

УДК 631.81.033:621.039.8

## РАДИОМЕТРИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СКОРОСТЕЙ ПЕРЕНОСА МЕЧЕННЫХ ЭЛЕМЕНТОВ В РАСТЕНИЯХ

ПРОКОФЬЕВА М. С.

(Кафедра прикладной атомной физики и радиохимии)

С теоретической и практической точек зрения представляет большой интерес установление расстояния, на которое переносится то или иное вещество за определенный период, или времени, необходимого для переноса вещества в ту или иную часть растения.

Литературные данные о кинематике транспорта вещества в растениях весьма немногочисленны. Скорости передвижения питательных веществ в растениях установлены главным образом для их массового потока на основании измерений поперечного сечения проводящих тканей. Концентрации передвигающегося раствора взяты произвольно. За канал передвижения принимались просветы ситовидных трубок или оболочки клеток флоэмы [8]. Полученные различными исследователями данные о скоростях транспорта колеблются в значительных пределах. Линейные скорости передвижения питательных веществ в растениях определялись также по скорости передвижения какого-либо вещества, имеющегося в растении в ничтожных количествах (флюоресцирующие, литий, микроэлементы, некоторые органические и т. п.). Эти вещества выполняли роль неизотопной метки и полученные разными исследователями скорости транспорта вещества значительно различались (2—200 см/ч).

В экспериментальных работах [1, 4, 5, 8—11], посвященных изучению скорости переноса питательных веществ в растениях с помощью радиоактивных изотопов, применялись два метода: 1) пути и скорости элемента в растении определяли по результатам радиометрических измерений концентраций соответствующих изотопов в растениях *in vivo* в выбранных точках через равные промежутки времени после локального введения меченого соединения; 2) перемещение отдельных веществ или их групп изучали, анализируя пробы, отобранные в разных конечных и промежуточных местах. В последнем случае процесс прослеживается менее детально.

С помощью этих методов было показано, что вещества в растениях передвигаются значительно быстрее, чем предполагалось прежде. В частности, у сахарной свеклы, тыквы и некоторых других растений продукты фотосинтеза перемещаются из листьев к корням со скоростью 70—100 см/ч и более [4]. Несколько меньше скорость передвижения ассимилятов к плодам и растущим побегам — 40—60 см/ч. У большинства сельскохозяйственных растений продукты фотосинтеза достигают точек роста и органов запасных отложений уже через 20—40 мин [4]. Наконец, вода, особенно у некоторых древесных растений, проходит по древесине расстояния 6—8 м и более за 1 ч [1].

В качестве радиоактивных индикаторов применяются  $^{32}\text{P}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{99}\text{Mo}$ ,  $^3\text{H}$ ,  $^{65}\text{Zn}$ ,  $^{59}\text{Fe}$ ,  $^{10}\text{B}$ ,  $^{137}\text{Cs}$ ,  $^{86}\text{Rb}$  [11]. Для измерения скорости поступления и передвижения  $\text{CO}_2$  использовался раствор  $\text{Na}_2^{14}\text{CO}_3$  и ее

присутствие было обнаружено в верхних листочках растения уже через несколько минут после помещения корней в раствор, содержащий  $\text{CO}_2$  [5].

Хорошие результаты дает радиоавтография целых растений и их отдельных органов (листьев, корней и т. д.). Однако вначале ее применения при регистрации метки не уточнялось вещество, в состав которых эта метка входит.

Способы исследования кинематики переноса веществ в растениях разнообразны и в ряде случаев недостаточно обоснованны. Анализ различных методов, применяемых в биофизике и физиологии растений для определения, например, скорости переноса веществ, показывает, что прямое слежение за пространственно-временным переносом веществ в растениях (как и вообще в живых организмах) может быть осуществлено лишь с помощью радиоактивных индикаторов. Преимущество этого метода состоит также и в том, что он дает возможность следить за движением вещества в живом организме, проводить опыты *in vivo*.

