

ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ

Известия ТСХА, выпуск 2, 2001 год

УДК 581.1

ЗАВИСИМОСТЬ ЭЛЕКТРОФИЗИОЛОГИЧЕСКОЙ «ТОПОГРАФИИ» КОРНЯ ОТ СОСТАВА И КОНЦЕНТРАЦИИ ВНЕШНЕГО РАСТВОРА

А. А. ЗАХАРИН, Л. А. ПАНИЧКИН

(Лаборатория биофизики растений
и гидрофобизации семян)

Работа посвящена исследованию топографии электрического потенциала корня у разных растений, эффекта электрической перезарядки корня при смене ионного состава растворов. Дается оценка быстрой реакции и «чувствительности» электрофизиологических реакций.

Высокая селективность процессов поступления и распределения минеральных ионов в растении является ведущей концепцией теории ионного транспорта и имеет многочисленные экспериментальные подтверждения [7, 9]. Следствием высокой селективности плазмалеммы является избирательное поступление ионов в клетку, в об-

щем виде приводящее к неэквивалентности поглощения анионов и катионов. Эта неэквивалентность может в значительной мере снижаться в результате сопряженных ионных потоков как антипорта одноименно заряженных ионов, так и симпорта ионов, несущих противоположный электрический заряд, а также за счет активизации элек-

Работа выполнена при поддержке РФФИ. Грант № 99-04-49437.

трозависимых механизмов транспорта. Однако полной компенсации электрических зарядов, переносимых внутрь и наружу, как правило, не происходит, вследствие этого всякое изменение ионного состава внешнего раствора теоретически должно сопровождаться изменением разности электрических потенциалов (РЭП) на мембране [7-9].

Правда, возможно еще одно прямое следствие неэквивалентного распределения анионов и катионов — создание градиента рН по обе стороны мембраны, в том числе и за счет мембранного транспорта ионов протона и гидроксидов. На возможность возникновения градиентов рН вследствие неэквивалентного поглощения растением катионов и анионов из солей внешнего раствора указывал, в частности, Д. Н. Прянишников [1]. Такой подход известен в агрохимии и позволяет подразделить многие химически нейтральные соли, используемые в качестве удобрений, на физиологически кислые и физиологически щелочные в зависимости от того, катион или анион поглощается из соли с большей скоростью. Так, большинство нитратов представляют собой физиологически щелочные соли, так как ани-

он здесь поглощается намного быстрее катионов, в то время как в хлориде и сульфате калия быстрее поглощается катион и внешний раствор закисляется. При этом понятно, что закисление внешнего раствора означает одновременное повышение рН внутри клеток, и наоборот. В поддержании некоторого градиента рН, без сомнения, определенную роль играет протонный насос и механизмы сопряженного $K^+ - H^+$ или $Na^+ - H^+$ антипорта [1, 8, 9].

Таким образом, независимо от других механизмов электрогенеза (которые не рассматриваются в данной работе) разности электрических потенциалов (РЭП) внутриклеточные, как и РЭП между различными участками тканей и органов, должны быть связаны множественными и разнообразными связями с процессами ионного транспорта, избирательной проницаемостью мембран, с рН-регуляцией и другими процессами (в том числе с водным обменом). Если для наземных органов эта связь сильно опосредована через систему дальнего транспорта, то для корневой системы всякое изменение состава внешнего раствора должно сопровождаться электрической перезарядкой корня, т. е. изменением РЭП, которое,

скорей всего, будет происходить неодинаково для разных зон и участков корня.

В исследованиях разностей электрических потенциалов корня большое место занимает измерение внутриклеточных потенциалов корневых волосков разных объектов, в том числе *Trianea bogatensis* с крупными корневыми волосками [1]. В качестве моделей корней нередко использовали также водоросли, например, очень крупные интернодальные клетки харовых водорослей [7, 9]. В обоих случаях измеряли внутриклеточные РЭП с помощью стеклянных микроэлектродов. Измеряли также экстраклеточные РЭП корней при помощи макроэлектродов [1, 3]. Впрочем, во многих экспериментах один из электродов просто контактировал с раствором, в котором находилась корневая система. В ряде случаев измеряли потенциал некоторого случайно выбранного точечного участка корня. При таких «точечных» измерениях РЭП, однако, трудно получить полную электрофизиологическую характеристику, говорить об электрической «топографии» корня и ее изменениях. Топография РЭП надземных органов исследована довольно основательно, хотя и с помощью точечных измерений [3, 6]. По топографии РЭП

корня имеется гораздо меньше данных вследствие известных методических трудностей. В то же время очень интересная методическая идея на этот счет была предложена еще в 1960 г. [2].

