

РЕГИСТРАЦИЯ ИЗМЕНЕНИЙ ВНЕКЛЕТОЧНОГО pH МЕТОДОМ КОНФОКАЛЬНОЙ МИКРОСКОПИИ ПРИ ГЕНЕРАЦИИ ПОТЕНЦИАЛОВ ВОЗБУЖДЕНИЯ У ВЫСШЕГО РАСТЕНИЯ

© В. А. Воденев,¹ Е. К. Акинчиц,¹ Л. А. Орлова,¹ В. С. Сухов,¹ И. В. Балалаева^{1, 2}

¹ Нижегородский государственный университет им. Н. И. Лобачевского

и ² Институт прикладной физики РАН, Нижний Новгород;

¹электронный адрес: v.vodeneev@mail.ru

Метод конфокальной микроскопии был использован для регистрации изменений pH апопласта стебля проростков *Cucurbita pepo* при генерации потенциала действия и переменного потенциала. Для регистрации изменений pH был использован флуоресцентный зонд FITC-декстран. На основании анализа полученных изображений и определения спектров флуоресценции было установлено, что зонд локализуется в стенках клеток стебля. Показано, что при распространении потенциала действия и переменного потенциала происходит временное усиление интенсивности флуоресценции зонда, которое свидетельствует о защелачивании клеточных стенок. Предположено, что переходное защелачивание апопласта связано с временным угнетением активности электрогенного H⁺-насоса плазматической мембраны.

Ключевые слова: высшие растения, конфокальная микроскопия, изменение pH, потенциалы возбуждения, протонный насос.

Принятые сокращения: ВП — переменный потенциал, ПД — потенциал действия, I — интенсивность флуоресценции, ΔU — внеклеточно регистрируемая разность потенциалов.

Потенциалы возбуждения, представленные у высших растений потенциалом действия (ПД) и переменным потенциалом (ВП), играют важную роль в функционировании растительных организмов (Fromm, Lautner, 2007; Пятыхин и др., 2008), что делает проблему изучения механизмов их генерации весьма актуальной. Однако исследование природы потенциалов возбуждения у высших растений значительно отстает от изучения механизмов генерации ПД у животных и классического объекта электрофизиологии растений — гигантских клеток харовых водорослей, что связано во многом с рядом методических трудностей. В отличие от крупных (до 0.5 мм диаметром и нескольких сантиметров в длину) и непосредственно граничащих с внешним раствором клеток харовых водорослей (Shimmen et al., 1994; Veilby, 2007) клетки высших растений имеют сравнительно небольшие размеры, интегрированы в сложные структуры тканей и органов и за счет связывающих их между собой плазмодесм образуют единую электропроводящую структуру — симпласт (Оприлов и др., 1991). Такие особенности существенно ограничивают применение ряда традиционных методов электрофизиологии, в частности фиксации потенциала.

Можно выделить два основных пути преодоления методических сложностей в изучении электрических явлений у растений. Один из них заключается в переходе от целого растения к более простым системам — изолированные проводящие пучки, протопласты отдельных клеток, мембранные везикулы и др. (Оприлов и др., 1991; Tugman et al., 2001). При всей информативности подобного

подхода он имеет и существенные недостатки: негативное влияние на генерацию потенциалов возбуждения самой процедуры выделения и возможное изменение электрических свойств модельных систем.

Другой, более перспективный, путь связан с применением методических подходов, позволяющих изучать природу потенциалов возбуждения на целых растениях. Одним из них является использование флуоресцентных зондов, позволяющих регистрировать сдвиги ионных концентраций при одновременной регистрации электрической активности. Применение флуоресцентных зондов или белков для анализа природы потенциалов возбуждения у растений осуществлялось лишь в единичных работах (Stahlberg, Cosgrove, 1996; Lewis et al., 1997; Fisahn et al., 2004). Следует отметить, что в указанных работах регистрировали интегральную флуоресценцию зонда от больших участков растений. В то же время данный подход может быть использован для исследования динамики ионов, формирующих потенциал, на клеточном и субклеточном уровнях.

