

УДК 581.18

ВЛИЯНИЕ СОСТАВА ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ НА ПОТЕНЦИАЛЫ ДЕЙСТВИЯ СТЕБЛЯ ТЫКВЫ

ГУНАР И. И., КАМЕНСКАЯ К. И., ПАНИЧКИН Л. А.

(Кафедра физиологии растений)

За последнее время достигнуты значительные успехи в изучении электрогенеза у растений. Идентифицированы каналы ионной проводимости, найдены специфические ингибиторы [3], произведена реконструкция одиночного Са—Na канала в искусственном липидном слое [1]. Выполнен ряд работ по изучению влияния различных ионов на генерацию клеткой потенциалов действия [8, 14]. Однако все указанные работы проведены на водорослях. Большие размеры клеток этих растений дают возможность применять самые разнообразные методы исследований. Клетки высших растений мелкие, окружены большим количеством соседних клеток, поэтому использование при работе с ними такого перспективного метода, как фиксация напряжения, с помощью которого были идентифицированы ионные потоки во время генерации потенциала действия у водорослей, крайне затруднительно.

Показано, что во время прохождения потенциала действия в пасоке увеличивается концентрация ионов калия [7] и в растворе, омывающей корневую систему, уменьшается число ионов кальция и увеличивается ионов калия [4, 6]. Однако в литературе нет данных об участии конкретных ионов в генерации потенциала действия в высших растениях, несмотря на актуальность этого вопроса.

В ряде работ показано, что потенциалы действия распространяются по паренхимным клеткам ксилемы и флоэмы [10, 18]. Если пропустить раствор определенного ионного состава по сосудам ксилемы, то изменения в ионном составе произойдут, по всей видимости, в апопласте, так как ионный состав клеток, прилегающих к сосудам, достаточно постоянный, а клеточные стенки являются ионообменниками. Изменение в ионном составе внешней среды, окружающей клетки, которые проводят возбуждение, может дать информацию об участии тех или иных ионов в генерации потенциалов действия.

Методика

Объектом исследования служила тыква сорта Грибовская кустовая в возрасте двух-трех настоящих листьев. Растения выращивали в Лаборатории искусственного климата Тимирязевской академии в факторстатных условиях (освещенность 6000 лк, температура днем 22°, ночью 20°, влажность воздуха 60—75%, 16-часовой световой день, питательная среда — 0,5 нормы питательного раствора Кнопа). Питательный раствор меняли через каждые четыре дня.

Между семядолями и корневой шейкой вырезали часть стебля длиной 6 см. Внутреннюю полость заполняли 3% агаром, приготовленным на дистиллированной воде. Концы отрезков стебля вставляли в резиновые трубки, которые с помощью эластичного шланга соединяли с сосудами, наполненными испытуемыми растворами.

Под давлением 0,15 атм) в отрезок стебля поступал испытуемый раствор. Поскольку внутренняя полость была заполнена агаром, раствор проходил по сосудам ксилемы. Через некоторое время после начала пропускания раствора на свободном конце стебля, в месте расположения сосудистых пучков, появлялись капельки раствора, которые сливались затем в одну большую каплю. Раствор стекал по хлопчатобумажному фитильку. Участок стебля, расположенный ниже фитилька, смазывали вазелином. Второй фитилек размещали на стебле на 1 см ниже первого. Оба фитилька помещали в стаканчики с водопроводной водой, в которых находились электроды — насыщенные хлорсеребряные полуэлементы с переходными насадками на водопроводной воде. Электроды были соединены с усилителем РН-340, сигналы записывались на японском полирекордере ЕРР-3Т (рис. 1).

Для выбора стандартного раствора в пасоке определяли содержание ионов калия и натрия на пламенном фотометре, кальция, магния — трилонометрически, осмотическое давление — криоскопическим методом и величину рН. Содержание в пасоке ионов К было 14,2 ммоль; Na — 0,31; Са — 7,0; Mg — 2,4 ммоль; рН — 5,8, осмотическое давление — 1,1 атм.

Расчитанное осмотическое давление раствора, содержащего такое же, как пасока, количество ионов К, Na, Са и Mg (использовались хлориды этих катионов), намного превышало измеренное осмотическое давление пасоки. Объясняется это, по-видимому, тем, что часть ионов (вероятнее всего Са и Mg) находится в пасоке в связанном виде.

