

УДК 581.134:631.811.4

ПРИМЕНЕНИЕ КОМПАРТМЕНТ-АНАЛИЗА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПОТОКОВ ИОНОВ КАЛЬЦИЯ В КЛЕТКАХ КОРНЯ КУКУРУЗЫ

М. Н. БАРАБАНЩИКОВ, Ю. Я. МАЗЕЛЬ, Б. И. ШКАРИН
(Кафедра прикладной атомной физики и радиохимии)

Кальций играет большую роль в минеральном питании растений, однако литературных данных о его электрохимическом состоянии в клетке пока явно недостаточно. Важнейшими электрохимическими параметрами клетки являются разность потенциалов на мембране, активности ионов и величины их индивидуальных потоков. Значения этих параметров используются при оценке распределения иона в клетке — уравнение Уссинга — Теорелла, при помощи которого можно определить, пассивно или активно происходит транспорт иона через мембрану.

Численные значения потоков на мембранах могут быть получены при использовании метода меченых атомов и компартмент-анализа.

В литературе имеются данные, полученные с помощью компартмент-анализа, для ряда высших растений и ионов кальция, хлора и натрия [1, 6, 7]. Целью настоящей работы были оценка различных методов определения и расчет потоков иона кальция через клетки коры корня кукурузы.

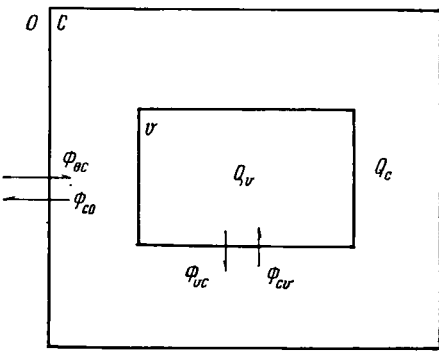


Рис. 1. Трехкомпарментальная модель клетки.

Для описания потоков ионов корней наиболее часто используется трехкомпарментальная модель [1, 5, 2] (рис. 1). При ее построении предполагалось, что в клетке выделяются индивидуальные компартменты, образующие последовательные ряды: внешний раствор-клеточная стенка \rightleftharpoons цитоплазма \rightleftharpoons вакуоль. Объем вакуолей намного больше объема, занимаемого цитоплазмой. Ткань может находиться как в равновесном ($\Phi=0$), так и в неравновесном состоянии ($\Phi \neq 0$), где Φ — общий поток через систему.

В условиях равновесия противоположные потоки на мембранах могут быть равны $\Phi_{oc} = \Phi_{co}$; $\Phi_{cv} = \Phi_{vc}$ (индексы o, c, v — относятся к внешнему раствору, цитоплазме и вакуоли) или на каждой из мембран существует поток $\Delta_1 = \Phi_{co} - \Phi_{oc}$ для цитоплазмы и $\Delta_2 = \Phi_{cv} - \Phi_{vc}$ для вакуоли, но при условии, что $\Delta_1 - \Delta_2 = 0$ и $\Phi = 0$.

Поведение трехкомпарментальной системы в работе Скотта [5] описывается следующими уравнениями:

$$\begin{cases} \frac{dY_c}{dt} = \Phi_{oc}s_o + \Phi_{vc}s_v - (\Phi_{co} + \Phi_{cv})s_c, & (1) \\ \frac{dY_v}{dt} = \Phi_{oc}s_o - \Phi_{co}s_c, & (2) \end{cases}$$

где Φ — потоки между компартментами; s — доля массы меченого элемента от общего содержания элемента; Y_c — масса меченого элемента в цитоплазме; Y — сумма масс меченого элемента в вакуоли и цитоплазме.

