

На правах рукописи



Халилова Людмила Абдулгалиевна

**Пути транспорта СГ в системе целого растения
у галофита *Suaeda altissima* (L.) Pall.**

03.00.12 – Физиология и биохимия растений

**Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Москва - 2008

Работа выполнена в Лаборатории солевого обмена и солеустойчивости Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН и на кафедре физиологии растений и дарвинизма Биологического факультета ДГУ.

НАУЧНЫЕ РУКОВОДИТЕЛИ:

доктор биологических наук,
профессор
доктор биологических наук,
профессор

Балнокин Юрий Владимирович

Юсуфов Абдулмалик Гасамутдинович

ОФИЦИАЛЬНЫЕ ОППОНЕНТЫ:

доктор биологических наук,
профессор
доктор биологических наук

Кондратьев Михаил Николаевич

Обручева Наталья Владимировна

ВЕДУЩАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ:

Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН

Защита диссертации состоится « 18 » ноября 2008 г. в 11 часов на заседании совета по защите докторских и кандидатских диссертаций Д 002.210.01 при Институте физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН по адресу 127276, Москва, ул. Ботаническая, 35, факс: (495)9778018, e-mail: ifr@ippras.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН.

Автореферат разослан « 15 » октября 2008 г.

Ученый секретарь

совета по защите докторских
и кандидатских диссертаций
кандидат биологических наук

М.И. Азаркович

ВВЕДЕНИЕ

Солеустойчивость растений остается одной из актуальных проблем физиологии. К настоящему времени в основных чертах стало ясным, какие механизмы лежат в основе устойчивости растений к высоким концентрациям солей на клеточном уровне. К ним в первую очередь относят локализованные в плазмалемме и тонопласте ион-транспортирующие системы, поддерживающие низкие концентрации Na^+ и Cl^- в цитоплазме, а также системы биосинтеза осмолитов – низкомолекулярных органических соединений, которые выполняют осморегуляторную и протекторную функции. Вместе с тем, работы последних лет показывают, что солеустойчивость растений во многом определяется эффективностью механизмов, функционирующих в системе целого растения. В частности, она зависит от распределения активности ион-транспортирующих систем и систем синтеза осмолитов по органам и тканям. Важную роль играет способность растения к градиентному распределению ионов и осмолитов по ярусам листьев. Вместе с тем, работ, посвященных ионному гомеостатированию в системе целого растения в условиях засоления, крайне мало. Слабо изучены механизмы дальнего транспорта Na^+ и Cl^- и пути передвижения этих ионов в целом растении. Особенно мало известно о транспорте Cl^- .

Удобными модельными растениями для исследования солеустойчивости на уровне целого организма являются галофиты. В работах, выполненных ранее в лаборатории солевого обмена и солеустойчивости ИФР РАН, было показано, что соленакапливающий галофит *Suaeda altissima* поддерживает градиент концентраций ионов Na^+ в системе почва-корень-побег (Балнокин и др., 2005). Ионы Na^+ в клетках листьев этого растения накапливаются до гораздо более высокого уровня, чем в клетках корней, и содержание их там достигает 1,0 – 1,5 моль/г сырой массы. В клетках корней, в свою очередь, оно было выше, чем в почве. Такое распределение ионов обеспечивает поддержание градиента водного потенциала в системе целого растения. За счет этого вода транспортируется из почвы в корень и далее по стеблю в листья. Аккумуляция ионов Na^+ и, вероятно, Cl^- в листьях предполагает наличие эффективного транспортного пути для этих ионов из корней в побеги. В клетках надземных органов ионы депонируются в вакуолях с затратой метаболической энергии. Мы предположили, что у соленакапливающих галофитов и, в частности, у *Suaeda* движение Na^+ и Cl^- в системе целого растения осуществляется, в основном, по апопласту. При доставке в листья ионов Na^+ и Cl^- , требующихся там в больших количествах, их транспорт от клетки к клетке через мембраны или по симпласту встречал бы на своем пути большие ограничения.

Доказательству существования основного транспортного пути для ионов Cl^- через апопласт корня и по элементам ксилемы стебля и листьев *S. altissima* посвящена первая часть работы.

В исследованиях, выполненных ранее в лаборатории солевого обмена и солеустойчивости, на листьях нескольких видов галофитов был продемонстрирован пиноцитоз (Куркова, Балнокин, 1992, 1994, 2002). Были получены предварительные

данные, которые указывали на возможность участия пиноцитоза в транспорте Cl^- в клетках листьев галофитов.

Вторая часть работы посвящена изучению процесса пиноцитоза в клетках корней *S. altissima* и исследованию возможностей его участия в транспорте Cl^- .

Актуальность исследования. Биохимические и физиологические механизмы солеустойчивости растений на клеточном уровне в целом расшифрованы. К настоящему времени, однако, стало ясным, что устойчивость растений к высоким концентрациям солей во многом определяется механизмами транспорта ионов в системе целого растения. Солеустойчивость зависит от распределения ионов Cl^- и Na^+ по органам и тканям растения, активности ион-транспортующих систем в разных тканях и, что особенно важно, от путей движения ионов Cl^- и Na^+ в целом растении. Именно этому актуальному вопросу и посвящена настоящая диссертационная работа.

Цели и задачи исследования. Цели - исследовать пути транспорта ионов Cl^- у соленакапливающего галофита *S. altissima* в системе целого растения. Показать связь транспорта ионов Cl^- с процессом пиноцитоза в клетках корня этого растения.

В связи с этим были поставлены следующие задачи:

- 1) Измерить содержание ионов Cl^- , Na^+ и K^+ в органах *S. altissima* при разных концентрациях NaCl в среде культивирования, сравнить распределение ионов Cl^- по органам с распределением Na^+ и K^+ .
- 2) Исследовать анатомию органов и ультраструктуру клеток корня, стебля и листьев *S. altissima*.
- 3) Исследовать распределение ионов Cl^- в тканях и клетках органов *S. altissima* методом электронной цитохимии с использованием ионов серебра, а также с помощью флуоресцентной метки на ионы Cl^- - MEQ (6-methoxy-*N*-ethylquinolinium iodide).
- 4) Измерить концентрации ионов Cl^- и Na^+ в пасоке *S. altissima* при разных концентрациях NaCl в среде культивирования.
- 5) Исследовать влияние NaCl на процесс пиноцитоза (экзо- и эндоцитоза) в клетках корня *S. altissima* методом электронной микроскопии.
- 6) Исследовать влияние NaCl на процесс эндоцитоза в клетках корня *S. altissima* с помощью флуоресцентного зонда FM 4-64.
- 7) Исследовать связь процесса пиноцитоза в клетках корня *S. altissima* с транспортом ионов Cl^- методом электронной цитохимии.

Научная новизна работы. Впервые показано, что у галофита *Suaeda altissima*: 1) транспорт Cl^- в корне в восходящем направлении осуществляется не по сосудам ксилемы, а по апопласту коры и эпидермиса, 2) в транспорте ионов Cl^- на клеточном уровне участвуют пиноцитозные структуры, а именно, пиноцитозные инвагинации и мультивезикулярные тела.

Теоретическая и практическая значимость работы. Работа носит фундаментальный характер. Полученные результаты демонстрируют пути движения Cl^- в целом растении у соленакапливающего галофита *S. altissima* и вносят значительный вклад в расшифровку механизмов, осуществляющих транспорт Cl^- . Полученные результаты

могут быть использованы в учебных курсах по физиологии растений на биологических факультетах университетов и в ВУЗах сельскохозяйственного профиля.

Апробация работы. Материалы работы были представлены на: Международной научной конференции «Современные проблемы адаптации и биоразнообразия» (Махачкала, 2006), IV Международной конференции «Регуляция роста, развития и продуктивности растений» (Минск, 2005), XIII Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2006» (Москва, 2006), I (XI) Международной конференции молодых ботаников в С.-Петербурге (С.-Петербург, 2006), VI съезде общества физиологов растений России и Международной конференции «Современная физиология растений: от молекул до экосистем» (Сыктывкар, 2007), Международной конференции «Физиологические и молекулярно-генетические аспекты сохранения биоразнообразия» (Вологда, 2005), Годичном собрании ОФР и Международной конференции «Физико-химические основы структурно-функциональной организации растений» (Екатеринбург, 2008).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 8 работ.

Структура и объём диссертации. Работа изложена на 125 страницах машинописного текста и содержит 36 рисунков. Список литературы включает 229 источников.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.

Объектом исследования являлся соленакапливающий галофит семейства маревые - *Suaeda altissima* (L.) Pall. (сведа высокая).

Условия культивирования. Если не оговорено особо, растения выращивали в факторостатной камере при 24°C в водной культуре в стандартной питательной среде Робинсона и Даунтона (Robinson, Downton, 1985). Растения освещали натриевыми лампами высокого давления Reflux 250, с фотопериодичностью 12ч/12ч день/ночь. Интенсивность света составляла 150 Вт·м⁻²·с⁻¹.

Определение содержания Na⁺ и K⁺ в органах. Листья и корни растений высушивали при 105°C и измельчали до порошкообразного состояния. Из полученного материала извлекали соли водной экстракцией при 100°C. Концентрации Na⁺ и K⁺ в экстрактах определяли с помощью абсорбционного спектрофотометра Hitachi-207 (Япония).

Ультраструктуру клеток исследовали методом электронной микроскопии.

Распределение ионов CF по органам и тканям исследовали электронно-цитохимическим методом с использованием ионов серебра, образующих с CF электронно-плотный осадок AgCl, а также с помощью флуоресцентного красителя MEQ (6-methoxy-*N*-ethylquinolinium iodide). В работе использовали непроникающую в клетки окисленную форму MEQ. Флуоресценцию наблюдали с помощью микроскопа Carl Zeiss Axio Imager1 при длинах волн $\lambda_{ex}=344$ нм и $\lambda_{em}=440$ нм.

Пасоку получали из растений при 24°C после удаления надземных органов. Эксудат собирали на протяжении 48 часов.

Концентрацию ионов Na^+ и K^+ в пасоке определяли с помощью абсорбционного спектрофотометра Hitachi-207 (Япония). Для этого собранную пасоку предварительно сжигали методом «мокрого озоления» в присутствии серной кислоты.

Содержание Cl^- в органах и концентрацию Cl^- пасоке определяли титрованием водного экстракта органов или минерализованной пасоки, соответственно, азотнокислой ртутью (Bowersi, Verkman, 1991).

Концентрацию ионов NO_3^- в пасоке определяли с помощью NO_3^- -селективного электрода « NO_3^- - 021» (ЭЛИТ, «НикоАналит»).

Исследование эндоцитоза в клетках корня с помощью флуоресцентного красителя FM 4-64. Интактные отсеченные корни помещали в раствор FM 4-64 (N-(3-triethylammoniumpropyl)-4-(6-(4-(dibutylamino)phenyl)hexatrienyl)pyridinium dibromide). Флуоресценцию наблюдали с помощью микроскопа Carl Zeiss Axio Imager1 при длинах волн $\lambda_{\text{ex}}=558$ нм и $\lambda_{\text{em}}=734$ нм.