Поскольку невозможно создать стандартный раствор с той же концентрацией ионов и осмотическим давлением, которые свойственны пасоке в нашем стандартном растворе, концентрация ионов была в 10 раз меньше, чем в пасоке при неизменном их соотношении. Осмотическое давление, идентичное осмотическому давлению пасоки, поддерживалось добавлением маннита. рН стандартного раствора, так же как и рН пасоки, составляло 5,8 и доводилось до этого значения добавлением HCl или NaOH.

В стандартном растворе варьировали концентрацию какого-либо иона, оставляя неизменными концентрации всех остальных.

При изучении влияния ионов кальция на потенциалы действия наряду со стандартным раствором использовался раствор CaCl₂, не содержащий других ионов. В этом случае только значение рН раствора поддерживалось на уровне, аналогичном значению рН пасоки.

Раздражение осуществляли перерезанием свободного конца стебля. Эту операцию проводили однократно.

В каждом варианте делали от 10 до 15 измерений.

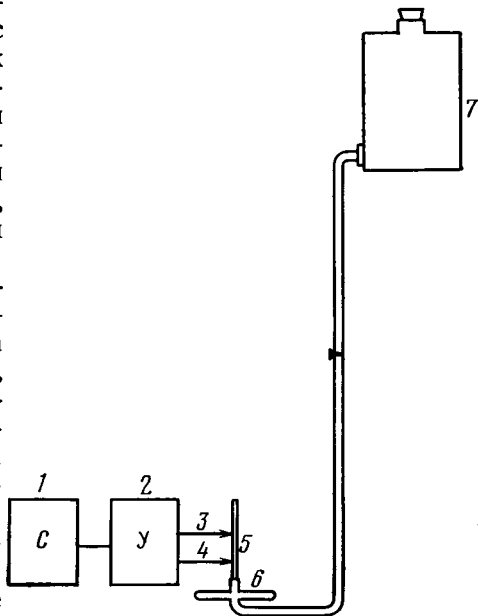


Рис. 1. Схема установки для изучения влияния ионного состава раствора на потенциалы действия.

1 — самописец; 2 — усилитель; 3, 4 — электроды; 5 — отрезок стебля; 6 — эластичная резиновая трубка; 7 — испытуемый раствор.

Результаты

Раздражение осуществляли после того, как концентрация ионов на выходе и объем вытекаемого раствора принимали постоянные значения. Концентрация Ca (рис. 2, а) на выходе с течением времени возрастала и становилась идентичной концентрации на входе через 3,5 ч, объем раствора (рис. 2, б) сначала резко возрастал, затем уменьшался, и через 3,5 ч устанавливался на постоянном уровне.

Мы не ставили перед собой цели выяснить, каким образом «мертвые» сосуды ксилемы способны регулировать поток раствора, хотя вопрос этот, безусловно, очень интересен и дает повод для предположения, что или сосуды ксилемы не являются абсолютно «мертвыми» структурами или существует контроль за транспортом по сосудам ксилемы со стороны паренхимных клеток, окружающих сосуды и соединяющихся с ними большим количеством пор.

Так как через 3,5 ч поток раствора стабилизировался и на выходе мы имели ту же концентрацию, что и на входе, то, очевидно, к этому времени ионнообменные процессы, возможные при данной постановке опыта, завершались. Время

до раздражения составляло в связи со сказанным выше 4 ч.

Как видно из рис. 3, а, амплитуда потенциала действия была максимальной при пропускании раствора, не содержащего ионов Ca (48 мВ). С увеличением концентрации до 1 ммоль наблюдалось резкое уменьшение амплитуды (до 22 мВ). Дальнейшее увеличение концентрации Ca^{2+} приводило к более плавному уменьшению амплитуды до 12 мВ при концентрации Ca^{2+} , равной 5 ммольям.

Аналогичная зависимость была получена при пропускании через стебель раствора $CaCl_2$ (рис. 3, б).

В ряде работ, выполненных на клетках водорослей, было показано, что Ca может выступать непосредственно в качестве токоносителя [3, 5]. Если предположить, что механизм генерации потенциалов действия высших растений и водорослей идентичен, то при увеличении концентрации Ca^{2+} во внешней среде мы должны были бы наблюдать увеличение амплитуды, так как фаза деполяризации обусловлена реализацией градиента концентраций на мембране, который направлен из внешней среды в клетку.

Однако нами была получена противоположная зависимость — с увеличением концентрации Ca^{2+} происходило уменьшение амплитуды потенциала действия.