Удобным инструментом для решения последней задачи является метод конфокальной микроскопии, который позволяет дифференциально регистрировать флуоресценцию как поверхностных, так и более глубоко расположенных тканей с высоким пространственным и временным разрешением на целых растениях (Hepler, Gunning, 1998; Wymer et al., 1999; Гамалей, 2006; Феофанов, 2007). В сочетании с использованием специфических зондов метод позволяет, в частности, изучать изменения ионных концентраций при определенных физиологических процес-

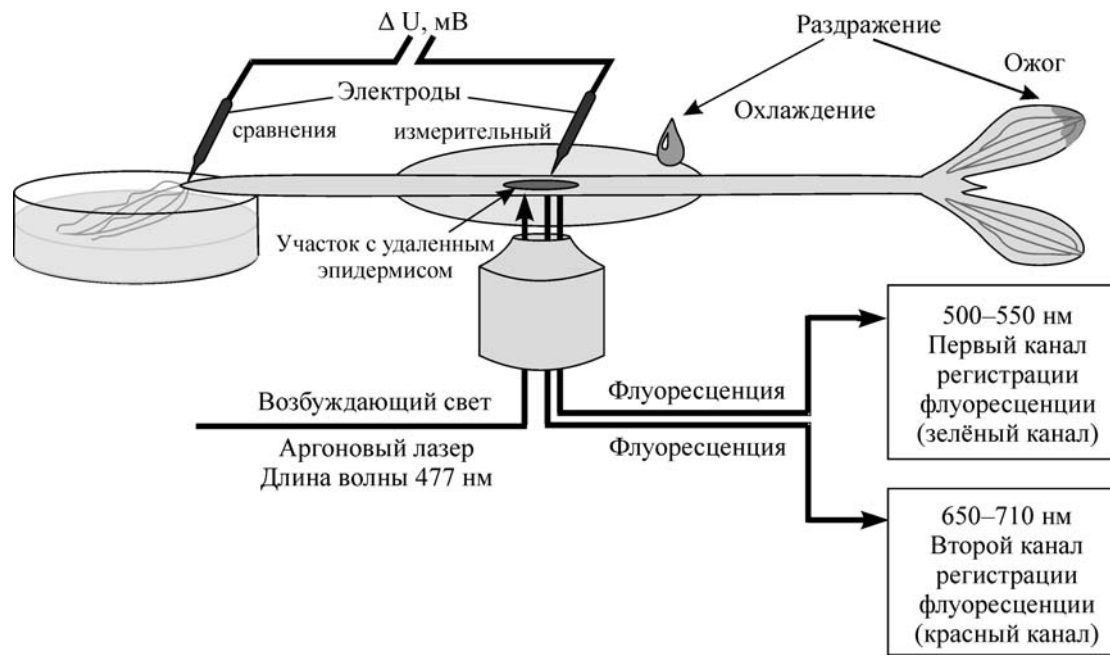


Рис. 1. Схема регистрации разности потенциалов (ΔU) и изменений внеклеточного pH с помощью флуоресцентного зонда FITC-декстран методом конфокальной микроскопии у проростка тыквы.

сах и воздействии внешних факторов (Wymer et al., 1999; Феофанов, 2007; Li et al., 2008). Для изучения природы потенциалов возбуждения у растений конфокальная микроскопия до настоящего времени не применялась. Целью настоящей работы явился анализ применимости метода для исследования ионных механизмов генерации ПД и ВП у высших растений.

Материал и методика

Объектом исследования служили 3–4-недельные проростки тыквы *Cucurbita pepo* L. (сорт Мозолевская). Проростки выращивали в климатической камере KBW-240, «Binder» при 25 °C и 16-часовом световом периоде. В качестве субстрата использовали керамзит, питательным раствором служила 50%-ная среда Хогланда-Арнона.