Авторами настоящей работы был осуществлен принципиально новый метод исследования РЭП — сканирование корня в длину при помощи сифона периодического слива. Такое сканирование корня можно осуществлять по двум электрофизиологическим показателям: электропроводности тканей корня и по РЭП между корневой шейкой и различными зонами и участками корня. На каждую модификацию метода получено авторское свидетельство [3, 4]. В настоящей работе методом автоматического сканирования проводили исследование РЭП между корневой шейкой и разными участками корня на проростках нескольких видов растений при смене солевых растворов в изоосмотичных или разных концентрациях.

Цели работы — исследование топографии электрического потенциала корня у разных растений, наблюдение эффекта электрической перезарядки корня при смене ионного состава растворов, оценка быстродействия и «чувствительности» электрофизиологических реакций.

Методика

В качестве объектов использовали как совсем молодые проростки, с первичным, еще не разветвленным корнем, так и взрослые растения с хорошо дифференцированной корневой системой, состоящей из множества корешков разных порядков. Во втором случае, однако, воспроизводимость кривой сканирования по РЭП получалась хуже, а кроме того физиологическая интерпретация результатов была сильно затруднена, поскольку одновременно измерялась суммарная РЭП от различных участков корней разных порядков. Поэтому большая часть данных получена на молодых проростках в возрасте 3-5 суток. Объектами служили проростки кукурузы, гороха, подсолнечника, огурца, томата и других растений. Проростки выращивали на водопроводной воде при температуре 20-22°C, относительной влажности воздуха 50-70%, при естественном освещении летом или с подсветкой лампами ДРЛ зимой.

Метод сканирования корня в длину по РЭП был описан ранее [4]. Принципиальная схема метода представлена на рис. 1. В основе метода лежит сканирующий сифон (1), состоящий из измерительного стакана и сливного

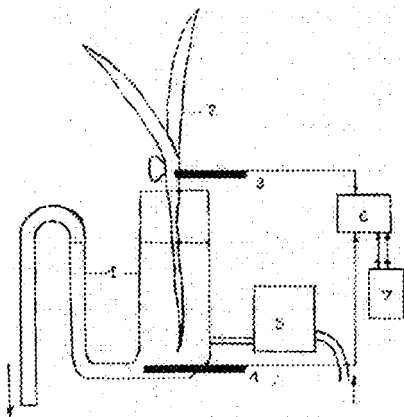


Рис. 1. Принципиальная схема измерения РЭП методом сканирования корня в длину.

1 — сканирующий сифон; 2 — объект; 3 — индифферентный электрод; 4 — измерительный электрод; 5 — микронасос; 6 — милливольтметр; 7 — самописец.

колена. По полиэтиленовому капилляру с заданной скоростью в сифон подается вода или раствор, вследствие чего уровень жидкости в стакане медленно поднимается. По достижении критического уровня происходит быстрый слив жидкости из сифона, после чего начинается новый идентичный цикл наполнения и слива, и так далее. В измерительный стакан сифона помещается корень проростка (2) так, чтобы корневая шейка размещалась чуть выше максимального уровня

поднятия жидкости в сифоне, а корень был погружен в стакан (не прикасаясь к стенкам). Один электрод (3) контактирует с корневой шейкой или зерновкой (кукуруза) проростка, второй (4) — с раствором в сифоне, но чтобы при этом измерительный электрод контактировал с корнем только через раствор, избегая прямого касания.

Мениск раствора служит в этом случае подвижным кольцевым контактом, который с заданной скоростью передвигается по корню снизу вверх, не травмируя его, и производит собственно сканирование. Использовали главным образом графитовые электроды, иногда нихромовые. В специальных проверочных экспериментах сопоставляли графитовые электроды с неполяризуемыми хлорсеребряными типа ЭВЛ и получили принципиально тождественные результаты. Раствор в сканирующий сифон подавали при помощи перистальтического насоса (5) или самотеком при $Ah = \text{const}$. Момент слива, продолжающийся несколько секунд, записывался на самописце в виде короткого броска потенциала, после чего следовала очередная фигура сканирования. РЭП (мВ), снимаемая с объекта, подавалась на усилитель постоянного напряжения с высоким входным сопротивлением (6), а с него — на

самопишущий милливольтметр (7). Запись состояла из последовательного ряда фигур сканирования, которые были идентичны некоторое время (до 1-2 ч), если сканирующий раствор не меняли.

