

УДК 581.18

О ПУТЯХ ПРОВЕДЕНИЯ ВОЗБУЖДЕНИЯ В ВЫСШИХ РАСТЕНИЯХ

К. И. КАМЕНСКАЯ

(Кафедра физиологии растений)

Большинство исследователей, изучающих процессы возбуждения, придерживаются мнения, что анатомическим субстратом передачи возбуждения являются ткани проводящих пучков [1, 7, 8, 18, 19]. Но вместе с тем существуют различные точки зрения относительно каналов проведения возбуждения [3, 8, 19]. Так, одни авторы [8, 19] указывают на возможность передачи возбуждения только по паренхимным клеткам флоэмы и протоксилемы, другие [9] высказывают предположение об участии в проведении возбуждения и основной паренхимы.

Безусловно, указанных работ явно недостаточно для того чтобы обоснованно судить о каналах связи в растениях. Кроме того, существует ряд фактов, объяснить которые на основе общепринятой концепции (потенциалы действия распространяются только проводящим пучкам) не представляется возможным. Например, не ясно, каким образом практически мгновенно раздражение передается от эпидермиса к проводящим пучкам при раздражении эпидермиса, как происходит синхронизация деятельности отдельных пучков, почему параметры потенциалов действия, отводимых интра- и экстраклеточно, одинаковы, почему соскабливание черешка (при этом удаляются эпидермис и часть коры) приводит к уменьшению скорости распространения потенциалов действия.

Мы перечислили лишь небольшую часть фактов, противоречащих общепринятой концепции. Но это уже позволяет заключить, что, видимо, вопрос о каналах связи в высших растениях далек от своего окончательного решения.

В своей работе мы поставили задачу получить экспериментальные данные, подтверждающие или опровергающие сложившееся к сегодняшнему дню представление о путях проведения возбуждения. Были запланированы следующие опыты:

1 — интра- и экстраклеточная регистрация биоэлектрической реакции паренхим-

ных и эпидермальных тканей (считающихся невозбудимыми) интактных растений в ответ на раздражение;

2 — экстраклеточная регистрация на изолированных фрагментах стебля;

3 — идентификация путей проведения возбуждения по изменению амплитуды ПД под воздействием радиально перемещающегося Ca^{2+} .

Методика

Опыты проводили с тыквой (*Cucurbita pepo*) сорта Грибовская кустовая и подорожником (*Plantago maior* L.).

Тыкву выращивали в лаборатории искусственного климата Тимирязевской академии в факторстатных условиях под люминесцентными лампами ДС при круглосуточной температуре воздуха $+20^\circ$ на 16-часовом дне. Интенсивность освещения 7000 лк. Относительная влажность воздуха 60—75%. В качестве питательного раствора использовали раствор Кнопа. Опыты проводили с 2-недельными растениями, имеющими два полностью развернувшихся листа.

Подорожник использовали только для исследований на изолированных пучках. Этот объект был выбран в связи с тем, что проводящие пучки подорожника легко изолируются. При удачной препаровке можно получить изолированный проводящий пучок длиной до 5 см. Брели неповрежденные листья одинаковых размеров. Растения выращивались в естественных условиях.

В большинстве опытов раздражение производили, перерезая стебель в зоне корневой шейки ножницами с изолированными ручками.

Биопотенциалы отводили интра- и экстраклеточно. Механическая часть установки для микроэлектродных измерений была смонтирована на базе микроманипулятора ММ-1. Мембранный потенциал измеряли обычными микроэлектродами (диаметр

кончика которых около 1 мкм), заполненными 3-молярным раствором KCl (стекло пирекс или ОС-2 с внутренней капиллярностью). Микроэлектрод соединяли с Ag/AgCl полуэлементами типа ЭВЛ-1М. С полуэлементов сигнал поступал на измерительный прибор РН-340 и регистрировался на милливольтметре ЕРР-3Т. Введение микроэлектрода контролировали визуально.