Наша работа была посвящена дальнейшей разработке радиоиндикаторных радиометрических методов изучения кинематики переноса веществ в растениях. В качестве кинематических величин были взяты время ( $t$ ) и скорость ( $V$ ) переноса.

При моделировании процесса переноса минеральных элементов в растении исходили из общей теории динамики переноса веществ в гетерогенных системах [6]. Было принято, что перенос веществ по проводящей системе растения аналогичен переносу сорбирующихся и сорбирующихся веществ в пористых средах. Соответственно для описания процесса переноса веществ в растениях использовались закономерности динамики переноса в гетерогенных системах — закономерности сорбции и хроматографии.

Технической и методической основой послужили научно-методические разработки по созданию комплекса записывающих одноканальных и регистрирующих многоканальных автоматических радиометров (ЗАР и РАР) [2, 3].

Рассматривалась абстрактная модель поступления веществ из внешней среды в корни и переноса его в растении. Вещество (питательный элемент) в молекулярной или ионной форме через механизмы диффузии, сорбции и активного внутриклеточного метаболического переноса поступает в подвижную жидкую фазу проводящей системы каналов корня, а затем стебля и других органов. В процессе движения оно межфазно распределяется между неподвижными тканями стенок каналов и подвижной фазой, — это и есть процесс динамики сорбции или динамики гетерогенного распределения. Если вещество будет сорбироваться неподвижной фазой (клетками тканей), то согласно теории динамики сорбции средняя скорость движения сорбируемого вещества  $V$  будет меньше средней скорости потока подвижной фазы. В зависимости от характера распределения между подвижной и неподвижной фазами (распределительного отношения  $h$ ) движение фронта каждого вещества будет осуществляться со свойственной ему скоростью.

При разработке радиоиндикаторных, радиометрических методов определения кинематических величин мы использовали два режима динамики сорбции меченых элементов: фронтальный и элютивный.

При фронтальном режиме динамики сорбции через корневую систему в надземную часть растения непрерывно подается меченый элемент. Фронт меченых элементов, поступающих из корней в надземную часть, согласно теории динамики сорбции имеет размытый вид. Распределение концентрации меченого элемента во фронте описывается функциями  $n = f_n(x, t)$  и  $N = f_N(x, t)$ , где  $N$  и  $n$  — концентрации меченого элемента в подвижной и неподвижной фазах соответственно. Теоретически эти функции для растения рассчитать, конечно, нельзя. Однако

их можно установить экспериментально радиоиндикаторным методом. При этом с помощью счетчика-щупа прослеживается распределение меченого элемента в различных точках стебля. Радиометрически можно получить функцию распределения линейной концентрации общей массы меченого элемента  $m = n + N$ , т. е.  $m = f_m(x, t)$ .

Наиболее простым вариантом фронтального метода радиометрического определения скорости переноса меченого элемента вдоль стебля является радиометрическое получение двух функций распределения меченого элемента во времени для двух фиксированных точек стебля  $x_1$  и  $x_2$ , т. е.  $m_1 = f_m(x_1, t)$  и  $m_2 = f_m(x_2, t)$ . По этим кривым определяют моменты появления  $t_1$  и  $t_2$  меченого элемента в двух заданных точках стебля  $x_1$  и  $x_2$ . Соответственно путь переноса будет равен  $L = x_2 - x_1$ , а время переноса  $t = t_2 - t_1$ . Тогда скорость переноса будет  $V = L/t$ . Согласно теории динамики сорбции  $V = f(h)$ .

При элютивном методе радиометрического определения скорости переноса меченого элемента производится инъекция в стебель меченого элемента. Момент инъекции фиксируется ( $t_0$ ). С помощью счетчика-щупа получают кинетическую кривую  $A = f(t)$  на расстоянии  $L$  от точки инъекции. По этой кривой определяют момент прохождения передней точки фронта ( $t_1$ ) и максимум меченой волны ( $t_2$ ). Рассчитывают время передвижения фронта волны  $t_f = t_1 - t_0$  и время передвижения максимума волны  $t_m = t_2 - t_0$ , а затем скорости  $V_f = L/t_f$ ,  $V_m = L/t_m$  соответственно.