Изменения pH регистрировали с помощью pH-чувствительного зонда флуоресцеинизотиоцианата (FITC), соединенного с молекулой декстрана (FITC-декстран) (Hoffman, Cosegarten, 1995; Hedrich et al., 2001). Максимумы возбуждения и флуоресценции зонда составляют 493 и 520 нм соответственно. Зависимость параметров флуоресценции FITC-декстрана от величины pH определяли путем регистрации спектров флуоресценции и спектров возбуждения в буферных растворах (Tris-MES, 20 мМ) с различными значениями pH (от 4.5 до 8 с шагом 0.5 единицы). Регистрацию флуоресценции осуществляли на спектрофлуориметре Shimadzu RF-5301 PC. Увеличение интенсивности флуоресценции (I) соответствует изменению pH в щелочную сторону. Сдвигов максимумов возбуждения и эмиссии не происходит.

Для загрузки растения зондом на участке стебля удаляли с двух сторон полоски эпидермиса длиной около 1 см и шириной около 2 мм и погружали его в раствор, содержащий (в М) $1 \cdot 10^{-3}$ KCl, $5 \cdot 10^{-4}$ CaCl₂, $5 \cdot 10^{-4}$ NaCl и

$5 \cdot 10^{-7}$ FITC, на 12–18 ч. Перед проведением измерений стебли растений промывали проточной водой для удаления зонда с поверхности.

Регистрацию флуоресценции от целого растения осуществляли на комплексе лазерной сканирующей микроскопии — инвертированный микроскоп Axiovert 200M, лазерный сканирующий модуль Carl Zeiss LSM 510 и спектральный модуль Carl Zeiss 23 META. Проросток размещали на столике микроскопа, закрепляя на предметном стекле участок стебля с удаленными полосками эпидермиса (рис. 1). К предметному стеклу был обращен неповрежденный участок стебля, интенсивность флуоресценции которого регистрировали. Корни проростка погружали в чашку Петри с раствором, содержащим (в М) $1 \cdot 10^{-3}$ KCl, $5 \cdot 10^{-4}$ CaCl₂ и $5 \cdot 10^{-4}$ NaCl.

Изображения получали с помощью объектива Plan Achromat 100×/1.40 Oil DIC. Для возбуждения флуоресценции использовали аргоновый лазер (477 нм) с мощностью излучения на выходе из объектива около 0.003 мВт. Флуоресценцию регистрировали по двум каналам: 500–550 нм (зеленый канал) и 650–710 нм (красный канал). Размер получаемых 2D-изображений составлял 90×90 мкм с разрешением 930×930 пикселей. Время получения детализированного изображения составляло 7.15 с. При получении 3D-изображений глубина по координате Z в каждом конкретном случае зависела от глубины полезного сигнала на исследуемом участке растения и составляла 45–75 мкм с шагом по глубине 1.2 мкм.

С помощью спектрального модуля Carl Zeiss 23 META регистрировали спектр измеряемого сигнала в диапазоне 490–705 нм с шагом 10 нм при возбуждении флуоресценции на длине волны 477 нм.

Стандартное программное обеспечение Carl Zeiss LSM 510 META позволяет проводить мониторинговые исследования. При получении временной серии с целью ускорения получения одного кадра разрешение 2D-изображения было снижено до 512×512 пикселей, при этом

время получения одного изображения составляло около 2 с. После сохранения временной серии строили зависимость уровня сигнала от времени в выбранных областях изображения.

Одновременно с регистрацией флуоресценции осуществляли запись электрической активности. Электрическую активность регистрировали внеклеточно с помощью хлорсеребряных (Ag/AgCl) макроэлектродов (ЭВЛ-1М3). Усилителем служил иономер универсальный ИПЛ-112. Измерительный электрод располагался в зоне регистрации флуоресценции, электрод сравнения контактировал с раствором, омывающим корни. Измеряемая внеклеточно разность потенциалов (ΔU) представляет интегральные изменения мембранного потенциала клеток в зоне регистрации (Зацепина, Цаплев, 1980).