В опытах с изолированным эпидермисом стебель надрезали в районе семядолей и снимали полоску эпидермиса шириной 3—4 мм и длиной 5 см. Затем ее помещали в камеру на фильтровальную бумагу, смоченную искусственной прудовой водой, внутренней стороной вниз. Камера представляет плексигласовый параллелепипед, разделенный на 5 отсеков (рис. 1). Дли-

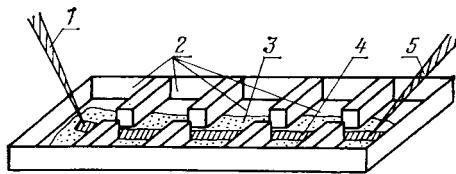


Рис. 1. Камера для работы с изолированным эпидермисом.

1 — измерительный электрод; 2 — отсек камеры; 3 — влажная фильтровальная бумага; 4 — полоска эпидермиса; 5 — электрод сравнения.

на каждого отсека 1 см. В районе соединения отсеков полоска фильтровальной бумаги прерывалась, и в этом месте эпидермис покрывали сверху и снизу вазелиновым маслом. Микроэлектрод находился в 1-м отсеке. Раздражение осуществляли через 1 ч после препаровки и через 15 мин после выхода разности потенциалов на стационарный уровень. При экстраклеточном отведении оба электрода располагали на влажной фильтровальной бумаге. Раздражали участки эпидермиса в отсеках, соседних с теми, в которых находились электроды.

При изучении возбудимости изолированных пучков и беспучковых тканей применяли экстраклеточную технику отведения. Изолированные проводящие пучки помещали в ту же камеру, которая была использована для изучения проведения изолированным эпидермисом. Влияние ионов Са на параметры ПД исследовали при помощи установки, описанной ранее [2].

Скорость радиального распространения кальция определяли при помощи радиоактивных индикаторов. С этой целью отрезок стебля с частично удаленным эпидермисом помещали в камеру, наполненную раствором $^{45}\text{CaCl}_2$. Удельная активность ^{45}Ca равнялась 16 мкКи/мл. Длина участка гипокотыля, находящегося в камере, составляла 1,5 см, длина свободного конца стебля, находящегося вне камеры, — 2 см. Базальный конец стебля вставляли в резиновую трубку, которая соединялась с сосудом, наполненным раствором (К —

1,54 ммоль; Na — 0,03, Mg — 0,24 ммоль). Под давлением 15,2 кПа раствор подавался в стебель и проходил по сосудам ксилемы (внутренняя полость гипокотыля предварительно заполнялась agarом). Вытекающий из свободного конца стебля раствор отбирали через каждые 5 мин и в нем определяли активность Са в диоксановом стинтиляторе на жидкостно-стинтиляционном спектрометре Марк II.

Данные статистически обрабатывались. Повторность опытов 12—25-кратная. Каждая точка графика представляет собой среднее из 10—20 измерений. После знаков \pm дана среднеквадратическая ошибка.

Результаты

В эпидермальных и паренхимных тканях в ответ на раздражение возникают флуктуации мембранного потенциала, по параметрам аналогичные ПД. Амплитуда этих флуктуаций составляла 47—56 мВ, продолжительность — 4—7 с. Можно предположить, что наблюдаемые флуктуации представляют собой электротоническое изменение потенциала данных клеток при прохождении ПД по проводящим пучкам. Для того чтобы проверить это предположение, поставлены опыты на изолированной ткани. В качестве объекта был выбран эпидермис стебля тыквы, так как изоляция этой ткани очень проста. При введении микроэлектрода в клетки эпидермиса регистрировали потенциал —150—160 мВ, т. е. такой же, как и в интактном эпидермисе. Раздражение осуществляли на расстояниях от электрода от 0,5 до 5 см различными способами (укол, перерезание, воздействие 0,1-молярным раствором NaCl, нагретой до 50° водой). Ни в одном случае флуктуации мембранного потенциала, по параметрам аналогичные параметрам ПД, обнаружены не были.

ПД не наблюдались также после препарованного участка, состоящего только из эпидермальной ткани, если раздражение осуществлялось до него.

Зарегистрировать ПД на изолированных проводящих пучках также не удалось. Но интактные листья ПД генерировали. Амплитуда ПД подорожника была меньше, а продолжительность его больше, чем у тыквы (соответственно 28 и 46 мВ; 6 и 4,2 с).

На отрезках стебля с удаленными проводящими пучками ПД также не были обнаружены.