Способом точечных измерений на проростках огурца и томата исследовали быструю кинетику РЭП при внезапном изменении состава или концентрации внешнего раствора. Интактный или декапитированный проросток размещался целиком в воздухе, а на корневую шейку по полиэтиленовому капилляру подавали с постоянной скоростью проточный раствор, стекающий с кончиков корней. Один графитовый электрод контактировал с корневой шейкой интактного или с пасокой декапитированного растения, второй касался корней и омывающего их раствора. Проросток, электроды и часть проточной системы были экранированы свернутым в цилиндр листом алюминия. При смене растворов в полиэтиленовый капилляр захватывался воздушный пузырек, отделенные им предыдущий и последующий растворы двигались без перемешивания, а сам пузырек являлся меткой, позволяющей определять момент подачи нового раствора на корень с точностью до долей секунды.

Результаты

На рис. 2 показана быстрая кинетика РЭП корня при смене растворов, последовательно — хлорид кальция, натрия, калия, в концентрации 3 мэкв/л. При этой и более низкой концентрациях соли не повреждают корень, а при коротких экспозициях и не оказывают влияния на его свойства. Поэтому на один образец можно было последовательно накладывать несколько воздействий, перемежая их нейтральным воздействием — отмывкой дистиллированной водой. Действие каждой соли вызывало индивидуальную, не сходную с другими солями реакцию, хотя в целом они подчинялись общим закономерностям. Отмывка водой вызывала более простой формы обратную реакцию с возвратом РЭП приблизительно на исходный уровень, однако более точно

стационарные уровни РЭП на воде после разных солей различались. В то же время повторные действия солей давали хорошие совпадения с предыдущими, что может свидетельствовать о неизменности физиологического состояния объекта. Обычно выход на новый уровень заканчивался через 10-15 мин, что указывает на высокое быстрое действие реакции, лаг-период которой был меньше 1 сек.

Таким образом было исследовано действие хлоридов 3 катионов в диапазоне концентраций 0,01-10 мМ. На рис. 3 представлены концентрационные зависимости для 3 солей, которые, на наш взгляд, хорошо отражают и катионную селективность корней растений, и потенциалообразующую роль каждого катиона, и изменение этих функций в зависимости от концентрации соли. При низких концентрациях

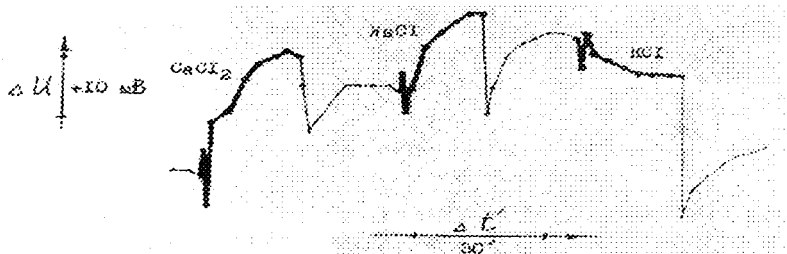


Рис. 2. Кинетика изменений РЭП корней проростков томата при действии разных солей на фоне воды.

Концентрации солей изоосмотичны — 3 мэкв/л. *Жирные линии* — корни омываются раствором соли, *тонкие* — водой.

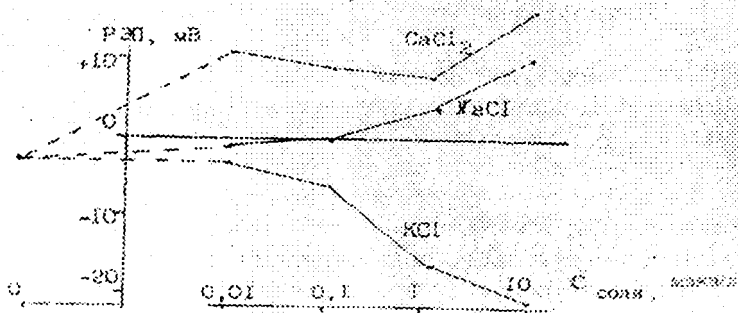


Рис. 3. Концентрационная зависимость РЭП между гипокотилем и корнем проростков томата для растворов 3 солей. Повторность контроля — 63, остальных точек — 4-7.