Генерацию ПД индуцировали локальным охлаждением — наносили каплю ледяной воды на стебель в нескольких сантиметрах акропетальнее зоны регистрации флуоресценции. ВП индуцировали повреждающим воздействием в виде ожога семядольного листа открытым пламенем.

Измерения проводили в 3—4-кратной биологической повторности.

Результаты и обсуждение

На первом этапе исследовали локализацию pH-чувствительного зонда FITC-декстран после его загрузки в растение. Для этого были получены 3D-изображения участка стебля в двух диапазонах длин волн: 500—550 нм — зеленый канал, который соответствовал флуоресценции зонда (Hoffman, Cosegarten, 1995; Hedrich et al., 2001), и 650—710 нм — красный канал, который соответствовал области автофлуоресценции хлоропластов (Веселовский, Веселова, 1990). На рис. 2 приведены типичные изображения участка стебля проростков тыквы, нагруженных зондом FITC-декстран (рис. 2, а), и контрольных (рис. 2, б). У контрольных растений сигнал в зеленом канале регистрируется только от поверхности стебля. Наличие зонда в растениях позволяет получать четкие трехмерные изображения глубиной в несколько слоев клеток.

На полученных изображениях растений, нагруженных зондом, отчетливо видно, что флуоресценция в диапазоне 500—550 нм локализована в межклеточном пространстве (рис. 2). На основании этого можно сделать вывод о том, что использованный нами флуоресцентный зонд FITC-декстран избирательно накапливается в апопласте. Это подтверждает использование второго канала регистрации флуоресценции: области, в которых имеет место флуоресценция зонда (апопласт), не перекрываются с областями, в которых имеет место автофлуоресценция хлоропластов (цитоплазма).

Известно, что при исследованиях методом конфокальной микроскопии, проводимых на растительных объектах, имеет место их автофлуоресценция в широком диапазоне длин волн (Berg, 2004), которая способна вносить определенный вклад в итоговую картину, а также существует вероятность того, что регистрируемый сигнал может в той или иной степени модулироваться рассеянием возбуждающего света от структур с различными оптическими свойствами. В связи с этим для корректной оценки полученных изображений необходимо проведение их спектрального анализа. Регистрация спектров излучения (рис. 3) показала, что только клеточные стенки растений, нагруженных зондом, имеют четкий максимум флуоресценции в области 520 нм (рис. 3, б), соответствующий максимуму флуоресценции зонда в растворе (рис. 3, а). У контрольных растений на спектрах флуоресценции такой максимум отсутствовал (рис. 3, в), и I в области 500—550 нм была незначительной. На основании этого можно заключить, что именно флуоресценция зонда вносит основной вклад в свечение апопласта, если регистрация осуществляется не от поверхности стебля, а на определенной глубине. Таким образом, изучение характеристик флуоресценции и локализации FITC-декстрана в растении указывает на возможность использования I зонда для дифференциальной оценки изменений pH апопласта.

Для изучения динамики pH клеточных стенок при генерации ПД на исходно полученном 3D-изображении выбирали отдельный оптический срез, соответствующий третьему или четвертому от поверхности слою клеток (рис. 4), и проводили определение I во времени от участков, показанных на рисунке. На рис. 4 показаны индуци-