Полагая, что s_o и потоки не зависят от времени, величины s_v , s_c могут быть исключены из системы этих уравнений. Очевидно, s_v и s_c станут изменяться менее значительно только спустя какой-то промежуток времени, однако такое допущение единственный путь приближенного решения данного уравнения. В результате получается следующее дифференциальное уравнение второго порядка:

$$\begin{aligned} \frac{d^2Y}{dt^2} + \frac{dY}{dt} \left[\frac{\Phi_{oc} + \Phi_{vc}}{Q_c} + \frac{\Phi_{vc}}{Q_v} \right] + Y \frac{\Phi_{co}\Phi_{vc}}{Q_v Q_c} = \\ = \Phi_{oc} s_o \left[\frac{\Phi_{oc} - \Phi_{co} + \Phi_{vc}}{Q_c} + \frac{\Phi_{vc}}{Q_v} \right], \end{aligned} \quad (3)$$

где $s = Y/Q$; Q — общая масса элемента в компартменте.

Пример разложения экспериментальной кривой кинетики выхода меченого иона из ткани на компартментальные составляющие показала Мак Робби [3]. Как видно из рис. 2, с увеличением времени кривая кинетики вымывания меченого кальция из корней кукурузы приближается к прямой. Экстраполяция к точке $t=0$ отсекает по оси y отрезок, который соответствует исходному количеству меченого элемента в данном компартменте, а тангенс угла наклона прямой характеризует константу кинетики выхода (k). Первая экстраполяция дает значения параметров, относящихся к вакуоли [2, 3]. В результате вычитания из исходной суммарной кривой кривой выхода элемента из вакуоли остается кривая, описывающая выход меченого иона из других компартментов (цитоплазмы и свободного пространства).

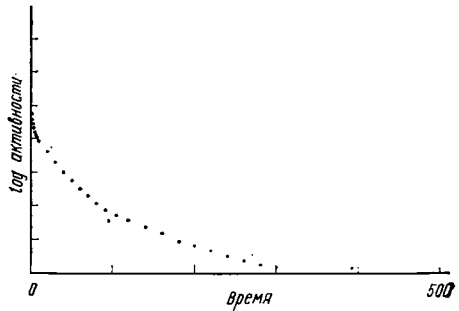


Рис. 2. Кинетическая кривая выхода меченого иона кальция из корня кукурузы.

Таким образом, в результате графического анализа кривой для каждого компартмента получают значения исходного количества меченого иона в компартменте (Y) и константы кинетики выхода из него (k).

Из уравнения (3) и данных графического анализа при условии $\Phi = 0$, $\Phi_{oc} = \Phi_{co}$ и $\Phi_{cv} = \Phi_{vc}$ получаем (метод I):

$$\Phi_{oc} = \frac{k_c S + k_v L}{s_o}, \quad (4)$$

$$\Phi_{vc} = -\frac{k_c k_v}{s_o} [SL (k_c S + k_v L)] \cdot \left[\frac{(k_c - k_v)^2}{(k_c^2 S + k_v^2 L)^2} \right] \quad (5)$$

$$Q = \frac{S + L}{s_o}, \quad (6)$$

$$Q_c = \frac{(k_c S + k_v L)^2}{(k_c^2 S + k_v^2 L) s_o}, \quad (7)$$

где $S = Y_c / [1 - \exp(-k_c T)]$ и $L = Y_v / [1 - \exp(-k_v T)]$

С помощью уравнений (4) и (5) определяются потоки на плазмалемме и тонопласте соответственно, а с помощью уравнений (6) и (7) — содержание элемента в клетке и цитоплазме.

Когда потоки изменяются во времени или существует общий поток ($\Phi \neq 0$), нельзя получить общего решения исходной системы уравнений. В этом случае можно предположить, что ткань находится в квази-стационарном состоянии (за исключением первых моментов поступления меченого иона в цитоплазму, когда s_c значительно изменяется), т. е.

$$\frac{dY_c}{dt} \simeq 0, \quad (8)$$

$$s_c \simeq \frac{\Phi_{oc}s_o + \Phi_{vc}s_v}{\Phi_{co} + \Phi_{cv}}. \quad (9)$$

С учетом этого уравнение (1) будет иметь следующий вид:

$$\frac{\frac{dY_c}{dt}}{Y_c - \frac{Q\Phi_{vc}s_v}{\Phi_{co} + \Phi_{vc}}} = - \left[\frac{\Phi_{co} + \Phi_{cv}}{Qc} \right] dt, \quad (10)$$

где $k_c = (\Phi_{co} + \Phi_{cv})/Qc$.