Статистика. Эксперименты по ионному составу органов растений и пасоки проведены в 15 биологических повторностях. На графиках представлены средние значения и их стандартные отклонения ($P=0,95$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.

Содержание Cl^- , Na^+ и K^+ в органах *Suaeda altissima* при разных концентрациях NaCl в среде культивирования. Распределение Cl^- и Na^+ по органам, исследованное при разных уровнях засоления питательной среды, указывает на тип организации дальнего транспорта ионов у растений. Другими словами, такого рода эксперименты показывают, относится ли исследуемое растение к галофитам соленакапливающего, солелокализирующего или солевывделяющего типа. Корни и листья *S. altissima* аккумулировали Cl^- и Na^+ (рис.1а,б). Содержание этих ионов в органах было тем больше, чем выше была наружная концентрация NaCl . При максимальной концентрации NaCl в среде (1000 мМ), содержание Cl^- в листьях достигало 600 ммоль·кг⁻¹, а Na^+ - было более 1000 ммоль·кг⁻¹. Содержание Cl^- в листьях было ниже, чем в корнях практически во всем диапазоне наружных концентраций NaCl , тогда как содержание Na^+ в листьях, наоборот, существенно превышало таковое в корнях. Полученные в этих экспериментах результаты по распределению Na^+ совпадают с полученными ранее данными по содержанию этого иона в органах *S. altissima* (Балнокин и др., 2005).

Более высокое содержание ионов Na^+ в листьях, чем в корнях типично для соленакапливающих галофитов (Балнокин и др., 2005). У этих растений поглощенные корнями ионы транспортируются в клетки надземных органов, где они депонируются в вакуолях. Полученный результат (рис.1а,б) подтверждает то, что *S. altissima* относится именно к этой группе галофитов.

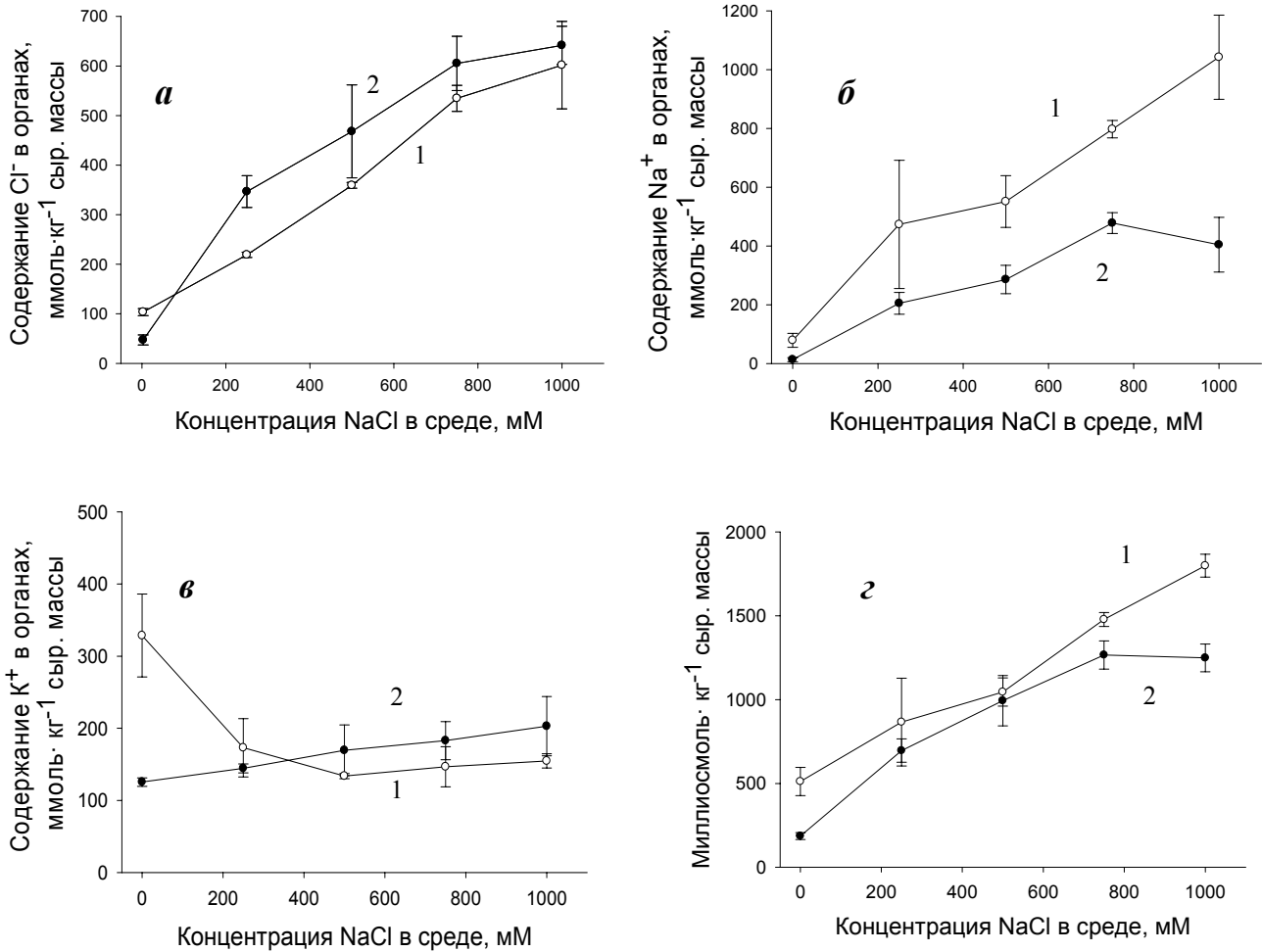


Рис.1 Содержание Cl^- (а), Na^+ (б), K^+ (в) и осмолярность (г) в органах *S. altissima* в зависимости от концентрации NaCl в среде. 1 – листья, 2 – корни.

По мере увеличения концентрации соли в среде содержание K^+ в корнях монотонно возрастало, приблизительно от 120 до 200 ммоль·кг⁻¹ (рис.1в). В листьях наибольшее содержание K^+ (приблизительно 330 ммоль·кг⁻¹) наблюдалось при наружной концентрации соли 3 мМ. При повышении концентрации NaCl до 250 и 500 мМ содержание K^+ снижалось до 170 и 130 ммоль·кг⁻¹, соответственно. При дальнейшем повышении наружных концентраций соли, содержание K^+ в листьях поддерживалось в этих пределах.

Полученные результаты по распределению Cl^- , Na^+ и K^+ в органах *S. altissima* следует обсудить с точки зрения их участия в поддержании градиента водного потенциала ($\Delta\Psi$) в растении. Для того, чтобы вода передвигалась из корней в листья, водный потенциал корней должен быть выше водного потенциала листьев. Основным компонентом водного потенциала (Ψ) является осмотический потенциал. Особенно большой вклад ионов в осмотический потенциал наблюдается у соленакапливающих галофитов. На рис. 1г, представлена осмолярность органов *S. altissima*, создаваемая ионами Cl^- , Na^+ и K^+ , в зависимости от концентрации NaCl в среде. Можно видеть, что суммарная осмолярность, создаваемая этими ионами, выше в листьях, чем в корнях, что

отвечает условию движения воды из корней в листья. При всех концентрациях NaCl в среде, за исключением 3 мМ, содержание Cl⁻ в листьях было ниже, чем в корнях (рис.1а). Следовательно, ионы Cl⁻ не участвуют в поддержании ΔΨ между корнями и листьями нужной направленности (Ψ_{корней}>Ψ_{листьев}). Основной вклад в поддержание такого градиента вносят ионы Na⁺ (рис.1б). Однако, при низкой концентрации соли (3 мМ) наибольший вклад в снижение Ψ листьев вносили ионы K⁺ (см.рис.1в).

Анатомия *Suaeda altissima*. Поглощенные корнями галофитов ионы Cl⁻ и Na⁺ должны доставляться в надземные органы. Исследование путей движения ионов в целом растении требует знания его анатомии.

Исследования, проведенные с помощью светового и электронного микроскопов, показали, что анатомия корня *S. altissima* типична для корня двудольного растения. Тем не менее, некоторые черты строения, не свойственные корням двудольных гликофитов, были обнаружены.

1) В зоне поглощения клетки эпидермиса и коры образуют амeboобразные выросты и складки (рис.2а). Подобного рода структуры не встречаются в клетках надземных органов. Благодаря таким выростам и складкам возрастает площадь поверхности клеточных стенок, а также площадь плазмалеммы и тонопласта. Это, в свою очередь, увеличивает контактирующие поверхности примыкающих друг к другу клеток, облегчая транспорт веществ в радиальном направлении корня. При этом увеличивается и площадь сечения апопластного пути движения веществ в аксиальном направлении, что следует из рассмотрения поперечных срезов корня. Исследования, проведенные ранее, показали, что наличие выростов и складок не является следствием обезвоживания органа. Подобного рода образования наблюдались и при высокой оводненности тканей (Куркова и др., 2002).

2) Применение берберина - флуоресцентной метки на суберин, показало, что в условиях засоления клеточные стенки экзодермы и эндодермы корня сильно утолщаются и подвергаются суберинизации (рис.2б). Следует отметить, что и в экзодерме, и в эндодерме имеются пропускные клетки, клеточные стенки которых не суберинизированы.

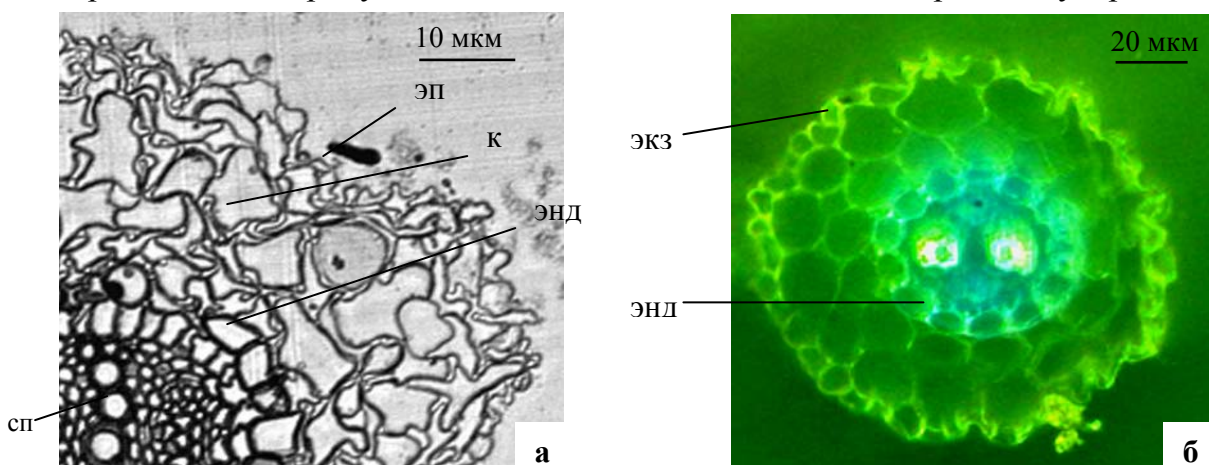


Рис.2. Амебообразные выросты и складки, образующиеся в клетках корня *S. Altissima* (а) (зона поглощения) и окрашивание берберинем суберинизированных участков клеточных стенок в корне *S. altissima* (б) (зона растяжения); эп – эпидермис (экзодерма), к – кора, экз – экзодерма, энд – эндодерма, сп – сосудистый пучок.