Можно сделать несколько предположений о причинах этого явления. Например, Ca^{2+} участвует в генерации потенциала действия опо-

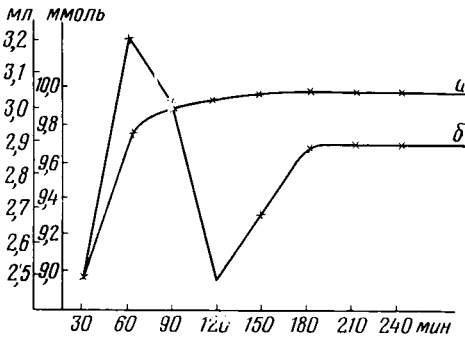


Рис. 2. Стабилизация потока раствора. а — концентрация кальция; б — вытекаемый раствор.

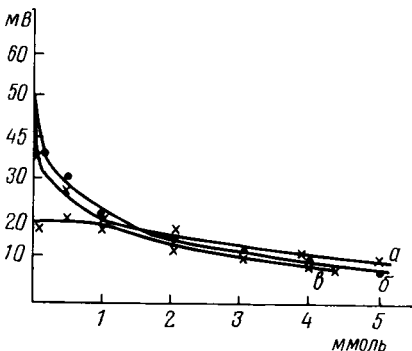


Рис. 3. Влияние ионов кальция и магния на потенциал действия.

а — влияние ионов кальция в стандартном растворе; б — кальция в растворе $CaCl_2$; в — магния в стандартном растворе.

средованно. Он оказывает большое влияние на цитоплазматические структуры растительных клеток [2], участвует в стабилизации мембран, которые образуются на поверхности цитоплазматических капель, изолированных из клеток водорослей [9], регулирует селективные свойства мембран [12], оказывает большое влияние на проницаемость мембран. Неясно, каким образом Ca^{2+} вызывает изменения проницаемости мембран. Одни авторы предполагают, что кальций изменяет радиус пор [15, 19], другие считают, что Ca^{2+} вызывает конформационные изменения структуры мембран, которые, в свою очередь, приводят к изменению проводимости [2].

Возможно, в наших опытах уменьшение амплитуды при увеличении внешней концентрации Ca^{2+} можно объяснить одной из названных выше причин, так как в обоих случаях Ca^{2+} действует уплотняюще на поверхность цитоплазмы, уменьшая ее проницаемость для различных ионов.

Однако, несмотря на согласованность такого предположения с экспериментальными данными, не исключается возможность и непосредственного участия кальция в генерации потенциала действия. Возможно, что при данной постановке эксперимента не обеспечивается достаточно полного вымывания ионов из апопласта и при оставшейся концентрации мы можем наблюдать только опосредованное влияние кальция на потенциал действия.

Влияние Mg на амплитуду потенциала действия при концентрациях от 1 до 4,5 ммольа очень напоминает влияние Ca . Как видно из рис. 3, в, в этом диапазоне концентрации амплитуда уменьшается от 21 до 7 мВ. Варьирование концентраций от 0 до 1 ммольа практически не вызывает изменений в амплитуде. Увеличение концентрации Mg до 7 ммольей приводит к потере возбудимости (в этом случае осмотическое давление раствора превышало осмотическое давление пасоки).

Аналогичная потеря возбудимости отмечена в клетках водорослей [14]. Возможно, Mg^{2+} вызывает подобно Ca^{2+} изменения проницаемости мембран, взаимодействуя с элементами их структур. Предполагается, что механизм такого взаимодействия Ca^{2+} с мембранами заключается во взаимодействии его с фосфолипидами [13] или с отрицательными группами белков в гидрофильных порах [17]. Различия в эффективности воздействия Ca и Mg на амплитуду потенциала действия могут обуславливаться их неодинаковой способностью связываться с данными структурами. В результате этих взаимодействий при определенных концентрациях магния, как и в случае с кальцием, может уплотняться поверхность протоплазмы.

Представляло интерес выяснить также влияние концентрации Na на амплитуду потенциала действия. Как видно из рис. 4, а, варьирование концентрации Na не приводило к изменению в амплитуде потенциала действия. Аналогичные результаты были получены при изменении концентрации K в стандартном растворе (рис. 4, б). Величина амплитуды определялась содержанием Ca (рис. 4, в).

В работах, выполненных на водорослях, показано, что фаза реполяризации обусловлена выходом K из клетки [8]. У высших растений после прохождения потенциала действия в растворе, омывающем

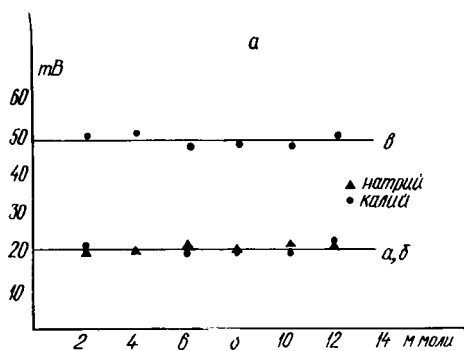


Рис. 4. Влияние ионов натрия и калия на потенциалы действия.