Решением уравнения (10) служит:

$$Y_c = \frac{Qc [\Phi_{vc}s_v + \Phi_{oc}s_o \exp(-k_c T)]}{\Phi_{co} + \Phi_{cv}}, \quad (11)$$

и поэтому

$$\frac{dY}{dt} = - \frac{\Phi_{co}\Phi_{vc}s_v}{\Phi_{co} + \Phi_{cv}} - \frac{\Phi_{oc}\Phi_{co}s_o}{\Phi_{co} + \Phi_{cv}} \exp(-k_c T). \quad (12)$$

Уравнения, связывающие данные графического анализа с величинами потоков в условиях $\Phi \neq 0$, следующие (метод II):

$$\Phi_{oc} = \frac{k_c Y}{s_o} + \frac{Y_v}{s_o T}, \quad (13)$$

$$\Phi_{vc} = (1 + \alpha) (\Phi_{in} - \Phi), \quad (14)$$

$$Q_c = \frac{(1 + \alpha) \left(\frac{k_c Y_c}{s_o} + \Phi_{in} - \Phi \right)}{k_c}, \quad (15)$$

$$Q = \frac{\Phi_{in} - \Phi}{k_v} + \frac{Y_c (1 + \alpha)}{s_o}, \quad (16)$$

$$\alpha = \frac{s_o \Phi_{in}}{k_c Y_c}, \quad (17)$$

$$\Phi_{in} = \frac{Y_v}{s_o T}. \quad (18)$$

Величина общего содержания элемента при использовании уравнений (13)—(18) определяется расчетным путем. Ее сравнение со значением, полученным химическим методом, позволяет оценить используемую модель.

Крам [2], рассматривая также трехкомпарментальную модель в стационарных условиях ($\Phi = 0$), приводит следующие уравнения (метод III):

$$\Phi_{co} = k_c Y_c + k_v Q_v, \quad (19)$$

$$\Phi_{vc} = \Phi_{cv}' + \Phi_{co} - \Phi_{oc}, \quad (20)$$

$$\Phi_{oc} = \frac{k_c Y_c}{s_o} + \frac{Y_v}{s_o T}, \quad (21)$$

$$\Phi_{cv} = \frac{(k_v Q_v + k_c Y_c) Y_v}{k_c Y_c T}, \quad (22)$$

$$Q_c = \frac{k_c}{\Phi_{co} + \Phi_{cv}}. \quad (23)$$

Уравнения (19) и (21) позволяют вычислить потоки на плазмалемме, (20) и (22) — потоки на тонопласте, (23) — содержание элемента в цитоплазме. Полученные уравнения относятся к условиям ($\Phi=0$), когда общий поток равен нулю, и разность потоков на каждой из мембран равна Δ , но $\Phi_{co}-\Phi_{oc}=\Delta_1$; $\Phi_{vc}-\Phi_{cv}=\Delta_2$; $\Delta_1-\Delta_2=\Phi=0$. Это видно из уравнения (20): если $\Phi_{vc}-\Phi_{cv}=\Phi_{co}-\Phi_{oc}=0$, то $\Phi_{co}-\Phi_{oc}=0$ и $\Phi_{vc}-\Phi_{cv}=0$, $\Phi_{oc}=\Phi_{co}$, но в уравнениях (19)–(23) $\Phi_{oc}\neq\Phi_{co}$, значит $\Phi=\Delta_1-\Delta_2=0$.