Стебель *S. altissima* также имеет типичное строение, характерное для двудольных растений. В стебле наблюдается хорошо развитая проводящая система. Проводящие пучки, представленные сосудами, трахеидами, флоэмой и лежащей между ксилемой и флоэмой камбиальной тканью, располагаются по кругу по периферии стебля. В центре находятся крупные клетки хорошо развитой водоносной паренхимы.

В зоне корневой шейки происходит переход от типичной структуры корня к типичной структуре стебля. Клетки коры корня редуцируются. На поперечном срезе видно, что большую часть нижней части шейки занимают ксилемные элементы. В центральной части корневой шейки формируется сердцевина, образованная водоносной тканью. Клетки сердцевинки занимают тем больший объем, чем дальше исследуемая зона отстоит от базальной части корня.

Листья *S. altissima* имеют игольчатую форму. Клетки эпидермиса покрыты толстым слоем кутина. Внутри расположены клетки мезофилла, а также хорошо развитая водоносная ткань. Клетки водоносной ткани характеризуются наличием крупной вакуоли. Проводящая система листа состоит из одного, реже трех сосудистых пучков.

Распределение ионов Cl^- в тканях и клетках органов *S. altissima*. Одним из подходов в исследовании распределения ионов Cl^- в растении является электронно-цитохимический метод. С применением этого метода были выявлены следующие закономерности.

1) В корне ионы Cl^- локализуются преимущественно в коре и эпидермисе и, что важно, практически отсутствуют в проводящем пучке центрального цилиндра (рис.3а).

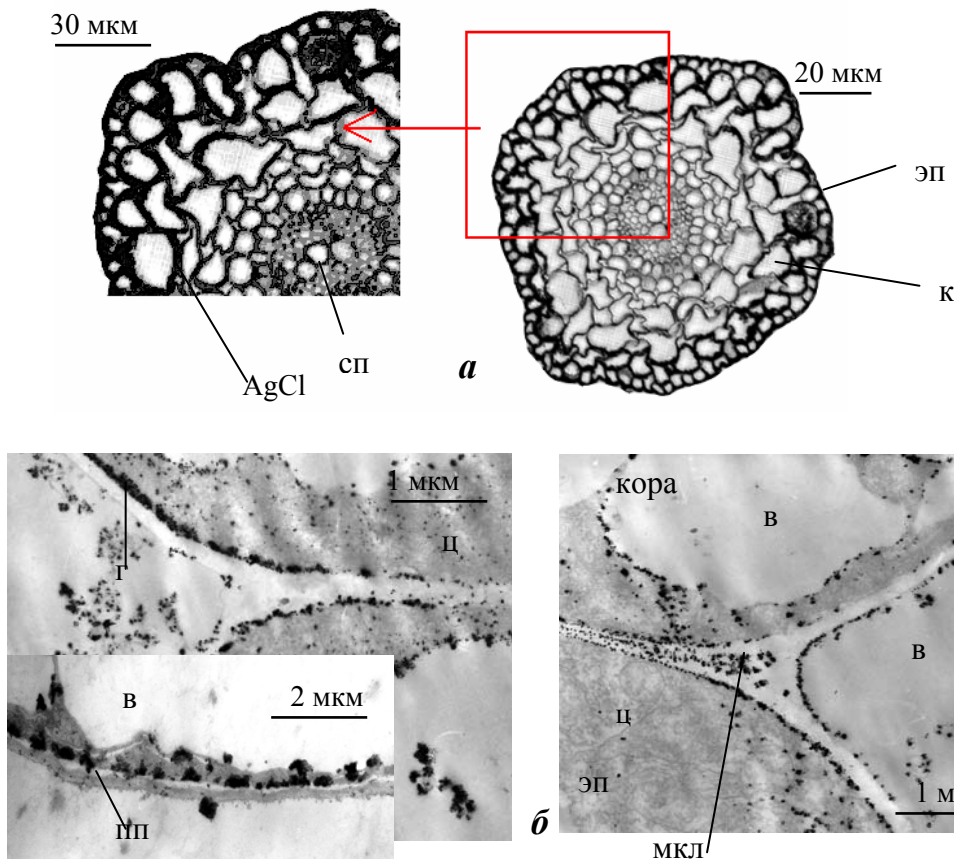


Рис.3. Распределение Cl^- в тканях и клетках корня *S. altissima* (зона растяжения),

(локализация Cl^- выявляется по скоплениям электронно-плотных гранул AgCl).

Растения выращены на среде, содержащей 250 мМ NaCl. а - световая микроскопия, б- электронная; эп - эпидермис, к - кора, мкл - межклетник, ц - цитоплазма, в - вакуоль, пп - периплазматическое пространство, сп - сосудистый пучок, г - гранулы AgCl.

2) Местами локализации Cl^- в коре и эпидермисе корня являются, в основном, клеточная стенка и цитоплазма клеток (рис.3б). Cl^- обнаруживается также в периплазматическом пространстве и межклетниках. Скопления гранул AgCl в цитоплазме, свидетельствующие о высокой концентрации Cl^- , наблюдаются в зонах, прилегающих к плазмалемме и тонопласту.

3) В отличие от корня, в стебле и листьях ионы Cl^- обнаруживаются преимущественно в сосудистых пучках и в значительно меньших количествах в мезофилле и водоносных клетках (рис.4а,б). Темная окраска, наблюдаемая в клетках мезофилла, обусловлена, по-видимому, не только гранулами AgCl , но и наличием оптически плотных хлоропластов (рис.4б).

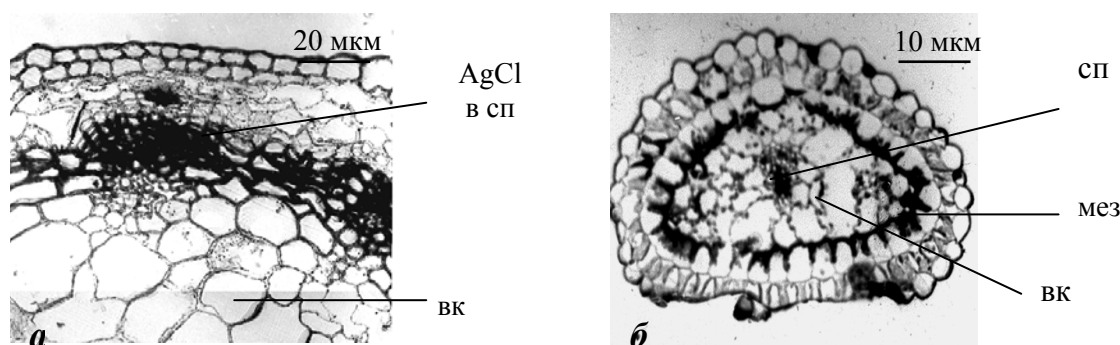


Рис. 4. Распределение Cl^- в тканях стебля (а) и листа (б) *S. altissima*. Видна преимущественная локализация хлорид-ионов в сосудистых пучках. мез – мезофил, сп – сосудистый пучок, вк – водоносная клетка.

Такое же распределение Cl^- в органах и тканях *S. altissima* было нами показано и другим методом, с помощью Cl^- -чувствительной флуоресцентной метки MEQ (Bowers, Verkman, 1991). MEQ флуоресцирует в отсутствие Cl^- в среде, а в присутствии Cl^- флуоресценция MEQ подавляется.

В корнях растений, выращенных на среде с низкой концентрацией NaCl (3 мМ), наблюдалась флуоресценция MEQ в апопласте эпидермиса и коры, а также в центральном цилиндре (рис.5а).

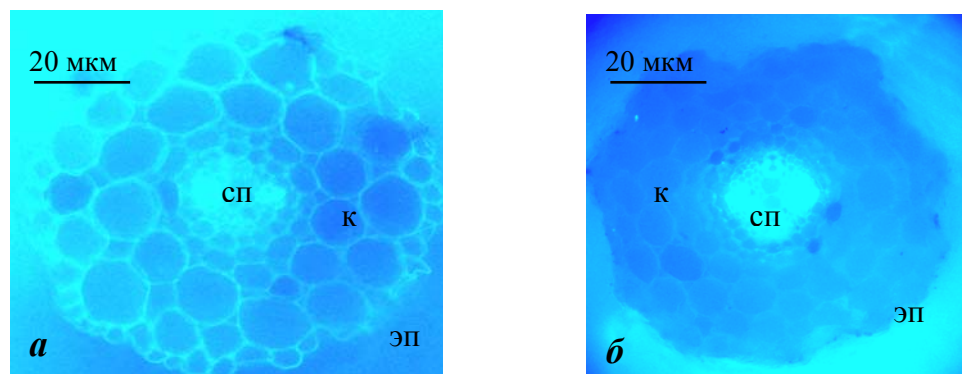


Рис.5. Cl^- -индуцированное тушение флуоресценции MEQ в апопласте коры и эпидермиса корня *S. altissima* (зона растяжения). Для получения поперечных срезов корни заливали 3% агаром и срезы обрабатывали раствором DiH-MEQ. Концентрация NaCl в среде: а – 3 мМ, б – 250 мМ. Обозначения как на рис.3.

В корнях растений, выращенных на среде с 250 мМ NaCl, тушения флуоресценции не наблюдалось в центральном цилиндре (рис.5б), тогда как в апопласте эпидермиса и коры флуоресценция MEQ была подавлена (рис.5б). Эти результаты говорят о том, что при засолении питательного раствора ионы Cl⁻ в корне локализуются преимущественно в апопласте этих тканей.

Отсутствие Cl⁻-индуцированного тушения флуоресценции MEQ в центральном цилиндре было показано также в экспериментах с интактными отсеченными корнями *S.altissima*. На рис. 6 показано, что в ксилеме корней, как контрольных растений (3 мМ NaCl), так и выращенных на питательной среде с 250 мМ NaCl, наблюдалась флуоресценция красителя (рис.6а,б). В солевом варианте тушение флуоресценции MEQ наблюдалось лишь в кончике корня, т.е. в его недифференцированной части (рис.6в,г). Это свидетельствует о том, что ионы Cl⁻ проникают в апопласт всех меристематических клеток и корневого чехлика.

