

УДК 581.1.

МОДЕЛЬ ПРОТОННОГО БАРЬЕРА. ПОЛНАЯ ОДНОСТОРОННЯЯ НЕПРОНИЦАЕМОСТЬ КЛЕТОК КОРНЯ ДЛЯ ВОДЫ ПОД ВЛИЯНИЕМ ИЗБЫТКА ПРОТОНОВ В АПОПЛАСТЕ*

А.А. ЗАХАРИН, Л.А. ПАНИЧКИН

(Лаборатория биофизики растений)

При помощи гравиметрического метода продолжены исследования тонких эффектов быстрой кинетики водообмена корней интактных растений при изменении солевого, осмотического и рН-статуса внешнего раствора. В сравнении с нейтральными солями щелочь и кислота (в изоосмотических концентрациях) действовали аномально. Во-первых, индуцировали более сильную гравиметрическую реакцию (соответственно, в 2 и 3,5 раза). Во-вторых, вызывали устойчивую непроницаемость клеток для воды даже после снятия воздействия (отмывка водой объекта). Обнаруженные эффекты хорошо согласуются с гипотезой протонного барьера, а также с современной концепцией водных каналов на плазмалемме, давая прямые экспериментальные подтверждения тому и другому. Рассматриваются некоторые альтернативные объяснения наблюдаемых феноменов и их возможные механизмы.

Известно, что транспорт воды и минеральных ионов в клетке осуществляется в растении при помощи принципиально разных механизмов и в силу этого по-разному зависит от действия внешних и внутренних факторов [15, 18]. Это тем более очевидно, что сами транспортируемые частицы существенно различны по свойствам: ионы имеют электрические заряды, отличающиеся по знаку и величине (дискретно), а молекула воды — диполь, в котором не вполне сбалансированы положительный и отрицательный заряды. Но поскольку организм представляет собой единое целое, то различные физиологические процессы в растении неизбежно должны быть связаны

[14]. При стрессе, например, связь эту выражает понятие «кооперативный эффект», который включает в себя несколько почти одновременно начинающихся и параллельно текущих событий [2]. Механизмом такой связи могут быть изменения электрической компоненты клеток, осмос, электроосмос и некоторые другие процессы [12, 15, 18].

В то же время, как всякая сложная система, растение должно регулировать все свои многочисленные функции совершенно автономно [13, 15]. Ведь кооперативный эффект, когда совершается одновременно множество изменений почти всех функций, — это только механизм быстрого реагиру-

* Работа выполнена при поддержке РФФИ. Грант № 02-04-49095.

ния, который позволяет сгладить внезапное воздействие стресса [2]. После этого начинается более тщательная и медленная регулировка каждой функции в отдельности. Круг наших интересов можно обозначить как водно-солевой обмен растений (ВСО), но кроме транспорта воды и минеральных ионов в это понятие включены еще электрофизиологические явления, изменения рН и рост клеток растяжением [10]. Все эти процессы отличаются высоким быстродействием, очень тесными связями между собой и с факторами внешней среды, с некоторым основанием их можно рассматривать как разные стороны одного явления [11].

Ранее был описан гравиметрический метод, который позволил с высокой чувствительностью и низкой инерционностью регистрировать быструю кинетику водообмена растений при резком изменении солевого, осмотического или рН-статуса внешнего раствора [8]. Метод обладает секундным разрешением во времени и способностью «чувствовать» изменения концентрации соли даже на 1 мМ. Было показано, что нейтральные соли в большом диапазоне концентраций (0Д-500 мМ) действовали градуально, однако концентрационная зависимость в логарифмическом масштабе указывала на 2 различных механизма транспорта воды: для низких (электроосмос) и для высоких (осмос) концентраций [9]. В сравнении с солями неионные соединения в низких концентрациях были мало эффективны, а кислота или щелочь действовали сильнее, чем соли [12, 20].

Тесная связь процессов водно-солевого обмена нередко проявляется в эффектах осмоса и электроосмоса. В последнем случае вода может двигаться через мембраны в

виде ионов гидроксония [18], или же движущиеся под действием электрического поля минеральные ионы увлекают с собой частицы своей гидратной оболочки — диполи воды. В обоих случаях вода движется через поры или каналы в градиенте электрического поля и под действием этого градиента. Это противоречит более поздним представлениям о специализированных водных каналах, построенных из специальных белков — аквапоринов [19, 22]. Электрический заряд белков канала в зависимости от приуроченности его участка к внутренней или внешней сторонам мембраны меняет знак на противоположный, вследствие этого через водный канал легко проходят молекулы, в т. ч. и диполи воды, но он закрыт для ионов обоих знаков заряда.