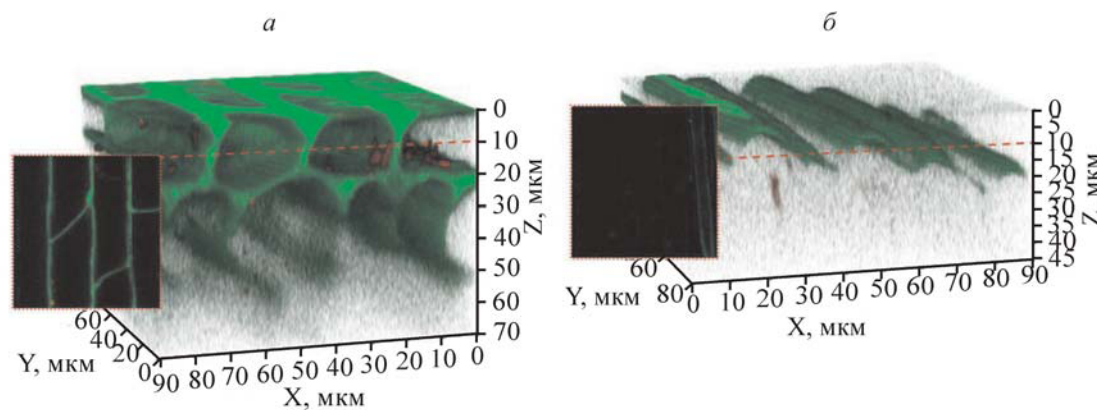


Рис. 2. 3D-изображения участка стебля проростков тыквы: нагруженного зондом FITC-декстран (а) и контрольного (б). Конфокальная микроскопия.

На вставках показаны 2D-изображения на глубине 10 мкм (отмеченной штриховой линией). Размер изображения на вставках 90×90 мкм. Зеленый канал (500—550 нм) соответствует флуоресценции зонда, красный (650—710 нм) — автофлуоресценции хлоропластов. $\lambda_{\text{ex}} = 477$ нм.

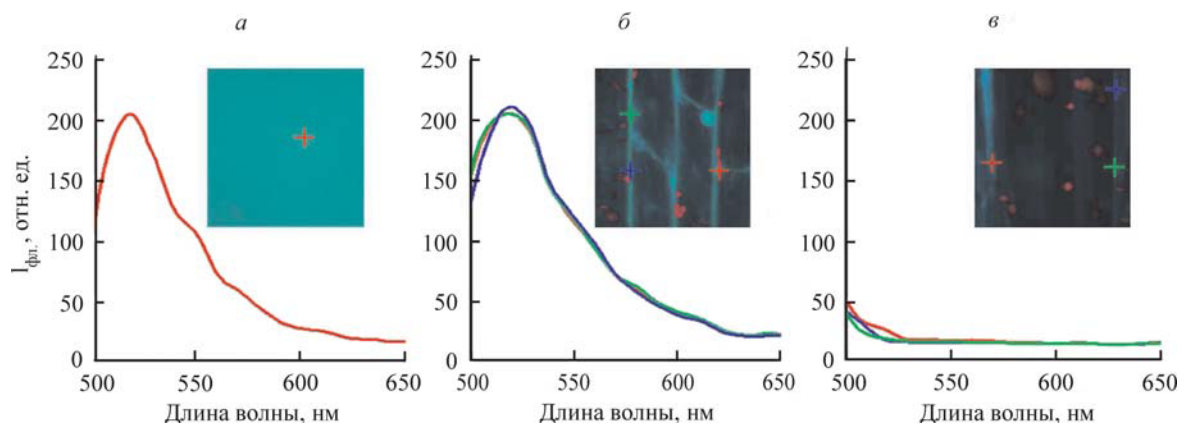


Рис. 3. Спектры флуоресценции и псевдоцветные спектральные изображения раствора FITC-декстрана (а), а также растения, нагруженного зондом (б), и контрольного (в).

На вставках маркерами соответствующего цвета отмечены точки снятия спектров. Размер изображений на вставках 90×90 мкм. $\lambda_{\text{ex}} = 477$ нм.

рованные раздражением (капля ледяной воды на гипокотиль выше зоны регистрации) изменения I (рис. 4, а) и электрической активности (рис. 4, б). Как видно на рисунке, нанесение раздражения вызывает распространение ПД, генерация которого сопровождается временным усилением I , причем кинетика обоих процессов очень близка. Обнаруженные изменения I свидетельствуют о том, что при генерации ПД происходит временное защелачивание апопласта на фазе деполяризации ПД, которое сменяется закислением до близкого к исходному уровню на фазе реполяризации.

Изменение pH апопласта было обнаружено также при распространении по стеблю ВП, индуцированного ожогом семядольного листа (данные не приведены). Как и в случае с ПД, изменения pH апопласта имели обратимый характер, однако длительность защелачивания была существенно больше и хорошо соответствовала более длительному развитию фазы реполяризации, характерному для ВП (Julien, Frachisse, 1992; Stahlberg, Cosgrove, 1996; Rousset et al., 2002).