(до 0,1 мМ) кальций даже по знаку заряда отличается от достоверно не различимых калия и натрия, при более высоких концентрациях (1—10 мМ) достоверно не различимыми становятся хлориды кальция и натрия, а КСl дает в этом случае потенциал на 30 мВ ниже, к тому же другой полярности. При переходе к повреждающим концентрациям (50—100 мМ)

концентрационные кривые сближаются, но при дальнейшем росте концентраций (> 100 мМ) хлорид натрия снова начинает отличаться от других солей.

Для получения развернутой картины электрофизиологических свойств корня использовали метод сканирования корня в длину по РЭП. На рис. 4 приведены образцы оригинальной записи на

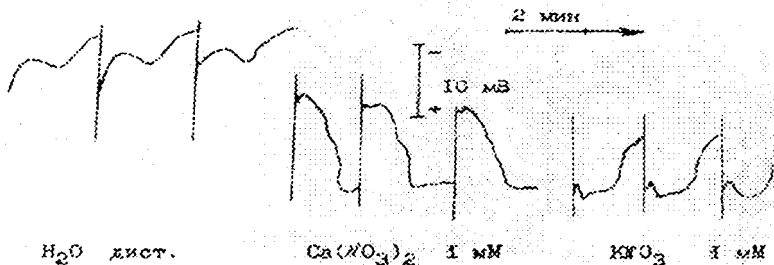


Рис. 4. Сканирование по РЭП корня проростка кукурузы на различных растворах.

Длина корня — 15 мм, слева — апекс, справа — базальная часть. Образец оригинальной записи.

корне 3-дневного интактного проростка кукурузы. Видно хорошее воспроизведение последовательных циклов сканирования как на воде, так и на растворах солей. Хорошо заметны существенные различия формы фигур сканирования, т. е. изменение электрической топографии корня. Переход от одной формы к другой при смене раствора проходил через 2~3 промежуточные фигуры и занимал обычно 5—10 мин в зависимости от продолжительности одного цикла.

На рис. 5 сопоставлены кривые сканирования по РЭП корня проростка подсолнечника при действии воды и 5 солей, используемых в питательной смеси Кнопа. Хорошо видны различия фигур сканирования, причем различия имеют место даже если меняются не оба иона соли, а

только один. Примечательно, что не только моносолевые растворы, но и смесь солей, подобная питательному раствору, дает характерную кривую сканирования, не тождественную ни одной из кривых, входящих в эту смесь солей.

На рис. 6 сравниваются кривые сканирования корней 5-дневных проростков 2 сортов огурца. Кривые существенно различались на дистилляте и на 2 солях, правда, на сульфате магния в меньшей степени. Эти данные, а также сопоставление результатов, полученных на разных культурах, позволяют заключить, что в топографии РЭП корня существуют геноспецифические различия, а метод сканирования обладает достаточной разрешающей способностью для их выявления.

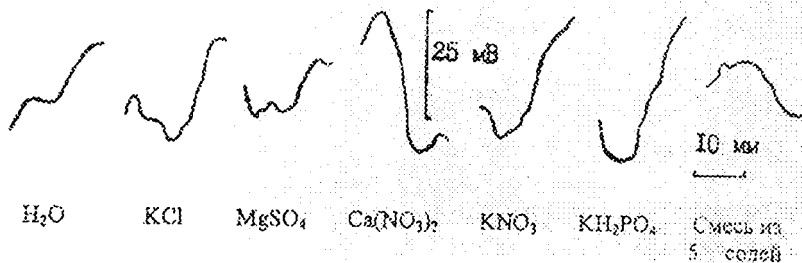


Рис. 5. Топография распределения электрических потенциалов вдоль корня подсолнечника в зависимости от ионного состава омывающего корень раствора.

Длина корня 18 мм, *слева* — апекс, *справа* — базальная часть. Концентрация всех солей 1 мМ.