На основании многочисленных данных о значительной стимуляции работы АТФ-зависимого протонного насоса на плазмалемме в условиях стрессов [1, 3, 5], а также исходя из исключительной роли ионов водорода (протонов) в функционировании клеточных мембран была сформулирована концепция так называемого протонного барьера [1, 3, 4, 16], в которую хорошо вписывается такой аквапориновый водный канал. Показана тесная связь мембранных потенциалов с изменением потоков ионов [7], в частности (и в особенности), протонов через мембраны клеток [16]. Вследствие активизации работы протонного насоса при стрессах на наружной поверхности плазмалеммы накапливается избыток протонов, а внутри клетки преобладают анионы. Было оценено возможное защитное действие апопласта, который обладает довольно высокой катионообменной емкостью и может, по-видимому, задерживать

образование протонного барьера (ПБ) на десятки минут и более [3]. Отмечались также аномальные электрохимические свойства протонов, электрическое поле которых (плотность заряда) значительно сильнее, чем у других одновалентных катионов. Это приводит к образованию на внешней стороне мембраны объемного макроскопического заряда, который формируется в виде двойного электрического слоя [4]. К этому же роду фактов относятся данные о так называемом перемешиваемом слое, образование которого приводит к резкому снижению проницаемости [13, 15].

Избыток протонов в апопласте резко меняет проницаемость клеток, за счет положительно заряженного примембранного слоя, который не пропускает катионы в обе стороны, а анионы пропускает предпочтительно наружу. Поскольку диполи воды в этих условиях превращаются в ионы гидроксония, то, как и другие ионы, они неспособны пройти через водный канал. Развивается значительное обезвоживание клеток корня, снять которое удавалось лишь при помощи такого сильного воздействия, как наложение внешнего электрического поля [4]. В этой довольно стройной концепции протонного барьера, однако, не все моменты одинаково хорошо доказаны. Как непрохождение воды через протонный барьер, так и последующее снятие этого эффекта показаны только косвенными методами, невысокая точность которых, по-видимому, не соответствовала тонкости изучаемых процессов [5].

Цель работы — тщательное исследование некоторых деталей и механизмов феномена протонного барьера, касающихся его влияния

на водный обмен клеток корней растений. Для этого применили гравиметрический метод, позволяющий регистрировать очень небольшие изменения оводненности клеток в течение коротких отрезков времени. Протонный барьер в данном случае не возникал в результате стрессового воздействия, но его моделировали действием слабого раствора кислоты на корень.

Методика

В работе использовали разработанный ранее гравиметрический метод [8], принципиальная схема которого представлена на рис. 1. Основой метода служит легкое измерительное коромысло 1 длиной около 20 см, способное реагировать на изменение массы одного из плеч всего на 1 мг. На одном конце коромысла крепится за гипокотиль проросток 2, к корневой шейке которого от микронасоса 3 непрерывно подводится по полиэтиленовому капилляру 4 проточный раствор, омывающий корневую систему и стекающий с нее в виде отдельных капель. Раствор собирается порциями в чистые сосудики 5, закрываемые пробками, и может быть использован в дальнейшем для анализа ионного состава, отражающего быстрые ионообменные процессы в корне. При помощи разновеса 6 можно уравновешивать коромысло. Здесь же находится непрозрачная шторка 7, которая перекрывает световой поток от осветителя 8 на фотоэлемент 9, а фототок регистрируется на самопишущем микроамперметре 10. Вся установка, кроме осветителя, микронасоса и самописца (которые могут нагревать окружающий воздух), заключена в прозрачный бокс 11 для защиты от случайных воздушных потоков. Для

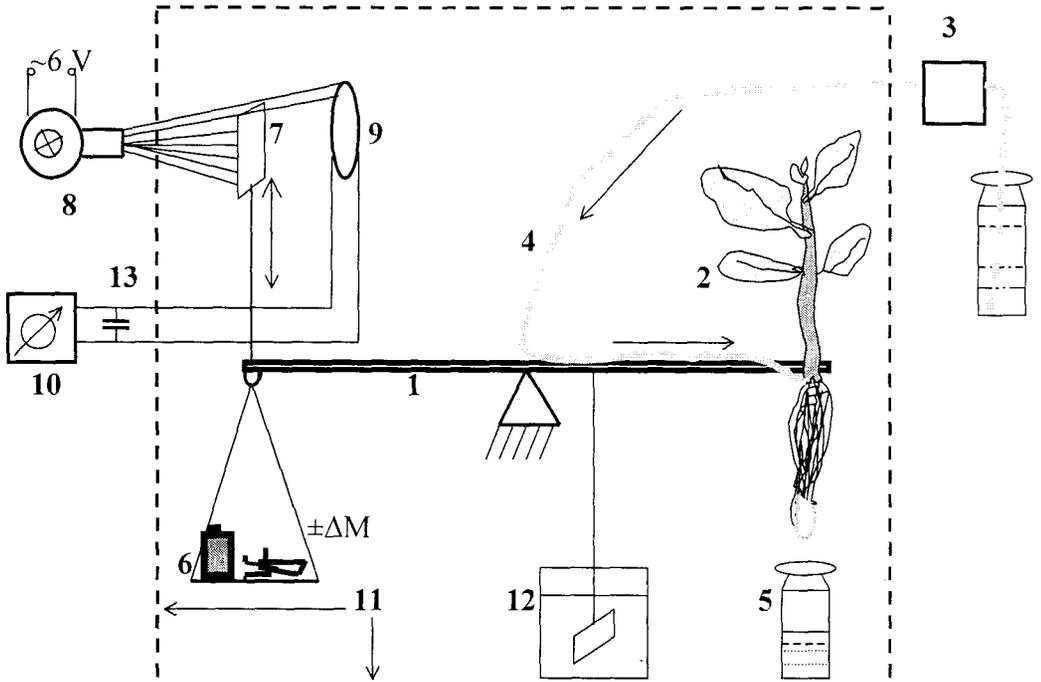


Рис. 1. Схема гравиметрического метода для исследований быстрой кинетики водообмена корней интактных проростков растений

гашения пульсаций фототока, обусловленных раскачиванием коромысла дискретно падающими с корневой системы каплями жидкости, использовали механический демпфер 12 на глицериновом растворе, а также ёмкостной успокоитель 13, включенный параллельно фотоэлементу на входе самописца.