При использовании уравнений метода III надо знать величину концентрации ионов в вакуоли (Q_v), которую можно получить, исходя из величины общего содержания иона. Сравнение значений потоков и содержания ионов из уравнений метода III показывает, что произведение $k_c Y_c$ обычно меньше, чем Y_v/T . Количество меченого элемента, накопленного в вакуоли, измеряется наиболее точно, и величина потока из внешнего раствора в цитоплазму наиболее достоверна — см. уравнение (21).

Рассмотренные методы расчета (I–III) используются при различных условиях трехкомпарментальной модели. Величина потока из внешнего раствора в цитоплазму (Φ_{oc}), определенная методами II и III, будет одинаковой, поскольку уравнение (13) тождественно уравнению (21). С помощью методов II и III можно рассчитать потоки на каждой из мембран (т. е. $\Phi_{oc}\neq\Phi_{co}$ и $\Phi_{cv}\neq\Phi_{vc}$), что позволяет использовать полученные значения для расчетов по уравнению Уссинга — Теорелла.

Методика

Семена кукурузы сорта Стерлинг проращивали в течение двух дней на влажной фильтровальной бумаге при температуре 28°. Корни интактных проростков для насыщения помещали в среду, содержащую меченый кальций (^{45}Ca). Состав среды следующий: кальций и калий — 10^{-4}M или 10^{-3}M , глюкоза — 10 г/л. Время насыщения — 4 ч. Удельная активность раствора — 0,1–0,25 мкКи/мл, удельная активность меченого кальция 1,7 мкКи/мм. После насыщения отрезали участки корня 0–3,0 или 1,5–3,0 см и отмывали их немеченым раствором того же состава не менее 6 ч через промежутки времени, которые постепенно увеличивали от 1 мин в начале до 20 мин в конце процесса отмывания. Количество ионов кальция, вымытого из ткани, определяли по радиоактивности промытого раствора на жидкостно-сцинтилляционном счетчике Марк II с применением жидкого сцинтиллятора Брея. Эффективность счета для ^{45}Ca — около 70%. Для измерения остаточной активности в корнях после окончания опыта корни высушивали и помещали во флаконы с жидким сцинтиллятором. При расчетах вводился поправочный коэффициент на самопоглощение. Графическое разложение экспериментальной кривой и расчеты проводились по составленной нами программе на микрокомпьютере ИН-90 фирмы «Интертехник».

Результаты

Данные, полученные при графическом анализе исходной кинетической кривой выхода меченого иона, использовали для вычисления потоков и содержания иона всеми тремя рассмотренными выше методами. Расчеты проводили для участков корня 0–3,0 и 1,5–3,0 см, т. е. в зоне корневых волосков (табл. 1–5).

Масса иона кальция в корне кукурузы при определении методом пламенной фотометрии составила 8 ± 1 мкг на 100 мг сырой массы. По литературным данным, она колеблется от 5 до 20 мкг на 100 мг сырой массы [2, 7]. Поскольку содержание элемента в вакуоли неизвестно, при расчетах значений потоков с помощью уравнений метода III

брали его различные концентрации в вакуоли (Q_v) как процент от общего содержания. В расчетах по методу II учитывалось содержание иона в свободном пространстве, которое мы принимали равным 30%. Из уравнения (16) можно получить численные значения общего потока.

Т а б л и ц а 1

Величины потоков и содержание иона кальция в участке корня 0—3,0 см. Метод I

Концентрация, М	Φ_{co}	Φ_{vc}	Q_c	Q	$t_{1/2}$, мин		
	мэкв/кг·ч		мэкв/кг		вакуоль	цитоплазма	свободное пространство
10^{-4}	0,61	0,065	0,36	0,84	316	23	0,8
10^{-3}	0,63	0,17	0,69	1,25	220	32	1,6