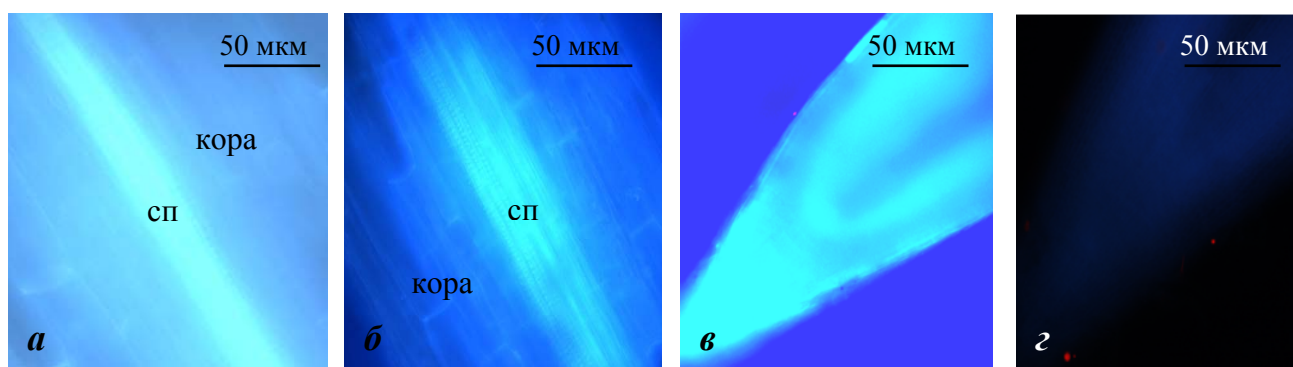


Рис.6. Отсутствие Cl⁻-индуцированного тушения флуоресценции MEQ в сосудах ксилемы корня *S. altissima* в зоне растяжения (а,б) и Cl⁻- индуцированное тушение флуоресценции MEQ в кончике корня (в,г). Сегменты корней погружали в раствор, содержащий MEQ и инкубировали в этом растворе 15 мин при 22⁰С а,в – контроль (3 мМ NaCl), б,г - 250 мМ NaCl; Обозначения как на рис.3.

Таким образом, результаты этих экспериментов свидетельствуют о том, что Cl⁻ в проводящей, т.е. созревшей части корня не достигает ксилемы при транспорте Cl⁻ в радиальном направлении.

Далее встает вопрос, по каким же тканям осуществляется транспорт Cl⁻ в корне в восходящем направлении, если он не достигает ксилемы. Чтобы ответить на него, был поставлен следующий эксперимент. В раствор, содержащий NaCl и MEQ, была погружена нижняя часть корня, а анализу подвергали расположенную выше, не погруженную в раствор часть корня. На рис.7 показано, что Cl⁻-индуцированное тушение флуоресценции и в этом случае происходило в апопласте коры и эпидермиса корня и не наблюдалось в проводящем пучке интактного корня. Это видно как на поперечных срезах (рис.7а,б,в), так и на интактных корнях (рис.7г,д,е).

Полученный результат показывает, что ионы Cl⁻ в корне *S.altissima* движутся в восходящем направлении по клеточным стенкам и межклетникам коры и эпидермиса корня, но не по ксилеме.

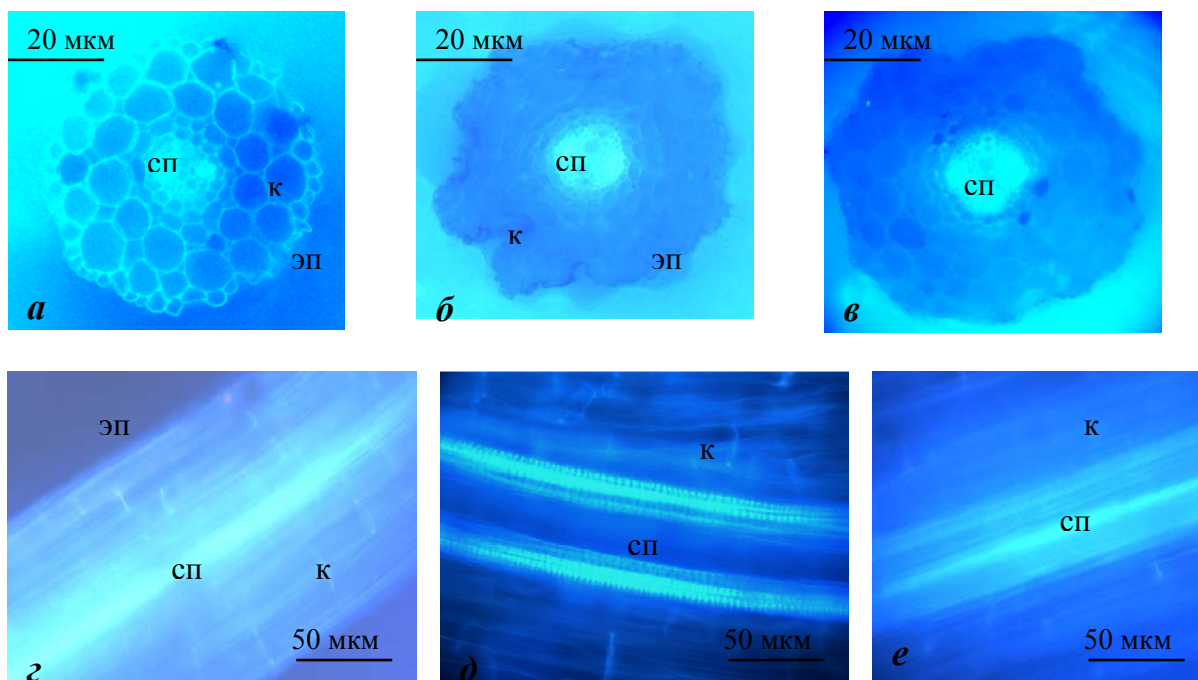


Рис.7. СГ- индуцированное тушение флуоресценции MEQ в апопласте эпидермиса и коры (б,в) и отсутствие СГ- индуцированного тушения флуоресценции MEQ в ксилеме корня *S. altissima* (д,е). а,з – контроль (3 mM NaCl), б,д – нижняя часть корня, погруженная в раствор, содержащий 250 mM NaCl, в,е – верхняя часть корня, не погруженная в 250 mM NaCl. Обозначения как на рис.3.

Исследование с помощью флуоресцентной метки MEQ распределения СГ в стебле также подтвердило результаты, полученные цитохимическим методом. В контрольном варианте флуоресценция MEQ наблюдалась в апопласте практически всех тканей, а в условиях засоления наиболее сильное тушение флуоресценции наблюдалось в проводящих пучках, и в меньшей степени в паренхиме, занимающей центральную часть стебля (не представлено).

Тушение флуоресценции MEQ в проводящих элементах (в многочисленных трахеидах и сосудах ксилемы) наблюдалось также в корневой шейке растений, выращенных на среде с 250 mM NaCl. Это свидетельствует о том, что загрузка ксилемы ионами СГ происходит не в поглощающей зоне корня, а лишь в зоне ответвления боковых корней от главного корня и/или в корневой шейке.

Дальнейший путь ионов СГ по стеблю в листья, по-видимому, проходит по ксилемным элементам. В клетках листа в условиях засоления тушение флуоресценции MEQ наблюдалось в проводящем пучке и апопласте мезофилла.

Таким образом, путь поглощенных корнями ионов СГ в восходящем направлении лежит по апопласту коры и эпидермиса корня, откуда в базальной части корня и в корневой шейке ионы СГ перегружаются в ксилемные элементы. По ксилемным элементам хлорид-ионы достигают мезофилла листа. По-видимому, попадая из ксилемных окончаний в межклетники, ионы СГ распределяются далее по клеткам мезофилла, где и депонируются в вакуолях.

Исследование транспорта ионов в корне *S.altissima* методом сбора пасоки.

Для транспорта в восходящем направлении по ксилеме ионы должны преодолеть эндодермальный барьер. Преодоления такого барьера не требуется в случае транспорта ионов в восходящем направлении по апопласту коры. Множество экспериментов свидетельствует о том, что жизненно важные, содержащие биогенные элементы ионы, такие как NO_3^- , HPO_4^{2-} , H_2PO_4^- , SO_4^{2-} , K^+ и др., транспортируются в коре в радиальном направлении, преодолевая эндодермальный барьер. Часть этих ионов, не вовлеченная в обмен веществ в корне, транспортируется далее в надземные органы по ксилеме (Marschner, 1995; Алехина, 2005). Проведенное нами исследование распределения Cl^- в тканях органов *S.altissima* показывает, что ионы Cl^- практически не преодолевают эндодермальный барьер и транспортируются в восходящем направлении по апопласту коры и эпидермиса корня. Различие в транспортных путях для Cl^- и ионов, содержащих биогенные элементы, предполагает, что зависимости концентраций Cl^- и, возможно, Na^+ в пасоке от концентрации NaCl в среде, с одной стороны, и концентраций NO_3^- и K^+ от концентрации KNO_3 , с другой, подчиняются разным закономерностям.

В настоящем разделе показаны различия в характере указанных зависимостей.

Зависимости концентраций Cl^- и Na^+ в пасоке от концентрации NaCl в питательной среде. Эксперименты проводили на растениях, выращенных на стандартной питательной среде, содержащей NaCl в разных концентрациях. При увеличении концентрации NaCl в питательной среде концентрация Cl^- в пасоке возрастала практически линейно во всем диапазоне наружных концентраций соли (рис.8а).

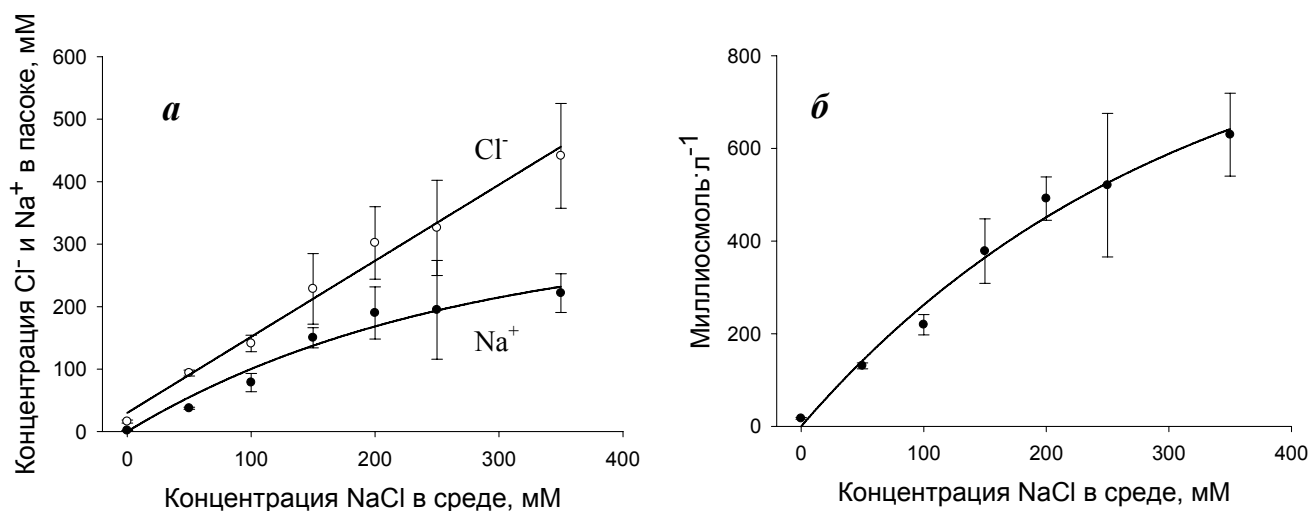


Рис.8. а - зависимости концентраций Cl^- и Na^+ в пасоке *S.altissima* от концентрации NaCl в среде культивирования; **б** - осмоляльность, создаваемая ионами Cl^- и Na^+ в пасоке. Среда – питательный раствор, содержащий NaCl в концентрациях, указанных на осях абсцисс.