Нарушение равновесия, означавшее изменение массы корней вследствие изменения оводненности, например, при действии солевых растворов, переводилось с низкой инерционностью в электрический ток при помощи фотоэлектрической системы. Сигнал непрерывно регистрировался на самопишущем высокочувствительном микроамперметре с 3-10-кратной компенсацией. Такая техника позволяла регистрировать очень малые изменения больших величин. Метод сб-

ладал секундным разрешением во времени. Смену растворов производили без перерывов записи, объект не травмировался в ходе эксперимента. В качестве объектов использовали интактные проростки подсолнечника, томата, кукурузы в возрасте 2~3 недели, выращиваемые в стандартных условиях на 1/2 питательной смеси Кнопа, при освещенности 10-12 клк и 12-часовом дне. На всех объектах получены сходные результаты. В прежних работах [8, 9] таким методом подробно исследовали обратимое выделение корнями воды при действии растворов солей разных концентраций. При этом действие хлоридов калия и натрия в равных низких (<50 мМ) концентрациях достоверно не различалось. В данном случае этот же метод использован в сравнительных исследованиях

для феноменологического описания действия кислоты (и щелочи) в невысоких концентрациях на корни растений.

Результаты и их обсуждение

В данных исследованиях не использовали стресс для создания протонного барьера, но прямо моделировали протонный барьер, омывая корни проточным раствором слабой кислоты. Контролем служила уже хорошо изученная гравиметрическая реакция (обратимая потеря воды корнем) при действии нейтральных солей (в основном хлориды калия и натрия). Дополнительным контролем к действию кислоты было воздействие на корень щелочи — вещества, полярного кислоте в рН-координатах. Все реагенты — HCl , NaOH , NaCl — применяли в изотонических концентрациях, 3 или 5 мМ (в разных опытах). Более высокие концентрации HCl могли вызывать значительные повреждения клеток.

На рис. 2 представлен образец записи для проростка томата, где показана кинетика прямой и обратной гравиметрической реакции в контроле, т. е. потери воды корнем при действии 5 мМ NaCl и накачка воды вплоть до восстановления исходной массы при возврате корня на воду. Аналогичным образом реакция протекает при концентрациях соли от 0,1 до 500 мМ, причем изменения концентрации градуально отражаются на амплитуде. Лаг-период реакции не превышает 1 с, быстрая фаза длится 2-3 мин, последующая медленная — около 10 мин. Соответственно в первую фазу реализуется 70-80% полной амплитуды реакции, во вторую — оставшиеся 20-30%. Запись обратной реакции (при отмывке корней ин-

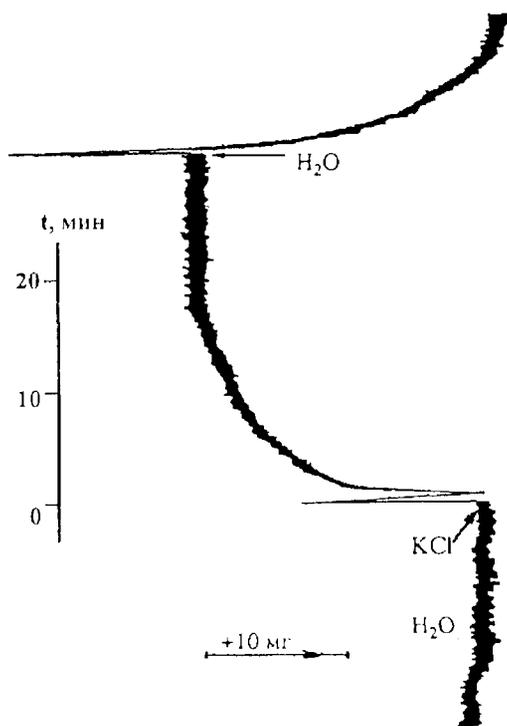


Рис. 2. Обратимая потеря воды корнем молодого растения томата при действии раствора 5 мМ NaCl . Образец оригинальной записи. Моменты смены растворов указаны стрелками

тактных проростков водой) имеет сходную форму и близкие временные параметры. Реакция хорошо обратима и воспроизводима. Это дает возможность на одном образце проводить последовательно 2 и более воздействий (перемежаемых отмывками водой).