Как уже отмечалось, одним из важных преимуществ метода радиоактивных индикаторов является возможность бесконтактного слежения за кинетикой и динамикой процессов переноса и накопления масс в сложных системах. При этом слежение за движением и накоплением меченых элементов, т. е. за радиоактивным индикатором, можно автоматизировать.

На кафедре прикладной атомной физики и радиохимии Тимирязевской академии в течение ряда лет разрабатываются теоретические и практические вопросы автоматической радиометрии, предназначенной для слежения за различными динамическими процессами переноса веществ в хроматографических колонках, в почвах [2]. Нами проводилась также методическая работа по применению автоматических радиометров для слежения за пространственно-временной динамикой переноса меченых элементов на живых организмах [7].

В исследованиях использовались одноканальные и многоканальные записывающие автоматические радиометры. Объектом радиометрии был узкий сегмент стебля растения, в который поступает меченый элемент. Радиометры должны регистрировать кинетику активности радиоактивного индикатора в этом сегменте. Ширина взятого сегмента (слоя) стебля составляла 1 см. Середина сегмента принималась за координату — пункт, для которого прослеживалась кинетика активности радиоиндикатора. Детектором служил так называемый счетчик-щуп — торцовый счетчик Т-25-БФЛ, помещенный в металлический железный корпус с гибким кабелем для подводки высокого напряжения. Окно счетчика закрывалось специальной алюминиевой насадкой толщиной 3 мм со щелью-коллиматором шириной 8 мм. Такая насадка использовалась при регистрации жесткого бета-излучения, например, при работе с радиоактивным изотопом  $^{32}\text{P}$ . Расчеты и проверочные эксперименты показали, что такого рода коллимирование обеспечивает регистрацию бета-излучающего изотопа в слое-сегменте стебля шириной 1 см при подведении счетчика-щупа к этому сегменту. Регистрация бета-частиц из соседних слоев стебля практически исключена. Вопросы теории автоматических радиометров рассмотрены ранее [3].

Точность регистрации кинетики активности радиоактивного индикатора в сегменте стебля зависит от стабильности работы электронной

аппаратуры. Она может уменьшаться из-за нестационарности импульсов, попадающих в интегрирующую цепочку интенсиметра. Дополнительные погрешности возникают также вследствие инерционности записывающего устройства, асинхронности движения ленты и других факторов. Результирующая относительная погрешность измерений при получении кинетических кривых для активности в заданном пункте (сегменте) стебля определяется по формуле:

$$\delta = \sqrt{\delta_{\text{и}}^2 + \delta_{\text{з}}^2 + \delta_{\text{а}}^2}$$

где  $\delta_{\text{и}}$  — погрешность, вызываемая флуктуациями напряжения на конденсаторе;  $\delta_{\text{з}}$  — погрешность из-за нестабильности работы усилителя с формирующим устройством;  $\delta_{\text{а}}$  — погрешность записывающего устройства.

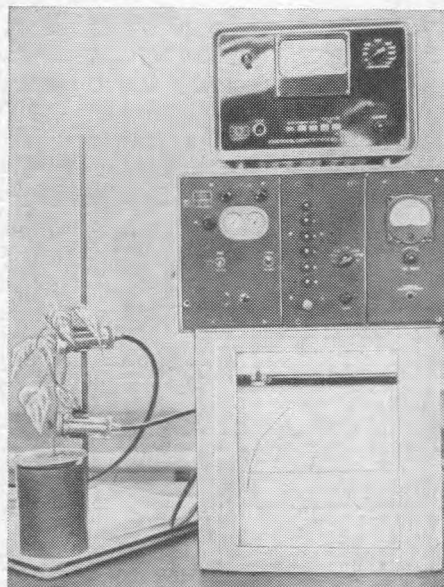


Рис. 1. Общий вид одноканального записывающего автоматического радиометра (ЗАР).