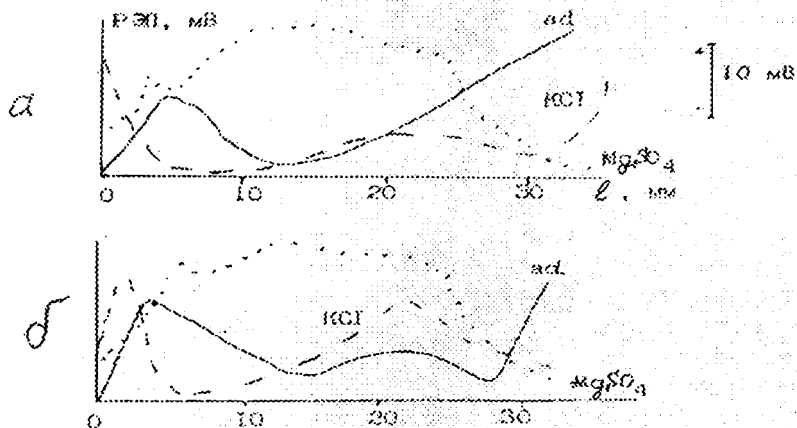


Рис. 6. Топография РЭП между корневой шейкой и разными участками корня в зависимости от состава раствора.

Проростки огурца сорта Фортуна (а) и Весенний салатный (б) в возрасте 5 сут. На оси абсцисс — расстояние от кончика корня, мм.

Обсуждение результатов

Быстрые электрофизиологические реакции корня, возникающие в ответ на смену ионного состава раствора, не сопровождающуюся осмотическим шоком, были исследованы во всем физиологическом диапазоне концентраций (10^{-5} - 10^{-2} М). Подтверждены высокая скорость и очень низкая инерционность реакции, а также показаны высокая чувствительность ($1(\Gamma^5$ М) и селективность (даже в отношении мало различающихся солей). Одновременно на этих же проростках томата при помощи гравиметрического метода [5] регистрировали быст-

рые реакции водообмена корней при внезапном действии солей растворов. Обе реакции — гравиметрическая и электрофизиологическая — обладали очень малым лаг-периодом, порядка 1 сек. Однако прямое сопоставление показало, что лаг-период электрофизиологической реакции существенно меньше (примерно в 2 раза), т. е. первичное изменение РЭП происходит раньше, чем начинается выход воды из корня.

Последнее обстоятельство принципиально важно, оно дает возможность объяснить сложную форму кинетики РЭП в первые моменты воздействия, которая видна, на-

пример, на рис. 2. Когда на омываемый водой корень внезапно попадает солевой раствор (даже в невольной концентрации), происходит мгновенное изменение электрохимического равновесия в системе корень-среда, сопровождающееся скачком потенциала, но секунду спустя начинается, тоже очень быстрое, изменение РЭП в обратном направлении, которое, однако, очень скоро сменяется более медленным и все замедляющимся изменением потенциала в направлении первичного скачка. Можно предположить, что начавшийся процесс изменения РЭП (вплоть до электрохимического равновесия с новым раствором) сейчас же прерывается очень быстрым выделением воды из объекта, которое начинается позже как раз на доли секунды или на секунду. Начало этого процесса (выхода воды из корня под действием солевого раствора) отмечается коротким нарушением в ходе довольно простых по форме переходных кривых РЭП. В дальнейшем установление равновесия (уже с учетом нового фактора — нарастающего выхода воды из корня) происходит довольно монотонно.

Широко известный точечный способ измерений был использован в данном случае потому, что метод сканирова-

ния корня по РЭП не обладает высоким разрешением во времени, его инерционность может достигать 2 — 5 мин (в зависимости от частоты срабатывания сифона). Основная часть исследований проведена методом сканирования корня по РЭП. Было обнаружено, что изменение ионного состава омывающего корень раствора, даже в отсутствие изменений ионной силы и осмотического давления, вызывает электрическую перезарядку корня, причем неидентичную для разных зон и участков корня. Это указывает на существование динамического электрохимического равновесия в системе корень-среда, что в условиях непрерывно меняющегося внешнего раствора, по-видимому, может играть функциональную роль, связанную с ион-транспортной работой корневой системы [8, 9]. Вследствие этого изменяется топография распределения электрических потенциалов по длине корня, но оказалось, что эти изменения отражают еще и генотипические особенности (на уровне видов и сортов). В принципе такая перезарядка корня под влиянием низких концентраций различных солей является совершенно новым феноменом, который не удавалось зарегистрировать другими методами. Электро-

химическое равновесие между корнем и средой мало инерционно и высоко чувствительно к изменениям ионного состава среды, даже незначительным и на фоне низких концентраций солей.