Зарегистрированные нами с помощью флуоресцентного зонда изменения pH имеют тот же характер, что и при их измерении потенциометрическим методом с использованием pH-чувствительных электродов (Воденев и др., 2006; Felle, Zimmermann, 2007; Vodenev et al., 2007; Zimmermann, Felle, 2009), что может служить подтверждением корректности полученных результатов. В то же время, следует подчеркнуть, что при использовании pH-чувствительных электродов регистрация осуществлялась в растворе вблизи поверхности стебля или в устьичной щели, а применение флуоресцентного зонда и метода конфокальной микроскопии позволило оценить динамику изменения содержания протонов в более глубоко лежащих тканях. Кроме того, полученная с помощью конфокального микроскопа картина позволяет дифференциально оценить особенности изменения pH апопласта в непосредственной близости от плазматической мембраны, что позволяет с большей степенью точности связать регистрируемые изменения с трансмембранными потоками ионов.

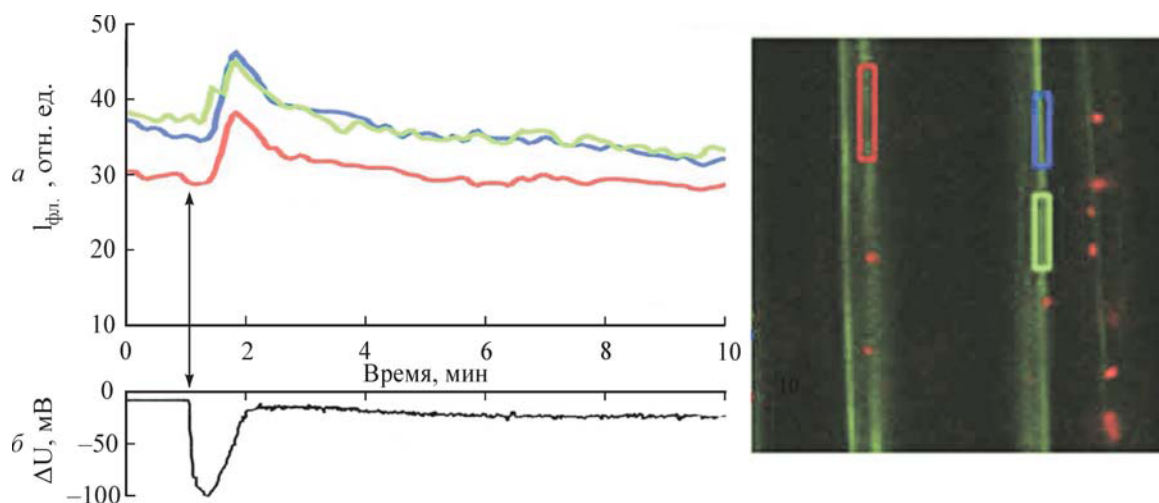


Рис. 4. Изменение интенсивности флуоресценции FITC-декстрана (а) и разности потенциалов (б) при генерации потенциала действия, индуцированного локальным охлаждением стебля акропетальной зоны регистрации флуоресценции.

Стрелками указан момент нанесения раздражения. Кривые интенсивности флуоресценции соответствуют величине сигнала в областях, выделенных на вставке справа прямоугольниками соответствующего цвета. Размер изображения на вставке 90×90 мкм.

Полученные результаты по изменению pH клеточных стенок указывают на следующую последовательность событий: во время фазы деполяризации протоны входят в клетку из апопласта, что вызывает его защелачивание; на фазе реполяризации происходит их перенос из клетки в апопласт, что ведет к возвращению pH к значениям, близким к исходным. Такое развитие событий может иметь место, если происходит временное угнетение активности протонной АТФазы — инактивация на фазе деполяризации импульсы и реактивация на фазе реполяризации. Это предположение, высказанное нами ранее, подтверждается рядом экспериментальных фактов (Воденев и др., 2006; Vodenev et al., 2007). В то же время существует иная точка зрения на природу изменений внеклеточного pH, согласно которой переходное защелачивание может быть связано с возникновением потока сильных анионов, в частности Cl⁻, из клетки во время развития фазы деполяризации (Felle, Zimmermann, 2007; Zimmermann, Felle, 2009).