Здесь учтены главные факторы, влияющие на точность регистрации. В качестве усилителя формирования импульсов использовали первые три каскада пересчетной установки Б-2. Через переходной конденсатор емкостью 500 пФ сигнал передается на вход измерителя счета типа ИСС-3 «Тюльпан». В схеме интенсиметра устанавливали нужные емкости интегрирующей цепочки.

В качестве записывающего электронно-механического устройства использовали электронные пишущие потенциометры ЭПП-09 МЗ и КСП-4-М-1 (рис. 1).

Перед непосредственным использованием аппаратуры для радиометрического определения искомых скоростей переноса меченых элементов в опытах *in vivo* была проведена серия модельных опытов по испытанию радиометров. Такая проверка работы радиометров необходима, так как достоверные результаты можно получить только в том случае, если при регистрации активности на ленте самописца воспроизводится с достаточной точностью ход изменения активности в заданном пункте стебля.

После отработки методики в модельных опытах проводились опыты по определению скорости передвижения меченого фосфора ( $^{32}\text{P}$ ) в стеблях подсолнечника и фасоли. Когда длина стебля увеличивалась настолько, что появлялась возможность установить два счетчика, растения переводили на питательный раствор с меченым фосфором. Перед этой операцией подготавливали к работе две одноканальные автоматические установки (ЗАР). Счетчики устанавливали на возможно большем расстоянии друг от друга. Как правило, один счетчик ближе к корневому узлу, на расстоянии 4,5—5 см от корневой шейки, второй — к верхушке растения. Расстояние между пунктами установки счетчиков измеряли масштабной линейкой с точностью до 1 мм. Во избежание попадания в счетчик рассеянного бета-излучения  $^{32}\text{P}$  сосуд с питательным радиоактивным раствором экранировали с помощью листового свинца. ЗАР были включены задолго до введения меченого фосфора в питательный раствор. В течение 20—40 мин записывали фон, что

позволяло с достаточной точностью зафиксировать средний фон установившихся значений.

Момент соприкосновения корней с питательным раствором, содержащим меченый фосфор, отмечали на ленте самописцев. Производили запись хода изменения активности в двух сегментах стебля так, чтобы получить восходящие части кривых кинетики активности  $^{32}\text{P}$ . На основании этих кривых определяли искомую среднюю скорость переноса

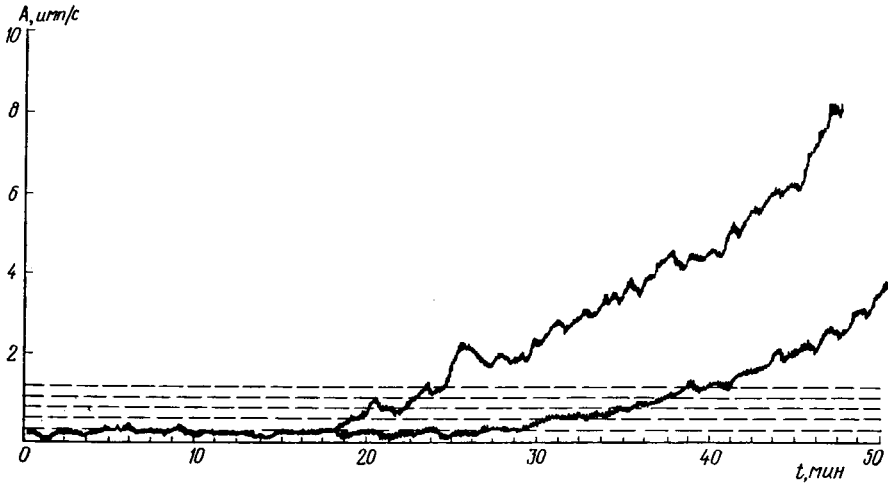


Рис. 2. Записи кинетических кривых нарастания активности  $^{32}\text{P}$  в двух пунктах стебля подсолнечника.