Концентрация Na^+ в пасоке также возрастала с увеличением засоления, обнаруживая тенденцию к насыщению при высоких концентрациях соли (рис.8а). На рис.

8б. представлена зависимость суммарной концентрации Cl^- и Na^+ (осмолярности) в пасоке от концентрации NaCl в среде.

Из этого графика следует, что Cl^- и Na^+ создают в пасоке осмотическое давление, близкое к осмотическому давлению, создаваемому NaCl в среде, поскольку, согласно уравнению Бойля - Вант-Гофа, осмотическое давление пропорционально сумме концентрации растворенных веществ. Принимая во внимание то, что пасока содержит и другие вещества, в том числе и органические, можно сделать вывод, что осмотическое давление пасоки больше осмотического давления среды, что создает условия для транспорта воды в корне в восходящем направлении даже в отсутствие надземных органов.

Зависимости концентраций K^+ и NO_3^- в пасоке от концентраций KNO_3 в питательном растворе. Эксперименты проводили на растениях, выращенных на стандартной питательной среде, содержащей 100 мМ NaCl . Выращенные растения переносили на среды, идентичные средам выращивания, но в которых 1 мМ KH_2PO_4 и 4 мМ $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ были заменены 1 мМ NaH_2PO_4 и 4 мМ CaCl_2 , соответственно. Одновременно к средам добавляли KNO_3 в разных концентрациях. Через 7 суток удаляли надземные органы и собирали пасоку.

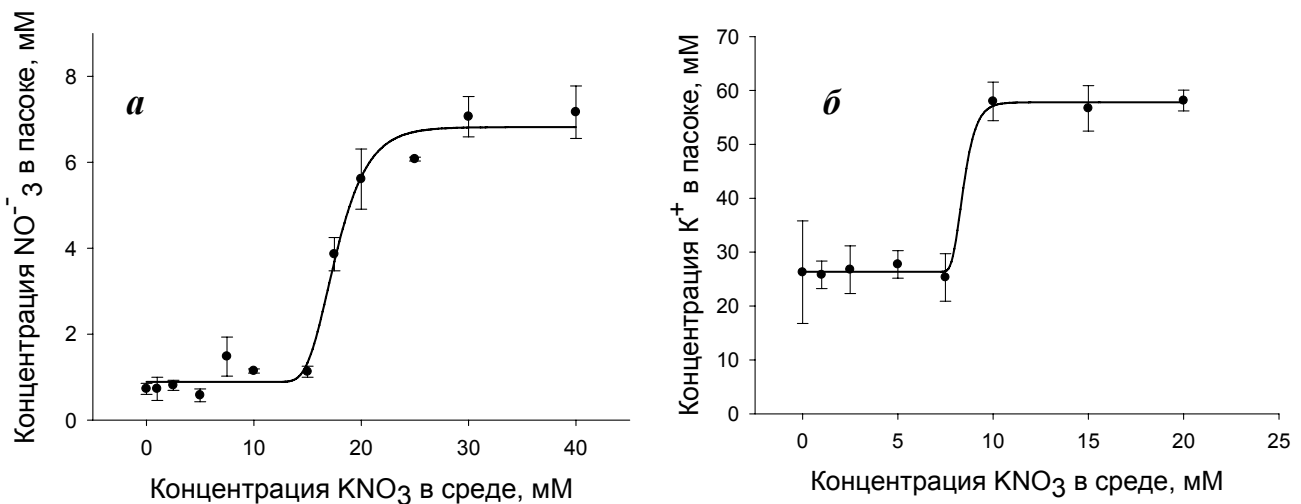


Рис.9. Зависимости концентрации ионов NO_3^- (а) и K^+ (б) в пасоке *S. altissima* от концентрации KNO_3 в среде культивирования. Среда – питательный раствор, содержащий KNO_3 в концентрациях, указанных на осях абсцисс.

Концентрация NO_3^- в пасоке при наружных концентрациях KNO_3 в среде в диапазоне от 0 до 15 мМ поддерживалась на постоянном уровне и составляла около 1 мМ (рис.9а). В диапазоне концентрации KNO_3 в среде 15-20 мМ происходило резкое увеличение концентрации ионов NO_3^- в пасоке и при дальнейшем увеличении концентрации KNO_3 в среде концентрация NO_3^- в пасоке поддерживалась на постоянном уровне (6,5-7,0 мМ). Аналогичная картина наблюдалась и для ионов K^+ . При низких наружных концентрациях соли (от 0 до 7,5 мМ), концентрация K^+ в пасоке

поддерживалась на постоянном уровне около 25 мМ (рис.9б). При увеличении наружной концентрации KNO_3 до 10 мМ происходило резкое возрастание концентрации K^+ в пасоке, достигая приблизительно 60 мМ. При дальнейшем увеличении концентрации KNO_3 в среде (до 20 мМ) концентрация K^+ в пасоке не изменялась и поддерживалась на этом уровне.

Таким образом, получены разные зависимости для концентраций ионов в пасоке от концентраций соли в среде. Концентрации Cl^- и Na^+ монотонно возрастали по мере увеличения наружной концентрации NaCl . Для концентраций NO_3^- и K^+ было характерно наличие двух уровней с резким переходом между ними в некотором узком диапазоне наружных концентраций KNO_3 . Эти различия свидетельствуют в пользу того, что пути транспорта Cl^- и Na^+ , с одной стороны, и NO_3^- и K^+ , с другой, в корне *S. altissima* различаются

Результаты этих экспериментов согласуются с данными, полученными в исследовании распределения ионов Cl^- цитохимическим методом с использованием Ag^+ и с помощью флуоресцентной метки на ионы Cl^- - MEQ, где было показано, что Cl^- в корне движется в восходящем направлении по апопласту коры. Это подразумевает, что дальний транспорт Cl^- , а возможно и Na^+ , не контролируется клетками эндодермы и паренхимными клетками центрального цилиндра корня.

Полученные различия указывают также на более жесткий контроль концентраций NO_3^- и K^+ в пасоке, чем концентраций Cl^- и Na^+ , что согласно с идеей о транспорте первых двух ионов в радиальном направлении через эндодерму и на вовлечение паренхимных клеток центрального цилиндра корня в загрузку их в ксилему.

Остается неясным наличие двух концентрационных уровней для NO_3^- и K^+ и резкого перехода между ними (рис.9а,б). Возможно, при разных концентрациях KNO_3 в среде загрузка ксилемы ионами NO_3^- и K^+ осуществляется разными транспортными белками.

Стимуляция формирования пиноцитозных структур хлористым натрием.

Электронно-микроскопическое исследование выявило в клетках эпидермиса и коры корня *S. altissima* пиноцитозные структуры нескольких типов.

Тип 1. В клетках корней растений, выращивавшихся при высоких концентрациях NaCl в среде (250 мМ и 500 мМ), часто встречались структуры, так называемые пиноцитозные инвагинации (ПИ), окруженные двумя мембранами и имеющие округлую или овальную форму (рис.10). Подобные структуры были описаны ранее для клеток мезофилла и водозапасающей ткани листьев *S. altissima* (Куркова, Балнокин, 1992; 1994). Анализ электронно-микроскопических снимков позволяет предположить следующую схему образования ПИ. Цитоплазма под давлением пиноцитозного пузырька раздвигается в стороны. Ограничивающие цитоплазму мембраны, плазмалемма и тонопласт, в этом месте сближаются и впячиваются в центральную вакуоль (рис.10а,б). Далее ПИ отделяются от плазмалеммы и тонопласта, образуя замкнутые структуры внутри центральной вакуоли (рис.10в). Наружная мембрана таких структур является

производной тонопласта, а внутренняя – плазмалеммы. В процессе «роста» ПИ по краям раздвинувшейся цитоплазмы происходит отшнуровывание везикул плазмалеммы, заполненных цитоплазматическим материалом (рис.10а,б). После отделения ПИ от плазмалеммы и тонопласта эти везикулы оказываются внутри образовавшегося мультивезикулярного тела (МВТ) (рис.10в). В формировании пиноцитозных структур помимо плазмалеммы и тонопласта могут принимать участие, по-видимому, разные эндосомальные мембраны. Иногда они располагаются слоями (рис.10д), в некоторых случаях принимают вид концентрических окружностей, образуя ламеллярно-везикулярное тело (ЛВТ) (рис.10г). В ряде случаев внутри ПИ и МВТ видны лишь плоские фрагменты мембран, по-видимому, продукты деградации ламелл и везикул. Плазмалемма и тонопласт, ограничивающие МВТ и ЛВТ, вероятно, также подвергаются лизису, о чем говорит наличие мембранных фрагментов внутри центральных вакуолей (рис.10е).

