trotter	НБ	20	—	Т	3	8	
133. Просо <i>Panicum miliaceum</i> L.	Р; МБ	—	20—30	Т	3	7	
134. Просо африканское (перистоцветник американский) <i>Pennisetum americanum</i> (L.) Schumpp	МБ	—	20—30	Т	4	7	
135. Пшеница мягкая <i>Triticum aestivum</i> L.	НП; МБ; Р; МБ*	20	—	Т	3	7	Предварительное охлаждение; предварительное прогревание; ГК
136. Пшеница твердая <i>Triticum durum</i> Desf.	НП; МБ; Р; МБ*	20	—	Т	4	8	Предварительное охлаждение; предварительное прогревание; ГК

Приложение Б. Акты внедрения

Акт

о внедрении результатов диссертационной работы

Барышевой Надежды Николаевны

«Метод и средство контроля мембранного потенциала зерен пшеницы и его применение для оценки всхожести»

Барнаульский филиал ФГУ «Россельхозцентр» по Алтайскому краю настоящей справкой подтверждает, что Н.Н. Барышева передала отделу семеноводства, расположенному по адресу: 656056, Барнаул, ул. Мало-Тобольская, 6, материалы в виде технического описания метода и средства контроля мембранного потенциала семян пшеницы с целью оценки их всхожести.

Разработанные метод и средство контроля мембранного потенциала зерен пшеницы, как показателя их всхожести, позволяет в сжатые сроки проводить оценку всхожести, учитывая воздействие температуры на результаты исследования, тем самым повышая точность измерения.

Настоящая справка не является финансовым документом и исключает взаиморасчеты.

«07» июля 2015 г.

Начальник Барнаульского филиала
ФГУ «Россельхозцентр»
по Алтайскому краю



Л.П. Гиенко



Утверждаю
Проректор по НИР
Г.Г. Морковкин

Акт

использования результатов диссертационной работы

Барышевой Н.Н. «Метод и средство контроля мембранного потенциала зерен пшеницы и его применение для оценки всхожести»

Комиссия по установлению факта использования результатов диссертационного исследования установила, что на кафедре «Сельскохозяйственные машины» ФГБОУ ВО «Алтайский государственный аграрный университет» в учебном процессе применяются материалы в виде технического описания метода и средства контроля мембранного потенциала семян пшеницы с целью оценки их всхожести.

Разработанный метод позволяет существенно повысить производительность и точность лабораторной оценки всхожести семян пшеницы.

Председатель комиссии:

Декан ИФ

Д.Н. Пирожков

Члены комиссии:

Заведующий кафедрой сельскохозяйственных машин ИФ,

д.т.н., профессор

В.И. Беляев

Ст. Преподаватель кафедры сельскохозяйственных машин,

к.т.н.

А.А. Хижников

06.07.2015г.