фронта меченого фосфора по стеблю растения. Опыты проводили в 5—10-кратной повторности на растениях разного возраста.

В качестве примера приводим записи кривых нарастания активности  $^{32}\text{P}$  в двух пунктах (нижнем и верхнем) стебля подсолнечника (рис. 2).

При определении скорости передвижения меченого фосфора фронтальным методом время прохождения меченого фосфора на заданное расстояние определяли двумя способами: по моментам, когда активность  $^{32}\text{P}$  начинала превышать фон; на уровне удвоенного фона при записи кинетических кривых  $^{32}\text{P}$ .

Существенным элементом методики регистрации активности  $^{32}\text{P}$  в пунктах стебля растения был подбор режима работы ЗАР. Сюда относятся согласование скорости движения ленты бумаги ЗАР, диапазона активности с кинетикой поступления меченого фосфора.

В опытах с подсолнечником возможность установить счетчикисцупы на расстоянии более 5—10 см появилась по достижении растениями 34-дневного возраста.

В опытах с фасолью измерения были начаты с 14-дневными растениями. У подсолнечника в возрасте от 34 до 68 дней не наблюдалось какой-либо регулярности в изменении средних значений скорости переноса меченого фосфора в стебле. Скорость колебалась от 60 до 180 см/ч, т. е. составляла в среднем около 120 см/ч (табл. 1). Таким образом, у подсолнечника в указанный период не об-

Таблица 1  
Скорость переноса меченого фосфора (см/ч) по стеблю подсолнечника и фасоли в среднем по повторностям (фронтальный метод)

Возраст, Дн	Подсолнечник	Возраст, Дн	Фасоль
34	179±20 (11%)	14	435±56 (13%)
41	110±16 (15%)	21	390±49 (13%)
48	100±14 (14%)	28	404±62 (15%)
54	155±17 (11%)	35	236±12 (5%)
61	65±2 (3%)	42	60±8 (13%)
68	97±15 (15%)	49	67±5 (7%)

наружено существенной зависимости скорости переноса меченого фосфора от возраста растений.

Следует обратить внимание на то, что отмеченные выше средние значения скоростей переноса получены при достаточно большом числе повторностей. Однако сравнение отдельных растений одного и того же возраста показало, что часто разброс этих значений довольно значителен. Можно сказать, что здесь проявляются индивидуальные особенности, зависящие от физиологического состояния каждого растения. Внешне одинаковые растения одного возраста значительно различались по скорости переноса меченого фосфора.

Т а б л и ц а 2

Максимальная скорость переноса меченого фосфора по стеблю подсолнечника при разных уровнях минерального питания (см/ч)

Условия минерального питания	$V_1$	$V_2$
Смесь Кнопа 1/4 нормы	113±3 (1,7%)	130±5 (3,8%)
» » 1/16 »	162±4 (2,4%)	148±16 (10%)
» » 1/32 »	323±28 (8%)	315±28 (8,8%)
Водопроводная вода	372±29 (7,8%)	400±7 (1,5%)

В опытах с фасолью на ранних фазах развития, в возрасте 14—28 дней, скорость переноса меченого фосфора составляла 400—500 см/ч. В дальнейшем она падала, и у 42—49-дневных растений была уже около 60 см/ч.

Сильно различались по скорости переноса меченого фосфора и отдельные растения одного возраста при прочих равных условиях.

Для определения зависимости скорости переноса меченого фосфора в стеблях подсолнечника от уровня минерального питания растения

Т а б л и ц а 3

Скорость переноса меченого фосфора в стебле фасоли 30-дневного возраста

Варианты опыта			$V_{ср}$ , см
	$t$ , мин	$L$ , см	
Водопроводная вода	1,9	15	459±21 (4,5%)
Водопроводная вода с добавлением фосфора за сутки до проведения опыта	3,3	15	280±15 (5%)

выращивали на водопроводной воде и на 1/32, 1/16 и 1/4 (контроль) нормы смеси Кнопа.