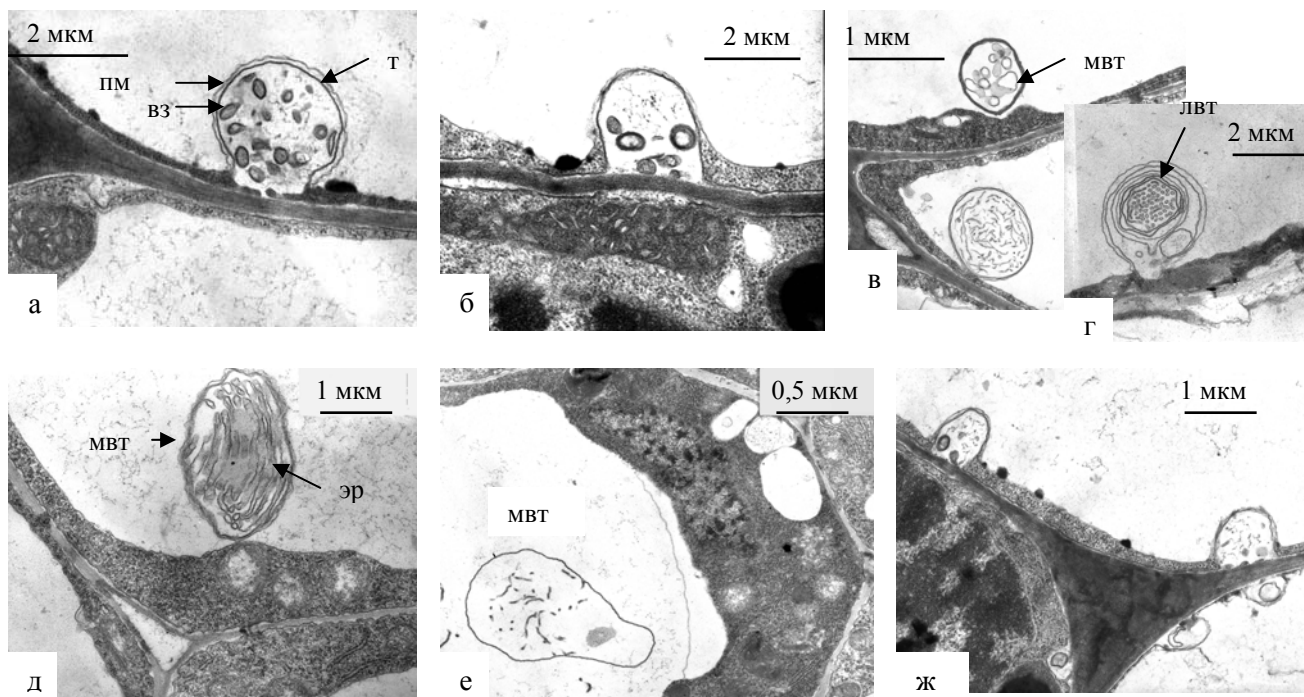


Рис.10. Пиноцитозные инвагинации в клетках корней *S.altissima* при выращивании растений в стационарных условиях. а-е – при 250 мМ NaCl в питательной среде, ж – при 50 мМ NaCl. а,б – ПИ, окруженные двумя мембранами – производными плазмалеммы (пм) и тонопласта (т) и имеющие связь с апопластом; внутри ПИ видны везикулы (вз), образованные отшнуровыванием ПМ; а – сформировавшаяся ПИ, б – начальная стадия ее формирования; в – мультивезикулярное тело (мвт), образовавшееся путем отшнуровывания ПИ от плазмалеммы и тонопласта; г – ПИ, заполненная ламеллярно-везикулярным материалом (лвт); д – МВТ, заполненное мембранами эндосомального происхождения; е – МВТ, лизирующееся в вакуоли; ж – ПИ, не превращающееся в МВТ и остающееся в контакте с апопластом.

В клетках эпидермиса и коры корня *S.altissima*, выращенной при относительно низких концентрациях NaCl в среде (3 и 50 мМ) также формировались пиноцитозные инвагинации, образуемые двумя мембранами – плазмалеммой и тонопластом (рис. 10ж). Однако ПИ, по-видимому, не превращались далее в МВТ или ЛВТ. Об этом

свидетельствует тот факт, что при низких концентрациях NaCl в среде МВТ и ПИ в клетках не обнаруживались. Таким образом, у растений, растущих при низких концентрациях NaCl в среде, процесс формирования МВТ останавливается на стадии пиноцитозных инвагинаций.

Тип 2. Структуры этого типа формировались в клетках эпидермиса и коры корня *S.altissima* чаще всего в условиях гиперосмотического солевого шока, когда концентрацию соли в среде резко увеличивали от 50 до 250 мМ.

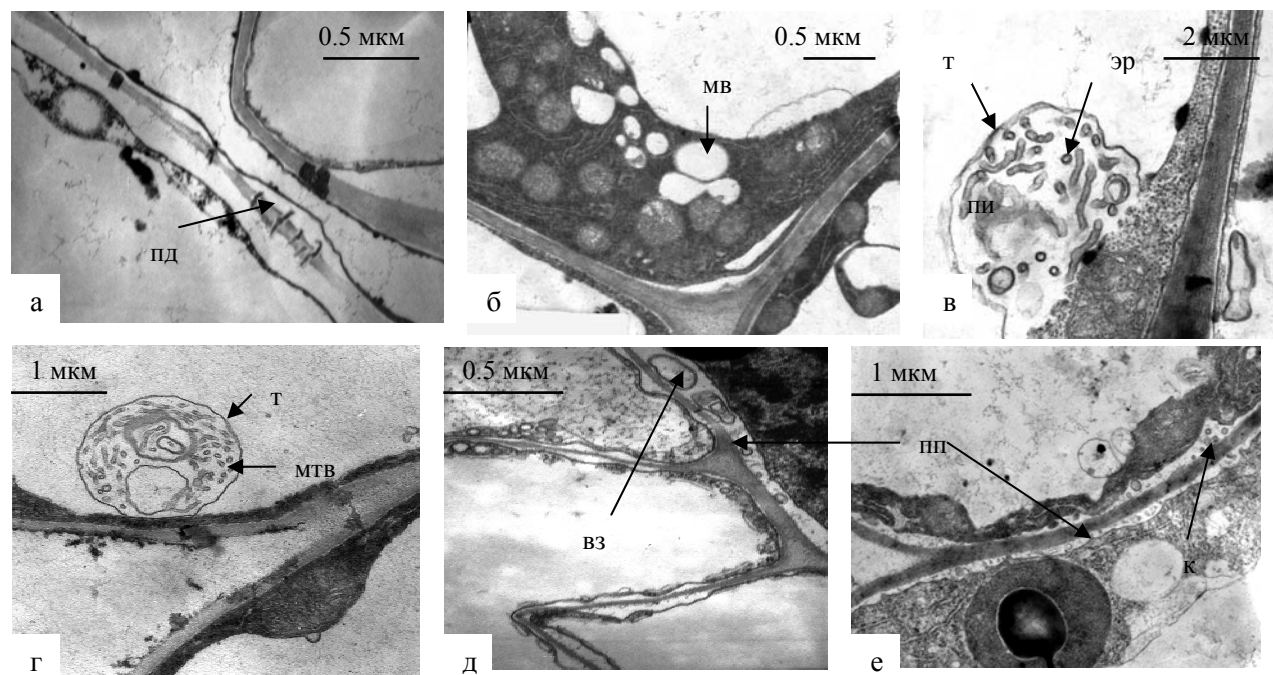


Рис.11. Ультраструктура клеток корней *S. altissima* и пиноцитоз при гиперосмотическом солевом шоке. а – плазмолиз и отрыв плазмодесм (пд); б – плазмолиз и образование микровакуолей (мв) в цитоплазме; в – ПИ, заполненная мембранами эндосомального происхождения и окруженная одной мембраной – тонопластом; г – МВТ в вакуоли, ограниченное тонопластом и содержащее эндосомальные мембраны; д, е – везикулы в периплазматическом пространстве (пп), образованные отщуриванием ПМ. Плазмалемма в местах скопления везикул образует складки и карманы (к).

Последнее приводило к таким изменениям ультраструктуры, которые типичны для плазмолизованных клеток. В частности, наблюдалось отделение цитоплазмы от клеточных стенок, происходил разрыв плазмодесм (рис.11а) и образование микровакуолей в цитоплазме (рис.11б). Отметим, что в клетках корней растений, не испытывавших действия шока, микровакуоли в цитоплазме встречались редко. Характерные для плазмолизованных клеток структуры типа 2 представляли собой инвагинации тонопласта в сторону вакуоли, заполненные мембранным материалом. Последний был представлен везикулами и мембранами, по-видимому, производными разных органелл (рис.11в).

Как и в случае структур типа 1, структуры типа 2 отщуривались от тонопласта и формировали свободно «плавающие» в вакуолях МВТ или ЛВТ (рис.11г). В отличие от структур типа 1 они были ограничены лишь одной мембраной, происходящей из тонопласта.

Тип 3. Структуры этого типа, как и структуры типа 2, образовывались в клетках эпидермиса и коры корня *S. altissima* в ответ на гиперосмотический солевой шок. Это – везикулы, которые плазмалемма отшнуровывала в периплазматическое пространство (ПП) (рис.11д,е). Плазмалемма, прилегающая к местам скопления таких везикул, была неровной, образовывала складки и карманы (рис.11е). Структуры типа 3 ограничены одной мембраной, но этой мембраной, в отличие от структур типа 2, является не тонопласт, а плазмалемма.

Формирование ПИ и МВТ типа 1, по-видимому, создает условия для транспорта веществ по трем направлениям: (а) из апопласта в центральную вакуоль, (б) из цитоплазмы в вакуоль и (в) из цитоплазмы в апопласт. Поскольку внутренняя полость ПИ связана с ПП, то вещества из апопласта проникают в эту полость и оказываются внутри МВТ, а затем и вакуоли. Отшнуровывание заполненных цитоплазматическим материалом везикул плазмалеммы внутрь ПИ может обеспечить перенос веществ из цитоплазматического компартмента как в центральную вакуоль, так и в апопласт. Структуры типа 1, таким образом, можно считать как эндоцитозными, так и экзоцитозными образованиями в зависимости от того, какое направление везикулярного транспорта преобладает - из апопласта в вакуоль или из цитоплазмы в ПП. Везикулярный перенос веществ из цитоплазмы в вакуоль также, по-видимому, свойственный структурам типа 1, вероятно, следует рассматривать как внутриклеточный транспорт. К этому же типу транспорта можно отнести и везикулярный перенос веществ, осуществляемый пиноцитозными структурами типа 2. Пиноцитозные структуры типа 3, локализованные в ПП и образуемые плазмалеммой, являются экзоцитозными образованиями (Battey *et al.*, 1999).

Стимуляция образования эндоцитозных структур хлористым натрием в клетках корней была подтверждена с помощью флуоресцентного зонда на эндоцитоз FM 4-64. Растворившийся исходно в липидном бислое плазмалеммы зонд интернализовался клеткой. NaCl значительно ускорял этот процесс.

На рис. 12, показано поглощение FM 4-64 клетками корня в бессолевом (а) и солевом (б) вариантах эксперимента, соответственно. В солевом варианте зонд поглощался более интенсивно, чем в бессолевом.

Чтобы выяснить, стимулируется ли процесс эндоцитоза специфически ионами Na^+ или Cl^- или его индукция связана с гиперосмотическим шоком, независимо от того, какой агент его вызывает, мы исследовали действие нескольких солей и нейтрального осмотика маннита на процесс включения FM 4-64 в клетки. Все выбранные соли (50 мМ NaCl, 50 мМ KCl, 50 мМ NaNO_3), а также маннит (100 мМ), стимулировали включение зонда в клетки, при этом маннит оказывал наиболее сильное действие.