Таким образом, на изолированных фрагментах стебля зарегистрировать ПД не удалось. Чтобы объяснить наблюдаемое явление, были выдвинуты следующие предположения: к появлению невозбудимости приводит нарушение интактности,

— все ткани стебля каким-то образом участвуют в проведении возбуждения.

Для их проверки был применен следующий методический подход: определяли время, через которое произойдет изменения в амплитудах ПД при радиальном перемещении Са от сосудов ксилемы до эпидермиса и в обратном направлении, от

эпидермиса до проводящих пучков (ранее было показано [2], что при пропускании 5-миллимолярного раствора Са по сосудам ксилемы амплитуда ПД снижалась с 46 до 8 мВ). На основании полученных данных судили о локализации ткани, проводящей возбуждение (изменения амплитуды должны были наблюдаться только тогда, когда Са достигал возбудимых мембран).

Опыт проводили следующим образом: в течение 4 ч по сосудам ксилемы пропускали раствор, не содержащий Са. Затем с помощью трехходового крана начали подавать раствор с концентрацией Са, равной 5 ммоль. Изменения амплитуды фиксировали через определенные промежутки времени. Как видно из рис. 2, максималь-

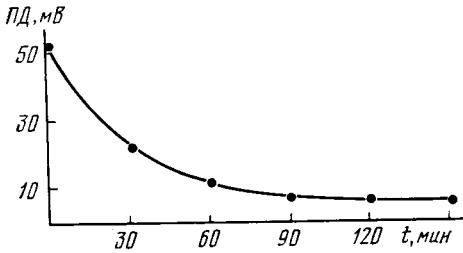


Рис. 2. Кинетика амплитуды ПД при воздействии 5-миллимолярного раствора Са, протекающего по сосудам ксилемы.

ные изменения в амплитуде ПД происходили в течение приблизительно 60 мин после начала пропускания раствора с Са. За это время амплитуда снижалась с 46 до 13 мВ. Начиная с 60 мин до 3 ч ПД плавно незначительно уменьшался (с 13 до 8 мВ). В описанном эксперименте Са распространялся от пучков к эпидермису. При изучении перемещения Са от эпидермиса к проводящим пучкам отрезок стебля помещали в плексигласовую камеру, наполненную дистиллированной водой. Через 1 ч воду заменяли 5-миллимолярным раствором СаСl₂. Амплитуда ПД в течение 5 ч практически не изменялась (полученная разница недостоверна). Через 6 ч наблюдалось некоторое увеличение амплитуды с 40 до 45 мВ. К 9 ч после смены раствора амплитуда ПД повысилась до 57 мВ.

Известно, что кутикула препятствует поступлению воды и ионов. В связи с этим представляло интерес провести аналогичный эксперимент с частично удаленным эпидермисом (около 50 %) на всем протяжении стебля. Стебель, находящийся вне камеры, смазывали вазелином для предотвращения подсыхания. В остальном методика была такой же, как и в предыдущем опыте. Как видно на рис. 3, а, ПД через 5 мин после замены дистиллированной воды раствором с Са был более чем в 2 раза меньше, чем в опыте с не удаленным эпидермисом (соответственно 46 и 18 мВ). В течение 1 ч амплитуда ПД возросла до 44 мВ. В последующие 5 ч она увеличивалась более плавно (до 56 мВ).

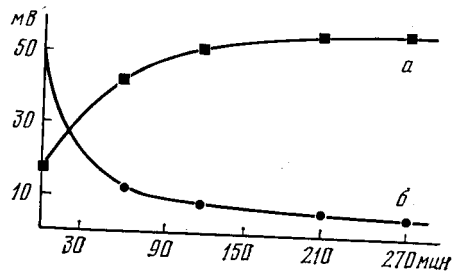


Рис. 3. Влияние Са на амплитуду ПД. а — воздействие со стороны эпидермиса (эпидермис частично нарушен); б — при пропускании раствора по сосудам ксилемы.