Для определения активности  $^{32}P$  использовали многоканальный РАР. Появление фронта меченого фосфора регистрировали в трех пунктах стебля: на расстоянии 4—6 см от корневой шейки, 15—20 и 30—40 см от первого пункта.

Таким образом, имелась возможность выяснить, равномерно ли перемещается меченый фосфор на различных участках стебля (скорости  $V_1$  и  $V_2$ ). На двух наблюдаемых участках стебля (нижнем и верхнем) скорость переноса оказалась практически одинаковой (табл. 2).

Меченый элемент перемещался по основной части стебля довольно равномерно. Уровень минерального питания оказывал существенное влияние на скорость переноса: со снижением уровня питания она увеличивалась. При 1/4 нормы Кнопа (контроль, достаточный уровень питания) составляла примерно 120 см/ч.

Для вариантов с 1/32 нормы Кнопа и с водопроводной водой искомая скорость достигала 300—400 см/ч, т. е. была в 3—4 раза больше, чем в других вариантах минерального питания.

Чтобы определить, влияет ли на искомую скорость переноса содержание в питательном растворе всех элементов минерального пита-

ния или каких-либо определенных элементов, из смеси Кюпа исключали два — фосфор и азот. Отсутствие фосфора существенно повлияло на скорость переноса меченого фосфора, она увеличилась в 1,5—2 раза, исключение же из питательной смеси азота не сказалось на искомой скорости. Этот вопрос требует специального изучения.

Зависимость скорости переноса меченого фосфора от наличия его в питательной среде наблюдалась также в опыте с фасолью. Растения выращивали на водопроводной воде, а затем за сутки до измерений переносили на водопроводную воду с добавкой фосфора (33,41 мг  $P_2O_5$  в форме  $KH_2PO_4$  на 0,9 л воды). Скорость переноса меченого фосфора в стеблях при этом уменьшалась (табл. 3). Результаты этого опыта подтвердили полученные нами данные о зависимости скорости переноса фосфора от уровня фосфорного питания.

Элютивный метод (метод меченой волны) был использован для определения максимальной ( $V_1$ ) и средней ( $V_2$ ) скорости переноса меченого фосфора в стеблях подсолнечника и фасоли разного возраста (рис. 3). Использовался подсолнечник в возрасте 26—67 дней и фасоль — 28—63 дней.

Значения максимальных скоростей переноса, полученные фронтальным и элютивным методами, значительно расходятся. Например, в стеблях подсолнечника при фронтальном методе определения они составляли в среднем 60—180 см/ч, а при элютивном (инъекция в стебель) — 400—800 см/ч (табл. 4).

Средние скорости переноса, определяемые по скорости движения максимума меченой волны, оказались ближе к максимальным скоростям, устанавливаемым фронтальным методом.

При сравнении результатов определения искомых скоростей фронтальным и элютивным методами необходимо учитывать не только методические и технические особенности методов, но и некоторые биохимические аспекты.

Можно предположить, что фосфор, поступающий из корневой системы в стебель, более разнообразен по химическим формам, чем фосфор, вводимый в стебель путем инъекции. В первом случае, когда он поступает через корни, можно ожидать, что значительная его часть перемещается в форме неорганических и органических полифосфатов, что мо-

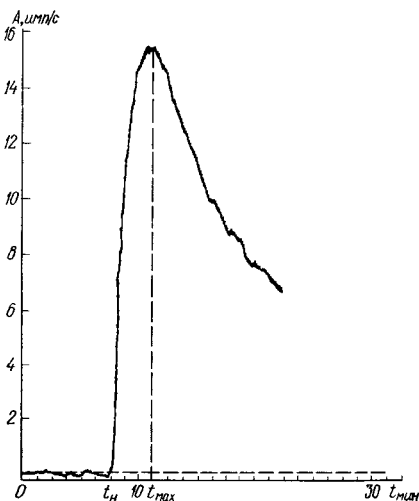


Рис. 3. Типичная кривая прохождения «волны» меченого фосфора ( $^{32}P$ ) в стебле подсолнечника.