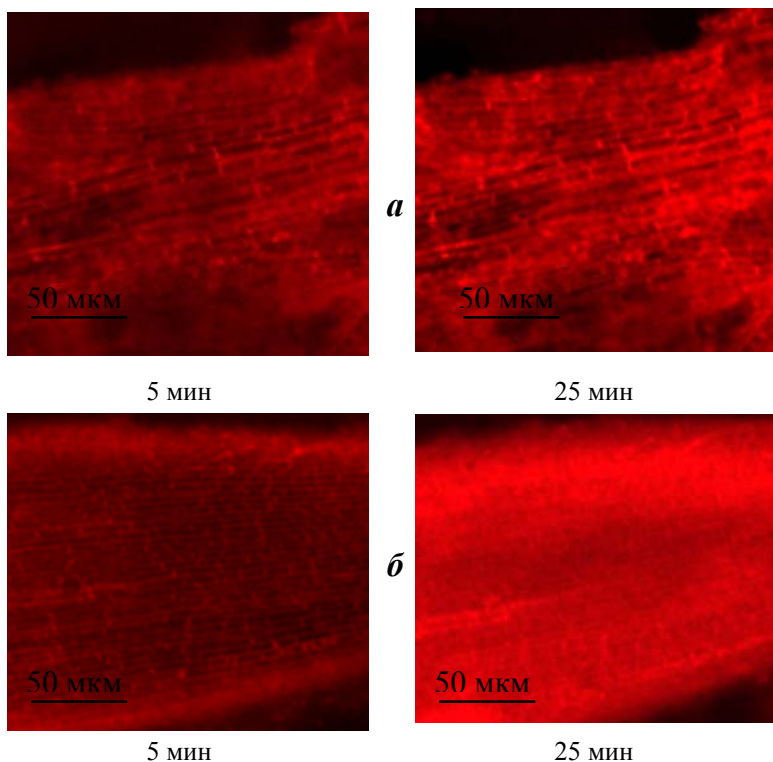


Рис.12. Флуоресценция эндоцитозного зонда FM 4-64 в клетках корня *S. altissima*, выращенной в питательном растворе с 3 мМ NaCl (зона растяжения). Отделенный корень инкубировали на протяжении 25 мин в растворе зонда, содержащем 3 мМ NaCl (а) и 50 мМ NaCl (б).

Полученный результат показывает, что в клетках корней *S. altissima* эндоцитоз индуцируется повышением осмотического давления в среде, а не действием какого-то специфического иона.

Возможное участие пиноцитоза в переносе Cl⁻ между цитоплазмой, апопластом и вакуолью. В литературных источниках нам не удалось обнаружить прямых доказательств участия везикул и пиноцитозных структур у растений в транспорте ионов. Вместе с тем, результаты исследования кинетики транспорта Cl⁻, Na⁺ и K⁺ через плазмалемму харовых водорослей могли быть объяснены только на основании модели, в которой в перенос ионов был вовлечен везикулярный транспорт (MacRobbie, 1999). Для выявления возможности участия пиноцитоза в транспорте Cl⁻ у *S. altissima*, мы исследовали локализацию Cl⁻ в пиноцитозных структурах методом электронной цитохимии.

В цитоплазме клеток корней наибольшая плотность гранул AgCl выявлялась в зонах, прилегающих к плазмалемме и тонопласту (рис.13). В последнем случае гранулы часто располагались в цитоплазме в виде больших скоплений, вдающихся в вакуоль. Электронно-цитохимический метод обнаружения ионов Cl⁻ в клетках не позволяет выявлять одновременно структуру мембран и цитоплазмы, поскольку обработка растительного материала азотнокислым серебром не совместима с фиксацией тканей глутаровым альдегидом, который требуется для тонкой проработки структуры.

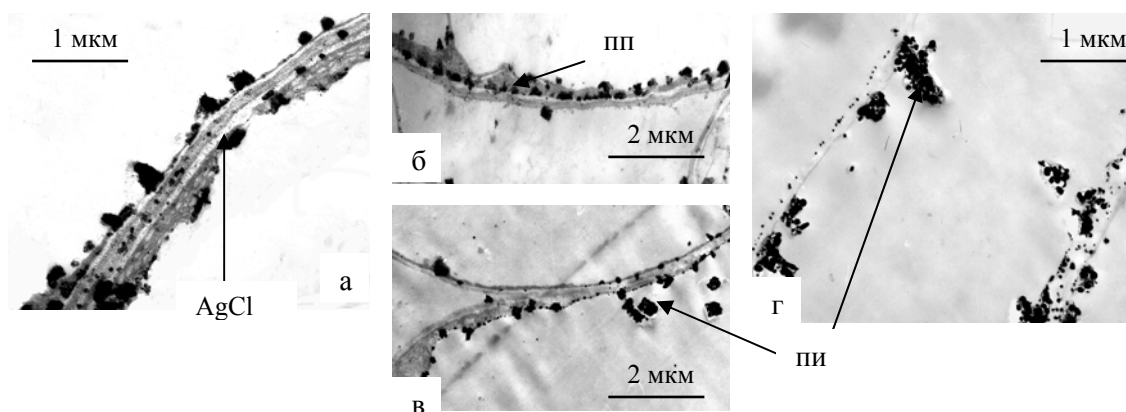


Рис.13. Цитохимическая реакция на СГ в клетках корня *S. altissima*. пп – периплазматическое пространство, пи – пиноцитозные инвагинации. *a* – скопления гранул AgCl в клетках растений, выращенных в стационарных условиях (250 мМ NaCl). Как предполагается, гранулы локализованы в ПИ, окруженных двумя мембранами и выходящих из апопласта в вакуоль; *б* – скопления гранул AgCl главным образом между клеточной стенкой и цитоплазмой (в периплазматическом пространстве) в клетках корней растений при солевом шоке; *в,г* – гранулы AgCl в клетках корней в условиях солевого шока; отчетливо видны скопления гранул на границе цитоплазма/вакуоль, различимы фрагменты тонопласта, ограничивающего гранулы.

Тем не менее, на основании сравнения микрофотографий, полученных после фиксации тканей в присутствии азотнокислого серебра (для выявления ионов СГ) и после обычной фиксации глутаровым альдегидом и OsO_4 , с высокой долей вероятности мы можем предположить, что наблюдаемые на границе цитоплазма/вакуоль, цитоплазма/апопласт скопления гранул AgCl находятся внутри пиноцитозных инвагинаций.

Скопления гранул AgCl в зонах формирования пиноцитозных структур свидетельствует в пользу участия последних в везикулярном транспорте СГ . Транспорт СГ , а также и Na^+ , посредством пиноцитозных структур может вносить вклад в поддержание низких концентраций этих ионов в цитоплазме в условиях засоления. С помощью пиноцитозных структур типа 1 ионы могут транспортироваться из апопласта в вакуоль «в обход» цитоплазматического компартмента. С помощью структур типа 1 и 2 может осуществляться экспорт ионов из цитоплазмы в вакуоль, а с помощью структур типа 3 - в апопласт или в вакуоль. Роль пиноцитозных структур в транспорте ионов в условиях гиперосмотического солевого шока, по-видимому, особенно велика, поскольку именно это воздействие на клетки стимулирует их образование.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

S. altissima относится к группе соленакапливающих галофитов (Балнокин с соавт., 2004), аккумулирующих СГ и Na^+ в вакуолях клеток листьев до высоких концентраций. Как показали результаты проведенных экспериментов, движение СГ в корне в восходящем направлении осуществляется по апопласту коры и эпидермиса, но не по ксилеме. Эндодерма является барьером для движения ионов СГ и, возможно, Na^+ к

ксилеме. В местах ответвления боковых корней от короткого стержневого корня и/или в зоне корневой шейки, т.е. там, где отсутствует эндодерма, происходит загрузка ксилемных элементов ионами Cl^- , которые поступают из апопласта коры. В отличие от Cl^- и Na^+ , не входящих в число биогенных элементов, ионы NO_3^- и K^+ , необходимые для роста растений, в соответствии с общепринятой моделью (Marshner, 1995; Алехина, 2005), транспортируются через эндодерму к паренхимным клеткам центрального цилиндра и далее в ксилему. Последующий транспорт NO_3^- и K^+ в восходящем направлении в побеги осуществляется по ксилеме. Таким образом, в корне, по-видимому, происходит разделение потоков Cl^- и Na^+ , с одной стороны, и NO_3^- и K^+ с другой (рис.14А).

В связи с этими результатами следует упомянуть данные Пенг с соавторами (Peng *et al.*, 2004), полученные на галофильном злаке *Puccinellia tenuiflora*. Электрофизиологическими методами, рентгеновским микроанализом и применением Cs^+ и тетраэтиламмония – ингибиторов K^+ -каналов было показано, что у этого растения Na^+ , в отличие от K^+ , не проходит эндодермальным барьер. Преимущественное поглощение K^+ было обусловлено высокой селективностью калиевых каналов и механическим барьером для Na^+ , создаваемым поясками Каспари.

Каковы движущие силы транспорта Cl^- и Na^+ в восходящем направлении из корня в надземные органы? В интактном растении ионы Cl^- и Na^+ движутся в восходящем направлении по апопласту (в корне – по апопласту коры, в стебле – по ксилемным элементам) с массовым током воды, осуществляемым по градиенту водного потенциала. В условиях слабой транспирации, когда устьица закрыты, градиент водного потенциала должен создаваться градиентным распределением веществ в клетках корня и надземных органов. В соответствии с этим, в работе показано, что суммарное содержание Cl^- и Na^+ , рассчитанное на единицу сырой массы органа, выше в листьях, чем в корнях (рис.1Г). Такой же вопрос о движущих силах транспорта воды и растворенных в ней веществ встает в случае образования пасоки корневой системой, отделенной от надземных органов. Образование пасоки предполагает наличие градиента водного потенциала между наружной средой и апопластом корня. У *S.altissima* такой градиент водного потенциала создается, в основном, благодаря высокому содержанию ионов Cl^- и Na^+ в апопласте коры и эпидермиса.

Возвращаясь к транспорту ионов, следует отметить, что Cl^- и Na^+ локализованы в апопласте коры корня между двумя барьерами, образованными экзодермой и эндодермой, имеющими несуберинизированные пропускные клетки. Имеющиеся в литературе данные свидетельствуют о стимуляции суберинизации эндодермы и экзодермы при засолении у других растений (Enstone and Peterson, 1997; Karahara *et al.*, 2004). Такого рода анатомия отображена на схеме (рис. 14Б). Встает вопрос, каков физиологический смысл наличия эндодермального барьера для Cl^- и Na^+ и ограничения потоков этих ионов в центральный цилиндр корня. Возможно, эндодерма предотвращает токсическое действие Cl^- и Na^+ на клетки центрального цилиндра, играющие важную роль в метаболизме корня. Возможно также, что преодоление эндодермального барьера ионами Cl^- и Na^+ существенным

образом уменьшало бы потоки этих ионов в надземные органы, не позволяя им накапливаться там до высокого уровня.