Таким образом, максимальные изменения амплитуды ПД, как и в случае пропускания раствора с Са по сосудам ксилемы, наблюдались в первые 60 мин. Но характер зависимости в рассмотренных случаях противоположен. С увеличением времени пропускания раствора по сосудам ксилемы амплитуда уменьшается, а с увеличением пребывания стебля в наружном растворе, содержащем аналогичную концентрацию Са, амплитуда увеличивается. Кривая а на рис. 3 (Са перемещается от эпидермиса к сосудам) почти зеркальна кривой б (Са перемещается от сосудов к эпидермису).

Для определения скорости радиального распространения Са стебель с частично удаленным эпидермисом помещали в камеру с ⁴⁵СаСl₂. Продиффундировавший до сосудов Са передвигался вместе с потоком раствора и вытекал из свободного конца стебля. Активность проб определяли через каждые 5 мин. В течение 50 мин после начала опыта Са в пробах отсутствует (рис. 4). Затем он появляется, и с течением времени его содержание в пробах увеличивается. Таким образом, первые ионы Са достигают сосудов ксилемы между 50 и 60 мин. Для того чтобы вычислить радиальную скорость распространения Са, необходимо сделать поправку на время передвижения Са непосредственно по сосудам до свободного конца стебля. Для определения скорости распространения потока раствора по сосудам ксилемы через отрезок стебля длиной 5 см пропускали раствор, подкрашенный метиленовым

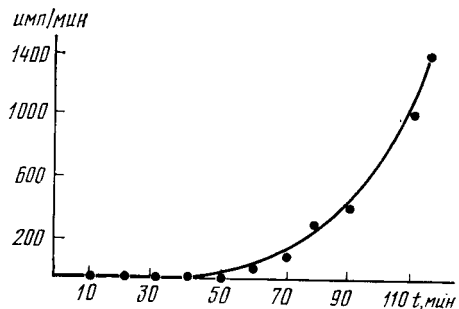


Рис. 4. Радиальная скорость распространения Са.

синим. Опыты показали, что она составляет примерно 0,1 см/с. Так как длина свободного конца стебля, находящегося вне камеры, равнялась 2 см, то Са проходил это расстояние за 20 с. В связи с тем что это время ничтожно мало по отношению ко времени распространения Са от эпидермиса до пучков, мы его не учитывали. Расстояние от эпидермиса до пучков, измеренное с помощью окулярмикрометра, 0,5—0,7 мм. Таким образом, скорость распространения Са в радиальном направлении составляет примерно 0,05—0,07 см/ч.

Интересно, что наши данные совпадают с данными, полученными на высечках клубня картофеля [6]. Коэффициенты диффузии ^{45}Ca в мякоти клубня картофеля колеблются от $2,9 \cdot 10^{-7}$ до $3,4 \cdot 10^{-7}$ (в наших опытах — от $1,7 \cdot 10^{-7}$ до $3,4 \cdot 10^{-7}$).

Таким образом, можно сделать вывод, что Са распространяется путем диффузии и достигает пучков за 1 ч — время, которое необходимо для реализации максимальных изменений в амплитуде ПД.

Обсуждение

Как уже говорилось выше, в эпидермисе и в основной паренхиме в ответ на раздражение при интраклеточном отведении зарегистрированы флуктуации мембранного потенциала, по параметрам аналогичные потенциалом действия. Можно предположить, что они представляют собой электротоническое изменение мембранного потенциала вследствие прохождения ПД по пучкам. Однако при ближайшем рассмотрении такое предположение кажется маловероятным.

Известно, что коэффициент электрической связи между клетками тыквы составляет 0,7 [11]. Таким образом, амплитуда флуктуации должна снижаться на 30 % в расчете на одну клетку. Проводящие пучки отделены от эпидермиса десятками клеток, но, несмотря на это, амплитуды ПД паренхимных клеток, находящихся в непосредственной близости от проводящих пучков и эпидермиса, были идентичными.