Интересно, что быстрая кинетика водообмена корней растений при действии солей, исследуемая с помощью гравиметрического метода [5], обладала такими же кинетическими параметрами и рядом других свойств: градуальное действие солей в широком диапазоне концентраций, хорошие обратимость и воспроизводимость реакции, эффективность очень низких концентраций и малых концентрационных градиентов солей. В этом случае также имеет место очень чувствительное динамическое равновесие в системе корень-среда, только равновесие осмотическое. Таким образом, корень, находясь в непрерывно изменяющейся среде, осуществляет с высокой скоростью постоянную коррекцию процессов транспорта минеральных ионов и воды в результате поддержания электрохимического и осмотического равновесий в системе корень-среда. Это хорошо подтверждает идею о неразрывной связи транспорта воды и минеральных ионов в растении, а также электрофизиологических явлений.

При большом сходстве принципиальное различие процессов состоит в том, что быстрые реакции водообмена обладают низкой селективностью, а электрофизиологические реакции корня — очень высокой. В обоих случаях кислота или щелочь в невысоких концентрациях (1 — 5 мМ) вызывали более сильную ответную реакцию, чем изосмотический раствор нейтральной соли, что может, по-видимому, свидетельствовать о рН-зависимости гравиметрической и электрофизиологической реакций. Механизмы поддержания обоих видов равновесий между корнем и средой, весьма вероятно, могут быть физико-химической природы судя по высокой скорости и очень малому лаг-периоду гравиметрической и электрофизиологической реакций. Однако при больших экспозициях в поддержании этих равновесий со значительной вероятностью начинают участвовать и другие, гораздо более медленные и более «активные» процессы, частично упомянутые во вводной части работы.

Таким образом, в работе исследованы быстрая кинетика и «топография» РЭП корня при резком изменении ионного состава внешнего раствора. Теоретически ожидаемые эффекты действия

солей даже в низкой концентрации — высокая селективность, градуальность, быстрая перезарядка корня при смене растворов, строгая регуляция электрохимического равновесия в системе корень-среда — были, действительно, обнаружены в экспериментах при помощи метода сканирования корня по РЭП. Этот оригинальный нетравмирующий метод имеет ряд достоинств и может быть применен как для экспресс-тестирования физиологических свойств растений, так и для исследований фундаментальных проблем, касающихся солевого стресса, особенностей водного обмена и минерального питания растений.

ЛИТЕРАТУРА

1. Агрохимия / Под ред. Б. А. Ягодина. М.: Колос, 1982. — 2. Буреш Я., Петрань М., Захар И. Электрофизиологические методы исследования. М.: ИЛ, 1962. — 3. Захарин А. А., Паничкин Л. А., Вольф О. М. Спо-

соб ранней диагностики солеустойчивости растений. Автор. свидет. № 1764568 А1 кл. А 01 G 7/00 от 1.06.1992. — 4. Захарин А. А., Паничкин Л. А., Бибикова Т. Н. Способ различения генетически близких образцов растений. Автор, свидет. № 1757527 А1 кл. А 01 G 7/00 от 1.05.1992. — 5. Захарин А. А. Быстрые реакции водообмена растений при воздействии на корни растворов солей различных концентраций. — Физиол. раст., 2001. — 6. Маслоброд С. Н. Электрофизиологическая полярность растений. Кишинев: Штиинца, 1973. — 7. Медведев С. С. Электрофизиология растений. С.-Пб.: Изд-во ун-та, 1998. — 8. Оприлов В. А. Функциональные аспекты биоэлектrogenеза у высших растений. — 59-е Тимирязевские чтения. Н.-Новгород, 1998. — 9. Юрин В. М., Соколик А. И., Кудряшов А. П. Регуляция ионного транспорта через мембраны растительных клеток. Минск: Наука і тэхшка, 1991.

*Статья поступила
12 марта 2001 г.*

SUMMARY

The work is dedicated to investigating topography of electric potential in root of different plants, of the effect of electric recharging the root with the change of ion composition of solutions. Quick action and «sensitivity» of electrophysiological reactions are estimated.