Именно в такой технике были выполнены эксперименты на проростках подсолнечника, представленные на рис. 3. На один и тот же объект накладывали, а затем снимали (производили отмывку корней дистиллированной водой) последовательно несколько воздействий: NaCl — HCl — NaOH — NaCl (на рис. 3 обозначены стрелками, на-

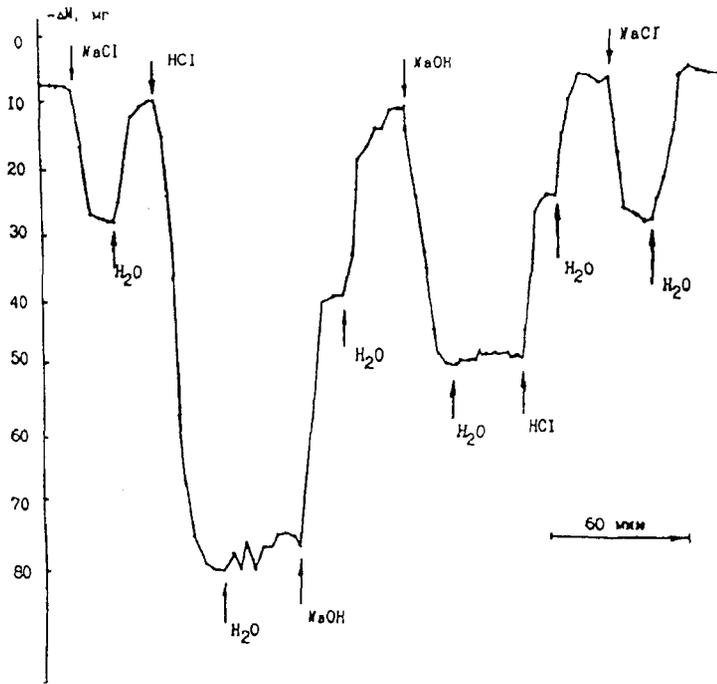


Рис. 3. Сравнительное действие нейтральной соли (NaCl), кислоты (HCl) и щелочи (NaOH) в изоосмотических концентрациях 5 мМ на обратимую потерю воды (-ΔМ) корнями интактных проростков подсолнечника (усредненный график по данным 5 экспериментов). На каждый образец накладывалось последовательно несколько воздействий, указанных стрелками

правленными вниз). Это не оригинальная запись, как на рис. 2, а график, построенный по средним значениям, полученным в 5 экспериментах. Как и на рис. 2, действие нейтральной соли (в данном случае 5 мМ NaCl) хорошо обратимо, т. е. отмывка водой приводит объект к первоначальной массе вследствие поступления воды в клетки корня. Дважды повторенная — в начале и в конце эксперимента — реакция на действие хлорида натрия хорошо воспроизводится. Реакция с 5 мМ HCl, так же как и с 5 мМ NaOH, протекает принципиально иначе. Во-первых, она значительно больше по амплитуде: эквимоллярная соли щелочь давала гравиметрическую реакцию примерно в 2 раза, а эквимоллярная кислота — почти в 4 раза более сильную, чем NaCl. Аналогичные данные получены для других культур, в частности, для кукурузы (рис. 4). В таблице при-

Действие соли, щелочи и кислоты на быструю потерю воды корнями интактных проростков кукурузы и томата, -ΔМ, мг H₂O

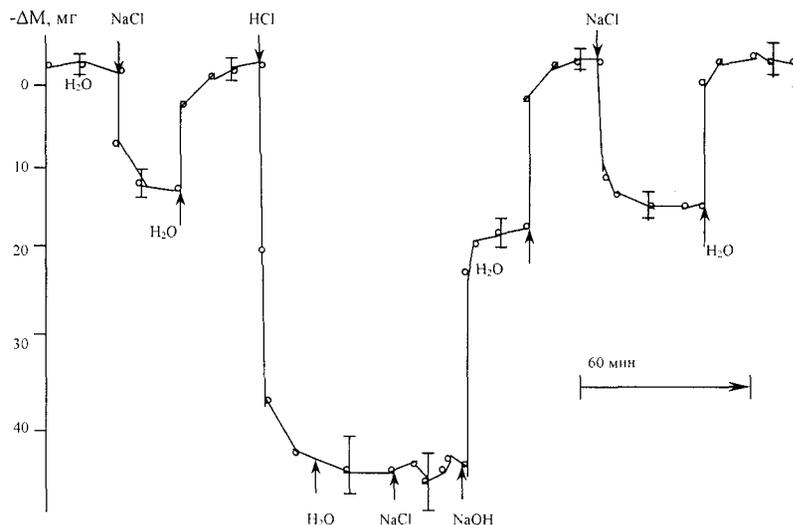
Действующее вещество	Кукуруза, 3 мМ	Томаты, 5 мМ
NaCl	14,3±2,31	16,4±1,55
NaOH	—	31,6±2,58
HCl	46,3±6,25	55,1±4,43
HCl:NaCl	3,23: 1	3,36: 1
NaOH: NaCl		1,93: 1

Примечание: Повторность экспериментов: для кукурузы 5-кратная, для томата — 10-12-кратная.

водятся значения амплитуд некоторых гравиметрических реакций.