Необходимо подчеркнуть, что генерация ВП, которая также сопровождается временным защелачиванием (Julien, Frachisse, 1992; Stahlberg, Cosgrove, 1996; Rousset et al., 2002, и др.), связана с временным снижением активности электрогенного H⁺-насоса. В связи с этим можно ожидать, что однонаправленные изменения pH апопласта, хорошо соответствующие времени развития электрических реакций, которые были зарегистрированы нами при распространении как ПД, так и ВП, имеют в своей основе единый механизм. Следовательно, имеет больше оснований полагать, что временное защелачивание связано с временным снижением активности электрогенного насоса. В настоящее время обсуждается возможная роль изменения внутри- и внеклеточного pH, связанного с генерацией потенциалов возбуждения, в качестве возможного сигнального фактора, индуцирующего дальнейшие функциональные изменения (Пятыгин и др., 2008; Zimmermann, Felle, 2009).

Проведенный анализ показал, что использование метода конфокальной микроскопии позволяет дифференциально оценивать изменения ионных концентраций в отдельных клеточных компартаментах. Такая особенность ПД у высших растений, как большая длительность, значительно облегчает проведение флуоресцентного анализа. Успешное применение данного метода для анализа изменений pH апопласта указывает на возможность его использования для исследования динамики концентраций других ионов.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 09-04-97085) и Федерального агентства по науке и инновациям (ГК № 02.740.11.0086).