Таблица 4

Определение максимальной ( $V_1$ ) и средней ( $V_2$ ) скоростей переноса меченого фосфора (см/ч) в стебле подсолнечника и фасоли методом меченой волны при разном возрасте растений (элютивный метод)

Возраст, дн	Подсолнечник		Возраст, дн	Фасоль	
	$V_1$	$V_2$		$V_1$	$V_2$
26	500±48	190±20	28	654±45	115±16
33	550±45	115±15	35	387±25	90±9
40	397±66	121±8	42	329±25	114±8
45	533±88	145±28	49	268±12	64±4
52	473±81	217±18	56	292±18	114±9
60	837±62	307±62	63	230±17	80±5

жет приводить к увеличению сорбируемости и потере подвижности этого элемента в проводящей системе. Во втором случае, когда фосфор вводится путем инъекции, большая часть его остается в форме неполимеризованных фосфат-ионов, которые могут иметь меньшую сорбируемость и большую скорость перемещения.

В опытах с 35—63-дневной фасолью также не отмечено какой-либо регулярной зависимости скоростей  $V_1$  и  $V_2$  от возраста. Скорости  $V_1$  для фасоли составляют 200—600 см/ч,  $V_2$  — 60—120 см/ч.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Ахромейко А. И., Журавлева М. В. Изучение скорости водного тока у древесных растений. «Физиол. растений», 1957, т. 4, вып. 2, с. 164—169. — 2. Гарнецкий В. А., Кобазев Е. И., Рачинский В. В., Фурман А. О. Вариант автоматической установки для записи выходных кривых распределения меченых веществ при хроматографическом анализе. — «Изв. ТСХА», 1963, вып. 4 (53), с. 224—229. — 3. Кияновский А. М. К теории колоночных радиохроматографов. «Изв. ТСХА», 1974, вып. 2, с. 181—185. — 4. Курсанов А. Л. Транспорт ассимилятов в растении. М., «Наука», 1976. — 5. Курсанов А. Л., Крюкова Н. Н., Вартапетян Б. Б. Движение по растению углекислоты, поступающей через корни. «Докл. АН СССР», 1952, т. 85, № 4, с. 834. — 6. Прокофьева М. С. Радиометрические методы исследования кинематики переноса меченых элементов в растениях. Автореф. канд. дис. М., 1974. — 7. Рачинский В. В. Введение в общую теорию динамики сорбции и хроматографии. М., «Наука», 1964. — 8. Рачинский В. В., Фурман А. О., Меракчийска М., Прокофьева М. С. Определение скорости переноса меченого фосфора с помощью автоматических регистрирующих радиометров. «Изв. ТСХА», 1968, вып. 1, с. 94—99. — 9. Crafts A. S. «Plant Physiol.», 1931, N 6, p. 1—38. — 10. Ferguson I. B., Bollard E. G. «Annals of botany», 1976, vol. 40, N 169, p. 1057—1065. — «tany», 1976, N 38, p. 71—80. — 11. Marschner H. «Progress in botany», 1976, N 38, p. 71—80. — 12. Stout P. R., Hoagland D. R. «American J. Bot.», 1936, vol. 26, p. 320—324.

*Статья поступила 20 мая 1977 г.*

#### SUMMARY

Two regimes of the dynamics of labelled elements sorption—frontal and elutive (“tracer wave”) ones—have been used with the application of single-channel and multichannel recording automatic radiometers. Sunflower and beans were used as experimental plants.

It has been found by means of the frontal method that the rate of transportation of the labelled phosphorus along the sunflower is 60—180 cm/hour and does not vary with age. In beans it makes 400(500 cm/hour at the early stages of growth, falling as low as 60 cm/hour later on.

The elutive method gives higher values (400—500 cm/hour) of the maximum transportation rate than the frontal method (100—200 cm/hour).