Во-вторых, действие кислоты и щелочи было необратимо. Обратная реакция не возникала и даже не начиналась в течение 30-40 мин, в то время как лаг-период гравиметрической реакции (и прямой, и обратной) на солях составляет около 1 с. Такой же малый лаг-период сохраняется при действии кислоты

Рис. 4. Гравиметрическая реакция под воздействием кислоты и нейтральной соли в изоосмотических концентрациях (3 мМ) на 1-2-недельных интактных проростках кукурузы. Среднее из 5. Обозначения как на рис. 3



и щелочи. Это позволяет сделать вывод, что при действии кислоты и щелочи гравиметрическая реакция необратима. Действительно, находившиеся на проточном растворе кислоты или щелочи и теряющие при этом значительное количество воды корни, омываемые затем проточной дистиллированной водой, в течение длительного времени не способны поглощать воду и сохраняют ту сниженную массу, которой они достигли при предыдущем воздействии.

«Обратить» необратимую реакцию, т. е. вернуть корни интактных проростков в исходное состояние (до воздействия кислоты или щелочи) высокой оводненности и большой сырой биомассы, удастся лишь в 2 приема. Вначале следует провести «нейтрализацию», т. е. после кислоты подействовать эквивалентным раствором щелочи (а после щелочи — кислотой). Это сразу же вызывает быстрое увеличение массы, с кинетикой обычной гравиметрической (обратной) реакции. В результате, однако, достигается не исходная масса, а некий промежуточный уровень, приблизительно

равный состоянию корней при действии 3-5 мМ NaCl. После этого обычным способом идет и отмывка водой с выходом на исходный уровень массы (оводненности) корня, как после действия соли. На рис. 3 и 4 видно, что по окончании всех процедур такой усложненной отмывки корня повторное действие 5 мМ NaCl вызывает точно такую же реакцию, как в начале эксперимента, что традиционно трактуется как отсутствие повреждений объекта.

Таким образом, эксперименты с моделированием протонного барьера при одновременной очень чувствительной и быстрой регистрации малейших изменений массы объекта (т. е. входа или выхода воды в корни или из корней) дали интересные результаты. Действие кислоты и щелочи более сильное, чем нейтральных солей в изоосмотической концентрации, можно объяснить изменением pH внешнего раствора, хотя использованы были небольшие концентрации электролитов. Хорошо известно поведение белков при изменении pH в районе изоэлектрической точки [17]. Физи-

ко-химические (и биологические) свойства белка изменяются в одну и ту же сторону, независимо от того, произошло ли закисление или подщелачивание среды. Такое же однонаправленное изменение свойств при сдвиге рН раствора от нейтрального в кислую или щелочную сторону, характерное для белков, имело место и для амплитуд гравиметрической реакции. В кислой и щелочной средах амплитуда была больше, чем на нейтральных солях. С одной стороны, можно предположить, что максимальная при нейтральном рН устойчивость белков клеточной мембраны при снижении или увеличении рН уменьшается, а проницаемость мембраны в этой связи тоже меняется, что сказывается на осмотическом равновесии системы «клетка — среда». С другой — можно допустить, что здесь играют роль особые, аномальные электрохимические свойства протона и гидроксила. В справочной литературе [6] находим, например, что если для соли типа KCl при пропускании электрического тока через водный раствор соли анионная и катионная составляющие общего тока близки порознь к 50% (в сумме — 100%), то для одноосновной кислоты катионная проводимость составляет около 80% (анионная — 20%), а для щелочи — наоборот: анионная составляющая 80, а катионная — 20%. Эквивалентная электропроводность водных растворов электролитов 10^4 См·м²/г-экв (при концентрации раствора 0,01 г-экв/л, t — 25°C): HCl — 412; NaCl — 118,5; KCl — 141,3; NaOH — 238,0; для большинства солей из одновалентных ионов эта величина лежит в пределах 100-140. Ионные проводимости при бесконечном разведении составляют: H⁺ — 349,8; Na⁺ — 50,1; K⁺ — 73,5 (для других одно-

валентных катионов — в интервале 40-70); OH⁻ — 198,3; Cl⁻ — 76,4 (для других одновалентных анионов — 40-80). Удельная электропроводность водных растворов для нейтральных солей лежит в пределах 11-20 См·м⁻¹, для щелочей — 30-40, для кислот — 40-55. В среднем соотношения указанных электрохимических параметров для кислоты, щелочи и нейтральной соли составляют приблизительно 3,5 : 2 : 1. Интересно, что представленные в таблице для проростков томата средние значения амплитуд гравиметрической реакции при действии HCl, NaOH и NaCl относятся как 3,36 : 1,93 : 1. Для подсолнечника соответственно — 3,62 : 2,11 : 1; для кукурузы — HCl : NaCl = 3,23 : 1. Такое совпадение этих соотношений вряд ли случайно. По-видимому, можно заключить, что быстрые реакции потери воды корнем при действии кислоты, щелочи или соли соответствуют по амплитуде некоторым электрохимическим параметрам каждого из действующих веществ. Кроме того, эти данные, безусловно, подтверждают аномальные свойства протона и гидроксила, которые будучи одновалентными ионами по электрохимическим параметрам и физиологическому воздействию приближаются: гидроксил к 2-валентным анионам, протон к 3-валентным катионам.