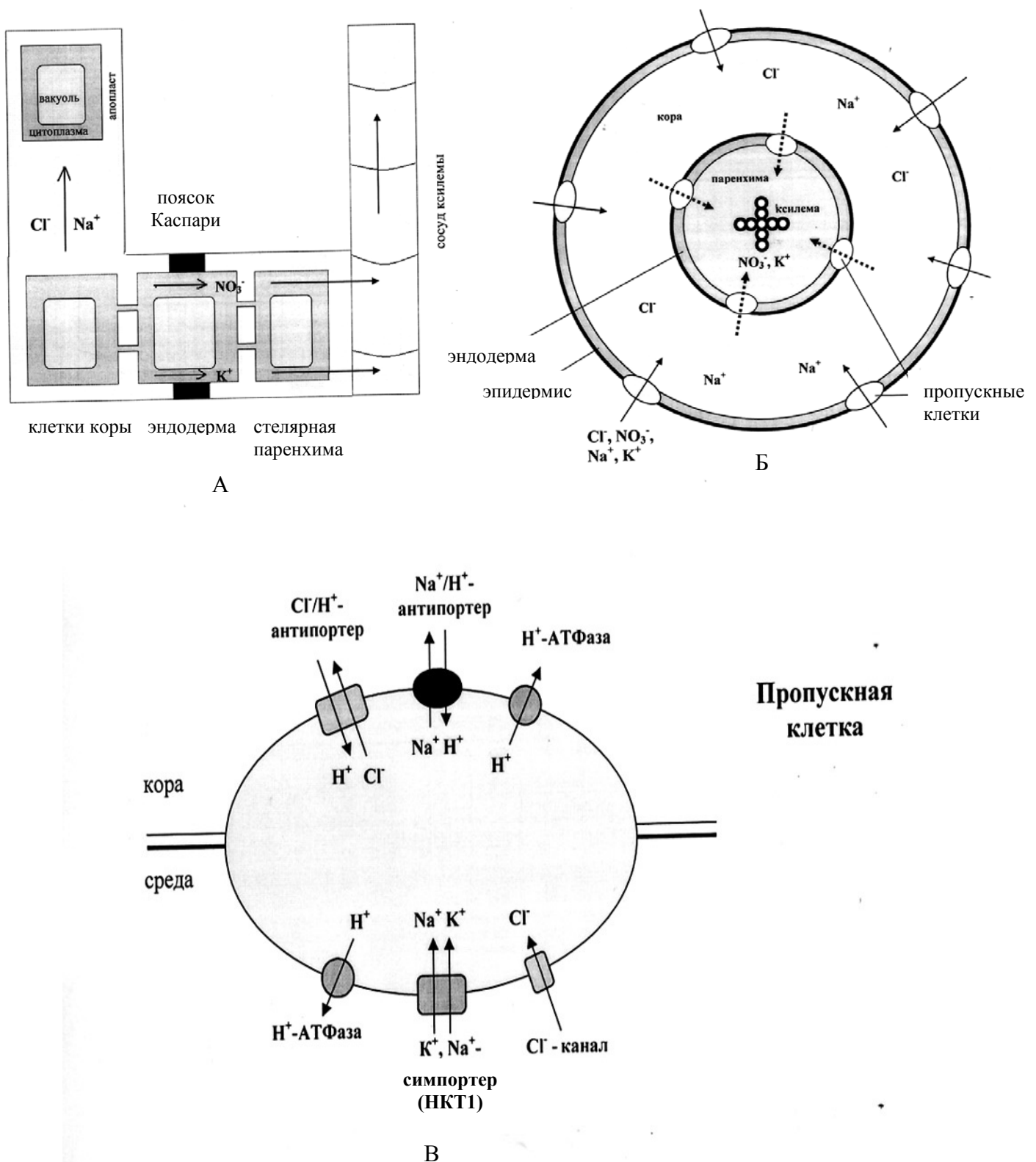


Рис.14. Гипотетическая схема, описывающая направления транспорта Cl^- , Na^+ , NO_3^- и K^+ в корне соленаккапливающего галофита *Suaeda altissima*. А – пути транспорта ионов в корне в восходящем направлении. Б - радиальный транспорт ионов в зоне поглощения. В – предполагаемые транспортные системы, вовлеченные в перенос ионов через пропускные клетки эпидермиса корня.

Каков механизм транспорта Cl^- и Na^+ из наружной среды в апопласт коры корня, осуществляемого, по-видимому, через пропускные клетки? Гипотеза, отображающая вероятный механизм, представлена на рис. 14В. Она основана на имеющихся в литературе сведениях об ионных транспортерах и каналах (Dietrich and Hedrich, 1994, 1998; Zhang *et al.*, 2001; White, 2001; Katz *et al.*, 1994; Shi *et al.*, 2002; Tester, 2003). Вход Na^+ в пропускные клетки осуществляется вместе с K^+ через Na^+ , K^+ -симпортер (НКТ1), энергизируемый H^+ -АТФазой (Schachtman, Liu, 1999; Rodriguez-Navaro, Rubio, 2006). Деполяризация плазмалеммы, происходящая в результате входа этих двух ионов в цитоплазму, обеспечивает поддержание градиента электрохимического потенциала Cl^- , направленного внутрь. В результате ионы Cl^- из наружной среды через потенциалзависимые анионные каналы поступают в клетки.

Выход Na^+ по другую сторону пропускной клетки, в апопласт коры, осуществляется с помощью Na^+/H^+ -антипортера (SOS1). Ионы Cl^- , возможно, транспортируются в апопласт посредством Cl^-/H^+ -антипортера. Данные о функционировании такого транспортера в ПМ и тонопласте были получены на харовой водоросли *Chara corollina* (Reid *et al.*, 1984) и в корнях свеклы и томатов (Pantoja *et al.*, 1989). Функционирование Na^+/H^+ - и Cl^-/H^+ -антипортеров поддерживается работой H^+ -АТФазы.

Исследование ультраструктуры клеток корней галофита *S. altissima* и распределения в них Cl^- продемонстрировало наличие в клетках Cl^- -содержащих пиноцитозных образований трех типов. Формирование ПИ и МВТ этих типов создает условия для транспорта веществ по трем направлениям: (а) из апопласта в центральную вакуоль, (б) из цитоплазмы в вакуоль и (в) из цитоплазмы в апопласт. Внутренняя полость ПИ типа 1 связана с периплазматическим пространством, следовательно, вещества из апопласта проникают в эту полость и оказываются внутри МВТ, а затем и вакуоли. Отшнуровывание заполненных цитоплазматическим материалом везикул плазмалеммы внутрь ПИ может обеспечить перенос веществ из цитоплазматического компартмента как в центральную вакуоль, так и в апопласт. Пиноцитозные структуры типа 2 осуществляют перенос веществ из цитоплазмы в вакуоль, а пиноцитозные структуры типа 3 – из цитоплазмы в апопласт. Транспорт ионов посредством пиноцитозных структур, по-видимому, вносит вклад в поддержание низких концентраций Cl^- и Na^+ в цитоплазме в условиях засоления. Предполагается, что с помощью структур типа 1 ионы переносятся из апопласта в вакуоль «в обход» цитоплазматического компартмента и там депонируются. С помощью структур всех описанных типов может осуществляться ионная разгрузка цитоплазмы, куда ионы поступают по градиенту электрохимического потенциала. Не исключено, что предполагаемый транспорт ионов Na^+ и Cl^- с помощью пиноцитозных структур вносит вклад в регуляцию ионных потоков на уровне целого растения.

Баланс ионных потоков по направлениям апопласт/вакуоль, цитоплазма/вакуоль, а также цитоплазма/апопласт, по-видимому, вносит вклад в регуляцию ионных потоков в целом растении. В частности, находящиеся в цитоплазме ионы Na^+ и Cl^- попадают в

центральную вакуоль или апопласт, в зависимости от того, идет процесс формирования МВТ до конца или останавливается на стадии образования ПИ, что, в свою очередь, зависит от концентрации NaCl в прикорневой зоне. Этим может регулироваться доставка ионов из корней в побеги.

ВЫВОДЫ

- 1) В проводящей зоне корня ионы Cl⁻ локализуются преимущественно в апопласте эпидермиса и коры. В этой зоне корня эндодерма является анатомическим барьером для проникновения Cl⁻ в клетки стелярной паренхимы и сосуды ксилемы. Эндодерма корня осуществляет избирательный транспорт ионов, содержащих биогенные элементы.
- 2) Движение ионов Cl⁻ и, возможно, Na⁺, в восходящем направлении в корне осуществляется по апопласту коры и эпидермиса.
- 3) Загрузка ксилемных элементов ионами Cl⁻ происходит в местах ответвления боковых корней от короткого стержневого корня и/или в зоне корневой шейки, куда ионы Cl⁻ поступают по апопласту коры.
- 4) Осмотический шок, создаваемый хлористым натрием и другими осмотиками, индуцирует формирование пиноцитозных структур в клетках эпидермиса и коры корня.
- 5) Пиноцитозные структуры участвуют в транспорте Cl⁻ и, вероятно, Na⁺ между апопластом, цитоплазмой и вакуолью в клетках эпидермиса и коры корня, что может вносить вклад в регуляцию потоков этих ионов в системе целого растения.

Список работ, опубликованных по теме диссертации.

1. Балнокин Ю.В., Куркова Е.Б., Мясоедов Н.А., Хайлова Г.Ф., Луньков Р.В., Халилова Л.А., Андреев И.М., Котов А.А., Котова Л.М. Организация водного обмена у галофитов: связь с дальним транспортом Na⁺ и Cl⁻. IV Международная конференция «Регуляция роста, развития и продуктивности растений». Минск, 2005, С.25.
2. Куркова Е.Б., Халилова Л.А., Мясоедов Н.А., Хайлова Г.Ф., Балнокин Ю.В. Возможные пути дальнего транспорта хлора у соленакапливающего галофита *Suaeda altissima*. Международная конференция «Физиологические и молекулярно-генетические аспекты сохранения биоразнообразия». Вологда, 2005, С.100.
3. Халилова Л.А., Куркова Е.Б., Балнокин Ю.В., Мясоедов Н.А., Юсуфов А.Г. Пиноцитоз в клетках галофита *Suaeda altissima* и его участие в транспорте хлора. Международная научная конференция «Современные проблемы адаптации и биоразнообразия». Махачкала, 2006, С.94.
4. Халилова Л.А., Куркова Е.Б., Мясоедов Н.А., Балнокин Ю.В. Некоторые структурные аспекты транспорта ионов хлора в корне соленакапливающего галофита *Suaeda altissima*.

Тезисы докладов XIII Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2006», 2006, С.238

5. Халилова Л.А. Анатомические и ультраструктурные особенности тканей и клеток листьев и корней галофита *Suaeda altissima*. Материалы I (XI) Международной конференции молодых ботаников в С-Петербурге. С.-Петербург, 2006, С.212.

6. Куркова Е.Б., Халилова Л.А., Жамалетдинов Н.К., Мясоедов Н.А., Бабаков А.В., Балнокин Ю.В. Ультраструктура клеток двух галофитов различающихся по стратегии выживания в условиях высокой солености среды (*Suaeda altissima* и *Thellungiella salsuginea*). VI съезд общества физиологов растений России и Международная конференция «Современная физиология растений: от молекул до экосистем». Сыктывкар, 2007, С.227.

7. Балнокин Ю.В., Куркова Е.Б., Халилова Л.А., Мясоедов Н.А., Юсуфов А.Г. Пиноцитоз в клетках соленакапливающего галофита *Suaeda altissima* и его возможное участие в транспорте ионов Cl⁻. Физиология растений, 2007, Т. 54, С.892-901.

8. Куркова Е.Б., Халилова Л.А., Жамалетдинов Н.К., Мясоедов Н.А. Ультраструктура хлоропластов и некоторые особенности клеток листьев галофитов в условиях солевого стресса. Годичное собрание ОФР и Международная конференция «Физико-химические основы структурно-функциональной организации растений». Екатеринбург, 2008 (в печати).