Наше предположение о том, что в проведении возбуждения участвуют не только проводящие пучки, согласуется с мнением Г. Г. Мамулашвили с соавторами [3] о вероятности распространения ПД по эпидермису. Резкая смена раствора, в который был погружен изолированный эпидермис, вызывала флуктуацию разности потенциала, по форме напоминающую ПД [5]. Однако прямых доказательств об участии эпидермиса в передаче возбуждения приведено не было. В наших опытах зарегистрировать какие-либо флуктуации, по форме напоминающие ПД, на изолированном эпидермисе не удалось. Далее были предприняты попытки зарегистрировать ПД в изолированных проводящих пучках, также не увенчавшиеся успехом. Известно, что аналогичный эксперимент на изолированном пучке удалось провести только Дж. Ч. Босу [1]. Изолированный проводящий пучок папоротника, помещенный во

влажную камеру, проявлял свои свойства изолированного нерва лягушки. Впоследствии предпринимались попытки повторить его опыты, но никому это не удалось (опыты на кафедре физиологии растений ТСХА, [4]). Мы также не смогли зарегистрировать ПД в стебле с удаленными проводящими пучками. Вероятно, разъединенные фрагменты стебля не в состоянии самостоятельно проводить возбуждение, и для его проведения необходима кооперация тканей. Идея о кооперативности тканей впервые высказана Хоувинком [15]. Впоследствии она была поддержана Сибококой [19]. Необходимость связи между клетками для генерации ПД продемонстрирована на тыкве [4]. Разъединенные части стебля генерировали лишь некоторые нерегулярные флуктуации мембранного потенциала.

Для подтверждения гипотезы о кооперативности тканей были проведены опыты, в которых изучалось изменение амплитуды ПД под воздействием радиально распространяющегося Са. Они показали, что максимальные изменения в амплитуде ПД обуславливаются изменениями ионного состава свободного пространства всех клеток стебля.

Принципиальную возможность участия всех тканей в передаче возбуждения рассмотрим на примере двух механизмов передачи, посредством которых может быть реализована такая возможность.

При изучении влияния ионов Са на амплитуду ПД был обнаружен интересный факт: характер этого влияния при воздействии ионов со стороны эпидермиса и со стороны проводящих пучков был противоположным (рис. 3). Это, очевидно, можно наблюдать только в том случае, если комплекс тканей, расположенных между проводящими пучками и эпидермисом, обладает свойствами отдельной биологической мембраны. В этом случае становится ясным ряд фактов, не имеющих объяснения к сегодняшнему дню. Например, наличие одинаковых параметров ПД при интра- и экстраклеточном отведении, быстрая передача возбуждения при нанесении раздражения на эпидермис, синхронизация деятельности отдельных пучков и некоторые другие.

Имеются данные, что совокупность различных тканей обладает теми же свойствами, что и мембрана конкретной клетки. Так, многочисленные исследования на тканях животного происхождения показали обычную для биологических мембран зависимость трансканевого потенциала от концентрации электролитов, омывающих ее внешнюю и внутреннюю поверхность. Кроме того, эти ткани осуществляют трансканевый транспорт Na [16]. Видимо, натрийизбирательные каналы кожи представляют собой поры, флуктуации тока в которых имеют высокую скорость образования. На основании биохимических и физико-химических исследований высказано предположение о структурном сходстве между нервными каналами в возбудимых мембранах и в эпителии [10]. Более того,

была показана способность эпителиальной ткани, состоящей, как мы уже отмечали, из многих компонент, к генерации потенциалов действия [9].

Не исключена возможность, что в растительных тканях так же, как и в коже, существуют специфические каналы ионной проводимости, которые являются аналогами каналов, функционирующих на отдельной мембране.

Для объяснения механизма участия всех тканей стебля в передаче возбуждения можно привлекать также интересные данные и о «метаболических» потенциалах действия.

В последнее время в ряде работ, выполненных на ацетабулярии и нейроспоре, появились сведения о существовании «метаболических» потенциалов действия [12, 13]. Они регистрировались при включении света, электрической стимуляции и спонтанно. Амплитуда ПД не зависела от силы раздражающего стимула и подчинялась закону «все или ничего». Любопытно, что деполяризация клетки сопровождается падением мембранной проводимости, а фаза реполяризации — увеличением. По мнению авторов, осцилляции мембранного потенциала являются следствием осцилляций через мембрану ионного тока, генерируемого электрогенной помпой. Во многих отношениях наблюдаемые изменения мембранного потенциала подобны

осцилляциям потоков H^+ в митохондриях, которые происходят при сдвиге метаболизма. Генерация «метаболических» потенциалов сопровождается флуктуациями АТФ в клетках, что, по всей видимости, свидетельствует об обусловленности флуктуации мембранного потенциала работой выкачивающего H^+ насоса, находящегося под контролем метаболической системы обратной связи.