Но столь сильное обезвоживание корня имеет и другое объяснение, прямо связанное с гипотезой о протонном барьере. С самого начала действия кислоты на протяжении нескольких минут идет интенсивное выделение воды из клеток. Одновременно клетка теряет способность поглощать воду и не восстанавливает ее даже при замене во внешней среде раствора кислоты на соль или дистиллиро-

ванную воду. Транспорт воды, как известно, осуществляется по водному каналу, структура которого выполнена специализированным белком аквапорином [23]. Аминокислоты в этом белке расположены таким образом, что полярность создаваемого ими электростатического поля в центре молекулы меняется на обратную. Молекулы воды, дойдя до середины водного канала, меняют ориентацию зарядов и проходят канал так, что их дипольные моменты в начале и в конце канала направлены в противоположные стороны [5]. При таком устройстве канал легко пропускает воду в обе стороны, но не заряженные частицы с любым знаком заряда (ни катионы, ни анионы). Благодаря аквапоринам водных каналов растительные клетки осуществляют осмотические функции, регулируют объем и тургорное давление — в нормальных условиях [5, 19, 22, 23].

При наличии протонного барьера (стресса) молекулы воды, присоединяя протон, превращаются в ион гидроксония и тем самым теряют способность проходить через водные каналы мембран. Но особенно интересно, что они не могут проходить в клетку, однако свободно могут выходить из нее. Более того, выходя из клетки в область протонного облака, диполи воды превращаются в ион гидроксония, вследствие чего обратный путь им закрыт. Таким образом, в отношении транспорта воды протонное облако играет роль не только барьера, но и клапана, пропускающего диполи воды наружу, но не впускающего внутрь клетки. Такой клапан одностороннего пропускания может быть причиной большего выхода воды из клетки при наличии кислоты в апопласте, чем это

обусловлено осмотическими причинами. В такой системе не может установиться динамическое равновесие: сколько молекул выделяется, столько и поступает обратно. Движение происходит только в одну сторону, это именно откачка воды. Окончательный результат связан, скорее всего, с параметрами протонного барьера (косвенно — с концентрацией кислоты). Это еще одно объяснение (согласующееся с первым — аномальные электрохимические свойства протона), почему кислота вызывает большую потерю воды, чем раствор соли изосмотической концентрации.

Чтобы разобраться в возможных механизмах наблюдаемых феноменов, вероятно, следует объяснить некоторые детали сложной механики обратной гравиметрической реакции, а именно — отмывки водой после действия кислоты (или щелочи). Возникают некоторые вопросы. Почему после действия кислоты отмывка водой не вызывает увеличения объема (массы, оводненности) корня, тем более восстановления его до исходного уровня, как это имело место всегда после действия соли? Почему вместо воды это восстановление объема производит щелочь? Почему не до конца? Почему после такой «нейтрализации» вода начинает действовать, как при обычной отмывке соли, и доводит объем объекта до исходного уровня? Вероятно, все эти моменты тесно связаны между собой.

Гипотеза протонного барьера, в общем, отвечает на многие из этих вопросов, в частности, относительно водонепроницаемости клеток. Это может быть следствием того, что проточный дистиллят не может удалить избыток протонов из апопласта и не происходит отмыв-

ка водой (не возрастает биомасса объекта). Как видно на рис. 3, по крайней мере, в течение 30 мин этот процесс не развивается, хотя кислота удалена и из омывающего корень раствора, и из свободного пространства (СП) тканей корня. Известно, что ионы насыщающего раствора начинают выделяться из СП в дистиллированную воду сразу же и с максимальной скоростью [21]. Но если все ионы из СП удалены, в т. ч. и сильно действующий протон, почему же вода не входит в корень и не увеличивает его объем? Можно предположить необратимые изменения, повреждения клеток кислотой, но при последующих процедурах восстановление объема все-таки происходит, как и повторная реакция. Значит в клетках сохраняется способность к обратимости и воспроизводимости быстрой ответной реакции на осмотическое воздействие (см. рис. 3, 4).

Можно попытаться дать альтернативное объяснение этому с помощью адсорбции ионов, которой придавал большое значение Д.А. Сабинин, рассматривая адсорбцию как первый этап взаимодействия растительной клетки с соевым раствором [18]. Необычный характер отмывки корней после действия кислоты (или щелочи), по-видимому, может быть связан с сорбцией ионов на ионообменных компонентах корня. Можно предположить, что в адсорбированном виде, так же как и в растворенном, протон и гидроксил могут влиять на осмотическое равновесие системы «клетки корня — среда». Речь идет о той части наружного раствора, которая проникла в водное свободное пространство (ВСП), и непосредственно контактирует с другой частью СП — Доннановским свободным пространством (ДСП) [21]. ДСП ха-

рактеризуется способностью, в соответствии с эффектом Доннана, к обменной сорбции ионов [15]. В таком случае, ионы, адсорбированные в апопласте, т. е. вне протопласта, но предельно близко к плазмалемме, могут оказывать влияние на осмотические процессы в клетке. Это касается, по-видимому, только ионов протона и гидроксила, вследствие их аномальных физико-химических свойств, о чем говорилось выше.