а — натрия в стандартном растворе; б — калия в стандартном растворе; в — калия в растворе без кальция.

ткани, увеличивается концентрация К [6], что также служит косвенным доказательством участия К в генерации потенциала действия. Наши данные не противоречат предположению о том, что у высших растений, как и у водорослей, К обуславливает поздний ток, так как последний не определяется градиентом концентрации иона в клетке и среде, а возникает лишь в силу образовавшейся асимметрии зарядов.

Таким образом, генерация потенциалов действия в стебле тыквы не зависит от концентрации К и Na в перфузированном растворе. Ионы кальция и магния влияют на потенциалы действия. Возможно, что механизм этого влияния состоит в изменении структур плазматических мембран или в воздействии на регуляторные процессы в клетке.

ЛИТЕРАТУРА

1. Александров А. А. и др. Реконструкция одиночного Са—Na канала клетки в липидном бислое. «Докл. АН СССР», 1976, т. 227, № 3, с. 723—726.
2. Бушуева Т. М. О роли Са в растительной клетке. «Бот. журн.», 1964, т. 49, с. 439—447.
3. Востриков И. Я. Ионные каналы возбудимых мембран — плазмалемы и тонопласта — клеток харовых водорослей. Роль ионов Са в возбуждении. Автореф. канд. дис. М., 1976.
4. Выскребенцева Э. И., Синюхин А. М. Влияние ионов К на генерацию и проведение ПД в проводящих пучках стебля тыквы. «Физиол. раст.», 1967, т. 14, вып. 5, с. 823—832.
5. Гончарик И. Н., Юрин В. Н., Соколик А. И. О роли кальция в генерации потенциала действия клетками харовых водорослей. Тез. докл. совещ.: Количественное описание переноса ионов через сложные полифункциональные мембраны. Минск, 1974, с. 16—18.
6. Горчаков В. В. Изменения ионных потоков калия и кальция в тканях корневой системы высших растений при возбуждении. «Тр. Ун-та дружбы народов», 1968, т. 35, вып. 2, с. 127—138.
7. Гунар И. И., Паничкин Л. А. Водно-ионные потоки и передача возбуждения у растений. «Изв. ТСХА», 1969, вып. 4, с. 3—13.
8. Озолина И. А. Влияние ионного состава среды на генерацию биоэлектрических потенциалов растительной клеткой. Автореф. канд. дис. М., 1964.
9. Саляев Р. К. О функциональной роли мембран растительной клетки. «Журн. эволюцион. биохим. и физ.» 1966, т. 2, с. 152—157.
10. Синюхин А. М. Электрофизиологическое исследование клеток флоэмы высших растений. «Изв. ТСХА», 1964, вып. 3, с. 59—70.
11. Хагис Д., Михи Д., Роберт К., Уокер П. Введение в молекулярную биологию. М., «Мир», 1967.
12. Эпштейн Э. Биохимия растений. М., «Мир», 1968, с. 167.
13. Chibnall A., Channon H. "J. Biochem.", 1929, vol. 23, N 176, p. 176—184.
14. Houp A. B. "Nature", 1961, vol. 191, p. 811—819.
15. Kavanay J. L. Structure and function in biological membranes. San-Francisco—London—Amsterdam, 1965.
16. Marschener H., Mengel K. "Z. Pflanzenernahr, Düng, Bodenkunde". 1966, Bd. 112, N 1, S. 39—42.
17. Mitchell P., Symp. "Membrane transport and metabolism". Praha, 1961, p. 22—24.
18. Sibaoka T. "Symp. Soc. exp. Biol.", 1962, vol. 137, p. 224—228.
19. Solomon A. Symp. "Membrane transport and metabolism", Praha, 1961, p. 94—102.

Статья поступила 15 октября 1977 г.

SUMMARY

In the solution passed through the xylem vessels under constant hydrostatic pressure the concentration of one of the following elements — K, Ca, Mg, Na — varied, while the concentration of all the other elements remained invariable.

The amplitude of the action potential was reduced from 48 to 12 mV with the increase of Ca²⁺ concentration from 0 to 5 mmole. Mg²⁺ reduced the amplitude from 22 to 7 mV with variation of concentration from 0 to 4.5 mmole.

The amplitude of the action potential did not depend on potassium and natrium concentration in the solution.