Т а б л и ц а 2

Величины потоков и содержание иона кальция в участке корня 0—3,0 см. Метод II

Q_v мэкв/кг	Концентрация*	Φ_{vc}	Φ_{co}	Φ_{cv}	Q_c	Q
		мэкв/кг·ч			мэкв/кг	
6,0	1	1,22	1,4	0,25	1,0	7,0
	2	0,77	1,57	0,13	0,9	6,9
4,0	1	0,81	1,05	0,2	0,76	4,76
	2	0,51	1,44	0,11	0,76	4,76
2,8	1	0,57	0,84	0,15	0,61	3,41
	2	0,36	1,2	0,1	0,7	3,5
1,08	1	0,22	0,54	0,09	0,39	1,47
	2	0,14	1,0	0,09	0,57	1,65

* В этой таблице и в табл. 3: 1 — концентрация ионов — 10^{-4} М; $\Phi_{oc}=0,42$ мэкв/кг·ч; 2— 10^{-3} , $\Phi_{oc}=0,94$ мэкв/кг·ч.

Т а б л и ц а 3

Величины потоков и содержание иона кальция в участке корня 0—3,0 см. Метод III

Q , мэкв/кг	Концентрация	Φ_{vc}	Φ_{co}	Φ_{cv}	Φ	Q_c , мэкв/кг
		мэкв/кг·ч				
6,0	1	0,17	1,35	2,1	0,93	0,98
	2	0,7	1,52	1,28	0,57	0,86
3,5	1	0,66	0,92	1,16	0,5	0,66
	2	0,38	0,22	0,66	0,3	0,7
2,0	1	0,35	0,65	0,59	0,24	0,47
	2	0,19	1,05	0,3	0,1	0,6
1,6	1	0,27	0,58	0,44	0,17	0,42
	2	0,14	1,0	0,2	0,56	0,57

В отрезке корня длиной 3,0 см при условиях равновесия общее содержание иона (Q) при обеих концентрациях равнялось примерно 1 мэкв/кг·ч или было намного меньше значения, получаемого химическим путем. Это говорит о том, что клетки корня не находятся в условиях равновесия. В данном случае увеличение концентрации в 10 раз приводило к изменению потока на тонопласте на порядок. Величина

потока на плазмалемме существенно не изменилась. Величины потока из внешнего раствора в цитоплазму, полученные при вычислении методами II и III, оказались близкими, поскольку уравнения для их расчета тождественны. При переходе от стационарных условий ($\Phi=0$) к нестационарным ($\Phi \neq 0$) величина потока из цитоплазмы в вакуоль увеличивалась. Вследствие этого изменялись отношения потоков на тонопласте. Как следует из табл. 2 и 4, отношения потоков на мембранах при вычислении по методу II оставались постоянными, несмотря на различные условия; изменяемым параметром была величина Q_v . Отношение пото-

Т а б л и ц а 4

Величины потоков и содержание иона кальция в участке корня 1,5—3,0 см. Метод II

Q_v , мэкв/кг	Концентрация*	Φ_{vc}	Φ_{co}	Φ_{cv}	Q_c	Q
		мэкв/кг·ч			мэкв/кг	
3,0	1	0,73	0,91	0,2	0,62	3,6
	2	0,87	1,32	0,5	1,1	4,1
1,5	1	0,36	0,61	0,13	0,42	1,92
	2	0,44	1,0	0,37	0,83	2,33
0,8	1	0,19	0,47	0,1	0,32	1,12
	2	0,23	0,86	0,31	0,7	1,5

* В этой таблице и в табл. 5: 1 — концентрация иона 10^{-4} М, $\Phi_{oc}=0,38$ мэкв/кг·ч; 2— 10^{-3} М, $\Phi_{oc}=0,95$ мэкв/кг·ч

Т а б л и ц а 5

Величины потоков и содержание иона кальция в участке корня 1,5—3,0 см. Метод III

Q , мэкв/кг	Концентрация	Φ_{vc}	Φ_{co}	Φ_{cv}	Φ	Q_c , мэкв/кг
		мэкв/кг·ч				
3,0	1	0,67	0,78	1,16	0,49	0,6
	2	0,7	1,2	0,96	0,26	1,0
2,8	1	0,63	0,83	1,07	0,45	0,56
	2	0,64	1,16	0,86	0,22	0,95
1,2	1	0,24	0,51	0,37	0,13	0,35
1,0	1	0,19	0,47	0,28	0,14	0,32