После действия кислоты адсорбированные в ДСП протоны не смываются водой и почти не вытесняются ионами нейтральных солей, удалить адсорбированные протоны удастся при помощи щелочи. NaOH, контактируя с адсорбированными в ДСП протонами, способна замещать их ионами натрия, потому что вытесняемый протон тут же выходит из обращения, соединяясь с гидроксидом в ходе реакции нейтрализации (с образованием молекулы воды). После замещения всех протонов ионами натрия ситуация становится аналогичной той, если бы гравиметрическая реакция происходила под действием не кислоты, а соли изоосмотической концентрации. Лишь после нейтрализации происходит отмывка водой (она была невозможна раньше), которая и выводит массу объекта на первоначальный уровень. При помощи этого способа можно объяснить реально наблюдаемую картину, допуская что адсорбированные в ДСП ионы протона могут оказывать на растительную клетку осмотическое (водоотнимающее) воздействие, находясь как в водном СП (в свободном виде), так и в Доннановском СП (в адсорбированном состоянии). Следует иметь в виду, что один из вариантов эффекта Доннана — это как раз двойной электри-

ческий диффузионный слой, который лежит и в основе протонного барьера. Оба рассматриваемые объяснения близки и, во всяком случае, не противоречат одно другому.

Как указывалось, в опытах был второй контроль — действие щелочи — вещества, по химическим (и физиологическим) функциям прямо противоположного кислоте. Но напомним, что гидроксил — тоже аномальный ион, хотя и в меньшей степени, чем протон. По ряду электрохимических параметров он соответствует приблизительно 2-валентному аниону. Оказалось, что ион гидроксила действовал в том же направлении — обезвоживал клетки корня, хотя слабее, чем кислота, но в 2 раза сильнее, чем хлорид натрия той же концентрации. Интересно, что реакция также была необратима на воде, только после нейтрализации щелочи кислотой можно было проводить обычную отмывку водой. По характеру действия щелочь была ближе не к соли, а к кислоте, только действовала слабее. Можно думать, что по аналогии в клетках корня в этом случае образовывался «гидроксильный барьер», не пропускающий воду. Но поскольку в клетках не известен пока гидроксильный насос (а только протонный), эти данные представляют значительно меньший интерес. Вероятно, они имеют прямое отношение к проблеме воздействия щелочного рН внешнего раствора на проницаемость клеток корня для воды.

По-видимому, можно считать твердо установленным, что протонный насос является обязательным атрибутом растительной клетки. Непрерывно выделяя ионы H^+ в апопласт клеток, он энергетически обеспечивает некоторые (многие)

ион-транспортные процессы в клетках корня, поддерживает электрофизиологическую и рН-регуляцию в системе протопласт — апопласт. С этими процессами тесно связаны другие составляющие (ВСО): транспорт воды и рост клеток растяжением (2-я фаза роста). Стрессовое воздействие резко активизирует работу протонного насоса, что приводит к созданию ПБ в примембранных участках апопласта, блокировке водных каналов (затруднение водоснабжения клеток и целого растения) и разрегулиции ион-транспортных процессов в корне, лежащих в основе минерального питания растений. Стресс вызывает, таким образом, глубокие нарушения всех процессов ВСО. Однако в нормальных условиях значительного накопления ионов H^+ в апопласте не происходит, возможно, потому, что как раз с такой скоростью они выходят из апопласта в наружную среду по концентрационному градиенту. При стрессе (в результате активации протонной помпы) протоны не успевают диффундировать в наружный раствор и накапливаются в апопласте, образуя транспортный барьер для минеральных ионов и воды в клетках корня. Отрицательное влияние ПБ сказывается длительное время (несколько суток). Снятие стресса может оказаться недостаточным для ликвидации последствий ПБ. В экспериментальных условиях эффективными оказываются сильные воздействия: электрохимическое удаление протонов или нейтрализация их щелочью. Как осуществляются эти процессы в естественных условиях (и возможны ли они) — остается неизвестным.

Таким образом, в модельных экспериментах было установлено, что появление во внешней среде

и в апопластах клеток корня некоторого избытка протонов сразу же, как и при гравиметрической реакции на действие соли, вызывало быструю реакцию выхода воды из клеток (лаг-период -1 с). Однако амплитуда реакции была значительно выше. Кроме того, при снятии воздействия (отмывке корня в дистиллированной воде) не имело места увеличение массы, что однозначно доказывало непроницаемость клеток для воды. Значит, уже несколько минут действия на корнях очень слабой кислоты (3~5 мМ HCl) переводили клетки в «закрытое» состояние для воды. По-видимому, плотность протонов в протонном барьере при стрессе тоже может приближаться к этому уровню (<5 мМ), чтобы вызывать устойчивую водонепроницаемость клеток, которая сохранялась еще десятки минут после того, как клетки переносили на 'дистиллированную воду. Из экспериментов следует, что вода продолжает с большой скоростью выходить из корня, когда встречный процесс — поглощение воды — уже невозможен. Между тремя генотипически различными объектами, принадлежащими к трем разным ботаническим семействам — сложноцветным, пасленовым и злаковым — обнаружены некоторые количественные различия в реакциях быстрой потери воды корнем при действии соли, кислоты или щелочи. Однако принципиальное (качественное) совпадение результатов на генотипически разных объектах можно трактовать в пользу универсальности наблюдаемых эффектов и основанных на них теоретических построений. По-видимому, следует заключить, что протонный барьер — не механизм адаптации, а дополнительный отрицательно действующий фактор