Список литературы

- Веселовский В. А., Веселова Т. В. 1990. Люминесценция растений. М.: Наука. 200 с.
- Воденев В. А., Опритов В. А., Пятыгин С. С. 2006. Обратимое изменение внеклеточного pH при генерации потенциала действия у высшего растения *Cucurbita pepo*. Физиол. раст. 53 (4) : 538—545.
- Гамалей Ю. В. 2006. Подвижная сетевая организация плазматид и митохондрий в растительных клетках. Цитология. 48 (4) : 271—282.
- Зацепина Г. Н., Цаплев Ю. Б. 1980. Природа электрической полярности высшего растения. Биофизика. 25 (1) : 144—147.
- Опритов В. А., Пятыгин С. С., Ретивин В. Г. 1991. Биоэлектрогенез у высших растений. М.: Наука. 213 с.
- Пятыгин С. С., Опритов В. А., Воденев В. А. 2008. Сигнальная роль потенциала действия у высших растений. Физиол. раст. 55 (2) : 312—319.
- Феофанов А. В. 2007. Спектральная лазерная сканирующая конфокальная микроскопия в биологических исследованиях. Успехи биол. хим. 47 : 371—410.
- Beilby M. J. 2007. Action potential in charophytes. Int. Rev. Cytol. 257 : 43—82.
- Berg R. H. 2004. Evaluation of spectral imaging for plant cell analysis. J. Microscopy. 214 : 174—181.
- Felle H. H., Zimmermann M. R. 2007. Systemic signaling in barley through action potentials. Planta. 226 : 203—214.
- Fisahn J., Herde O., Willmitzer L., Pena-Cortes H. 2004. Analysis of the transient increase in cytosolic Ca²⁺ during the action potential of higher plants with high temporal resolution: requirement of Ca²⁺ transients for induction of jasmonic acid biosynthesis and PINII gene expression. Plant Cell Physiol. 45 : 456—459.
- Fromm J., Lautner S. 2007. Electrical signals and their physiological significance in plants. Plant Cell Environ. 30 : 249—257.
- Hedrich R., Neimanis S., Savchenko G., Felle H. H., Kaiser W. M., Heber U. 2001. Changes in apoplastic pH and membrane potential in leaves in relation to stomatal responses to CO₂, malate, abscisic acid or interruption of water supply. Planta. 213 : 594—601.
- Hepler P. K., Gunning B. E. S. 1998. Confocal fluorescence microscopy of plant cells. Protoplasma. 201 : 121—157.
- Hoffman B., Cosegarten H. 1995. FITC-dextran for measuring apoplast pH and apoplastic pH gradients between various cell types in sunflower leaves. Physiol. Plant. 95 : 327—335.
- Julien J. L., Frachisse J. M. 1992. Involvement of the proton pump and proton conductance change in the wave of depolarization induced by wounding in *Bidens pilosa*. Can. J. Bot. 70 : 1451—1458.
- Lewis B. D., Karlin-Neumann G., Davis R. W., Spalding E. P. 1997. Ca²⁺-activated anion channels and membrane depolarizations induced by blue light and cold in *Arabidopsis* seedlings. Plant Physiol. 114 : 1327—1334.
- Li B.-B., Gao Z.-H., Zhou X.-Y., Ren H.-B., Xie M., Fan Y.-J., Hu J.-F., Jia W.-S. 2008. A confocal technique applicable to studies of cellular pH-related signaling in plants. J. Integr. Plant Biol. 50 : 682—690.
- Rousset M., de Roo M., Guennec J.-Y., Pichon O. 2002. Electrophysiological characterization of tomato hypocotyls putative action potentials induced by cotyledon heating. Physiol. Plant. 115 : 197—203.
- Shimmen T., Mimura T., Kikuyama M., Tazawa M. 1994. Characean cells as a tool for studying electrophysiological characteristics of plant cell. Cell Struct. Funct. 19 : 263—278.
- Stahlberg R., Cosgrove D. J. 1996. Induction and ionic basis of slow wave potentials in seedlings of *Pisum sativum* L. Planta. 200 : 416—425.
- Tyerman S. D., Beilby M., Whittington J., Juswono U., Neyman L., Shabala S. 2001. Oscillations in proton transport revealed from simultaneous measurements of net current and net proton fluxes from isolated root protoplasts: MIFE meets patch-clamp. Aust. J. Plant Physiol. 28 : 591—604.
- Vodenev V. A., Opritov V. A., Pyatygin S. S. 2007. Reversible change of extracellular pH at the generation of mechano-induced electrical reaction in a stem of *Cucurbita pepo*. Plant Signal. Behavior. 2 : 267—268.
- Wymer C. L., Beven A. F., Boudonck K., Lloyd C. W. 1999. Confocal microscopy of plant cells. Methods Mol. Biol. 122 : 103—130.
- Zimmermann M. R., Felle H. H. 2009. Dissection of heat-induced systemic signals: superiority of ion fluxes to voltage changes in substomatal cavities. Planta. 229 : 539—547.

AN EXTRACELLULAR pH CHANGES REGISTRATION BY CONFOCAL MICROSCOPY
IN HIGHER PLANT AT THE EXCITATION POTENTIALS GENERATION*V. A. Vodeneev,¹ E. K. Akinchits,¹ L. A. Orlova,¹ V. S. Sukhov,¹ I. V. Balalaeva^{1,2}*¹ N. I. Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod
and ² Institute of Applied Physics RAS, Nizhny Novgorod;
¹ e-mail: v.vodeneev@mail.ru

Confocal microscopy technique was applied for registration of apoplast pH changes in the *Cucurbita pepo* seedling stem during generation of action potential and variation potential. Fluorescent dye FITC-dextran was used for pH-changes registration. Analysis of fluorescence images and fluorescence spectra showed, that FITC-dextran was localized in cell walls. Propagation of action potential and variation potential was accompanied by transient increase of fluorescence intensity, which indicated alkalization of cell walls. This transient alkalization is proposed to be caused by a temporary inactivation of the H⁺-pump in the plasma membrane.

Key words: higher plants, confocal microscopy, pH-change, excitation potentials, proton pump.