ков Φ_{oc}/Φ_{co} и Φ_{cv}/Φ_{vc} оказалось меньше 1. При расчетах методом III, где изменяемым параметром была величина общего содержания, отношения потоков также были одинаковы, но Φ_{oc}/Φ_{co} меньше 1, а Φ_{cv}/Φ_{vc} больше 1. Полученные отношения потоков характерны как для отрезка корня длиной 3,0 см, так и для зоны корневых волосков.

Таким образом, при переходе от стационарных к нестационарным условиям отношения потоков иона изменяются только для тонопласта. Вычисленные величины потоков и содержание иона кальция в цитоплазме аналогичны полученным Маклоном [3]. Объектом в работе названного исследователя служили отрезки корня длиной 4 см. Расчеты проводились по методу III. Как видно из приведенных данных, для концентрации 10^{-4} М при значении Q больше 1,6 мэкв/кг·ч (табл. 3) и Q больше 1,2 мэкв/кг·ч (табл. 5) величина потока Φ_{cv} оказалась больше, чем Φ_{oc} . Величина Q характеризует общее содержание элемента в корне. Поскольку кальций в клетке находится преимущественно в связанном состоянии, использование в расчетах данных о его общем химическом содержании приводит к получению завышенных результатов.

Таким образом, использованные методы расчета применимы для различных условий трехкомпарментальной модели. В рассмотренной модели еще не учтены такие процессы, как транспорт в стель, возможность обратного поступления иона в раствор через срезанные концы отрезков корней и др. Уравнения метода II применимы для стационарных, а метода III — нестационарных условий. Отношения потоков на плазмалемме, вычисленные двумя методами, при различных условиях всегда меньше 1; для тонопласта отношение потоков при стационарных условиях было меньше 1, а для нестационарных — больше 1. Поскольку существование нестационарных условий в клетках более вероятно, применение уравнений метода II является наиболее корректным.

Заключение

При расчетах потоков иона кальция для корня в первом приближении можно использовать трехкомпарментальную модель в неравновесных условиях. В этих же условиях для отрезка корня длиной 3,0 см и для зоны корневых волосков отношение потоков на плазмалемме было меньше 1, а для тонопласта — больше 1.

Авторы выражают искреннюю благодарность за научное руководство и помощь в проделанной работе доктору химических наук В. В. Рачинскому.

ЛИТЕРАТУРА

1. Cram D. "Austr. J. Biol. Sci.", 1963, vol. 24, N 3, p. 633—642. — 2. Cram D. — "BBA", 1969, vol. 173, p. 213—218. — 3. Macklon F. "Planta", 1975, vol. 122, N 2, p. 131—142. — 4. Macklon F. "Planta", 1975, vol. 122, N 2, p. 142—150. — 5. Pitman J. M. "Austr. J., Biol. Sci.", 1963, vol. 16, N 3, p. 647—653. — 6. Scott G. "Austr. J. Biol. Sci.", 1969, vol. 22, N 3, p. 585—593. — 7. Pitman J. M. "Austr. J. Biol. Sci.", 1971, vol. 24, N 2, p. 407—412.

Статья поступила 17 июля 1978 г.

SUMMARY

Different methods of determination and calculation of the calcium ion fluxes through the cells of the root of corn were compared. Using Scott and Cram equations and the results of graphical analysis of the curve of the kinetics of the yield of labelled calcium from the tissue, one may calculate the ion fluxes both in stationary and in non-stationary conditions for individual compartments. Calculating the calcium ion flows in the root, one may use a tricompartamental model for non-stationary conditions. Under the same conditions for a root portion of 3.0 cm in length and for a root hair zone the ratio of flows on the plasmalemma was less than 1, and for the tonoplast — more than 1.