Поскольку исследований механизмов генерации потенциалов действия в высших растениях на клеточном и молекулярном уровне не проводилось, нельзя исключить возможность, что наблюдаемые импульсы представляют собой именно «метаболические» потенциалы действия. В таком случае нет необходимости в функционировании специализированных возбудимых структур при передаче возбуждения.

Итак, полученные нами результаты еще раз подтверждают идею об участии всех тканей стебля в проведении возбуждения. Вместе с тем они ставят и совершенно новые вопросы о передаче сигнала в высшем растении, в частности, вопросы об электрических свойствах тканей стебля, о возможности прямого вклада метаболических процессов в генерацию ПД (в данном случае необходимо определить точку сопряжения между пассивными свойствами клетки и электронной помпой) и ряд других.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бос Дж. Ч. Избр. произвед. по раздражимости растений. Т. 1, 2. М.: Наука, 1964. — 2. Гунар И. И., Каменская К. И., Паничкин Л. А. Влияние ионного состава среды на параметры потенциалов действия. — Изв. ТСХА, 1978, вып. 2, с. 16—20. — 3. Мамулашвили Г. Г., Красавина М. С., Лялин О. О. О роли различных тканей стебля в передаче возбуждения. — Физиол. раст., 1973, т. 20, с. 442—450. — 4. Карманов В. Г., Лялин О. О., Мамулашвили Г. Г. Форма ПД и кооперативность возбудимых элементов у стебля тыквы. — Физиол. раст., 1972, вып. 2, с. 423—430. — 5. Ктиторова И. Н., Лялин О. О., Хабарова А. А. Мембранные потенциалы клеток эпидермиса стебля тыквы. — Физиол. раст., 1974, т. 21, вып. 6, с. 1196—1200. — 6. Мельникова М. К., Прохоров В. М., Баранова З. А. Диффузия ^{45}Ca и ^{90}Sr в клетках картофеля как двухслойной среде. — Физиол. раст., 1971. — 7. Опригов В. А. Распространяющееся возбуждение в высших растениях. — Успехи совр. биологии, 1977, т. 83, вып. 3, с. 442—456. — 8. Сннюхин А. М.

Электрофизиологические исследования клеток флоэмы высших растений. — Изв. ТСХА, 1964, вып. 3, с. 59—69. — 9. Campbell B. D. — Nature, 1976, vol. 162, N 5567, p. 388—390. — 10. Cuthbert A. W. — Experimentia, 1976, vol. 32, N 10, p. 1321—1323. — 11. Goodwin P. B. Intercell Commun plants. Stud Plasmodesmata. Berlin e. a., 1976, p. 121—128. — 12. Gradman D. S., Slayman C. L. — J. Membrane biol., 1975, vol. 29, p. 23—45. — 13. Gradman D. S. — J. Membrane biol., 1976, vol. 29, p. 23—35. — 14. Herbert D. A. — The Philippine Agriculturist, 1922, vol. 11, N 5, p. 141—158. — 15. Houwink A. L. — Rec. Trav. Bots Neerb., 1935, vol. 32, p. 51—91. — 16. Lindeman B., Van Driesche. — Sci., 1967, vol. 195, N 4275, p. 292—294. — 17. Ricca U. — Arch. Ital. Biol. (Pisa), 1916, vol. 165, p. 219—232. — 18. Sibaoka T. — Sci., 1962, vol. 137, p. 226—229. — 19. Sibaoka T. — Symp. Soc. Exptl. Biol., 1966, vol. 29, p. 23—45. — 20. Snow R. — Proc. Roy Soc., 1924, vol. 96, N 674, p. 349—374.

Статья поступила 15 июля 1981 г.

SUMMARY

Experimental data supporting the hypothesis on participation of all stem tissues in the generation of action potentials in higher plants have been obtained by means of different methods (intra- and extracellular registering of bioelectric reactions in intact parenchyma and epidermis, in isolated epidermis and conductive beams, perfusion of vessels).