стресса, усугубляющий его угнетающее воздействие на растение.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Вахмистров* д. Б. Физиология растений: современное состояние и перспективы развития // Изв. АН СССР. Сер. биолог., 1978. № 6. С. 1561-1575. — 2. *Веселова Т.В., Веселовский В.А., Чернавский Д.С.* Стресс у растений. Изд-во МГУ, 1993. — 3. *Воробьев Л.Н., Егорова Н.Н.* Протонная емкость апопласта в корневой системе пшеницы // ДАН СССР. 1983. Вып. 3. С. 748-751. — 4. *Гордеев А.М.* Биофизические основы эколого-адаптивного земледелия. Смоленск: Смядынь, 1999. — 5. *Гордеев А.М., Гордеев Ю.А., Захарин А.А. и др.* Протонный барьер как феномен водно-солевого обмена растений // Изв. ТСХА, 2005. Вып. 1. С. 63—73. — 6. *Гороновский И.Т., Назаренко Ю.П., Некряч Е.Ф.* Краткий справочник по химии. 5-е изд. Киев. Наукова думка, 1987. — 7. *Гунар И.И., Паничкин Л.А.* Водно-ионные потоки и передача возбуждения у растений // Изв. ТСХА, 1969. № 5. С. 3-7. — 8. *Захарин А.А.* Метод исследования быстрой кинетики водообмена растений при изменении осмотического давления внешнего раствора // Физиология растений, 2001. Т. 48. № 1. С. 143-149. — 9. *Захарин А.А.* Быстрые реакции водообмена растений при воздействии на корни растворов солей различных концентраций // Физиология растений, 2001. Т. 48. № 2. С. 291 — 297. 10. *Захарин А.А.* О водно-солевом обмене растений и связанных с ним процессах // Изв. ТСХА, 2003. Вып. 2. С. 91-104. — 11. *Захарин А.А.* Водно-солевой обмен растений как сумма тесно сопряженных процессов // Докл. ТСХА, 2003. Вып. 275. С. 300-306. — 12. *Захарин А.А.* Быстрые процессы поглощения-выделения воды и электрофизиологические реакции корня в ответ на изменение солевого, осмотического и pH-статуса внешнего раствора // Физиология растений, 2005. Т. 52, № 1. С. 74-80. — 13. *Кларксон Д.* Транспорт ионов и структура растительной клетки. М.: Мир, 1978. — 14. *Курсанов А.Л.* Взаимодейст-

- вие физиологических процессов в растении. XX Тимирязевское чтение. М.: Наука, 1959.— 15. *Люттге У., Хигинботам Н.* Передвижение веществ в растениях. М.: Колос, 1984. — 16. *Лялин О.О., Ктиторова И.Н.* Влияние рН питательного раствора на мембранный потенциал клетки корневого волоска / / ДАН СССР, 1977.Т. 198. № 4. С. 963-965. — 17. *Мартин Р.* Введение в биофизическую химию, 1966. М.: Мир. — 18. *Сабинин Д.А.* Физиологические основы питания растений. М.: Изд. АН СССР, 1955. — 19. *Трофимова М.С., Жесткова И.М., Со- рокин Е.М. и др.* Место и роль аквапоринов в транспорте воды в растениях // Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского. Сер. Биология. Нижн. Новгород, 2001. С. 99—101. — 20. *Amtmann A., Jelitto T.C., Sanders D.* // Plant Physiol, 1999. Vol. 120. N 1. P. 331 — 338. — 21. *Canny M.J.* // Ann. Rev. Plant Physiol, Plant molec. Biol, Palo Alto (Calif.), 1995. Vol. 46. P. 215-236. — 22. *Murata K., Mitsuoka K., Hirai T. et al.* // Nature, 2000. V. 407. P. 599-605. — 23. *Tyer- man S.D., Bohnert H.J., Maurel C. et al.* // J. Exptl. Bot, 1999. Vol. 50. P. 1055-1071.

*Статья поступила
24 ноября 2004 г.*

SUMMARY

Research of thin fast waterexchange of intact plants kinetics effects is being done when changing salt, osmotic and pH-status of outward solution with the help of gravimetric method. In comparison with neutral salts, alkali and acid (in isoosmotic concentrations) reacted abnormally. Firstly, more active gravimetric reaction was induced (2 and 3.5 times accordingly). Secondly, permanent impermeability of cells to water was obtained, even after influence over it (washing with water up to the initial level). Effects detected are all in accordance with proton barrier hypothesis and with up-to-date water canal on plasmalemma conception besides. Some alternative explanations of phenomena studied and their possible mechanisms are also considered.