

БИОЛОГИЯ**BIOLOGY**

УДК 57.033; 577.352.46

<https://doi.org/10.29235/1561-8323-2021-65-3-320-329>

Поступило в редакцию 25.02.2021

Received 25.02.2021

**В. В. Демидчик, П. В. Гриусевич, М. А. Войтехович, Ю. В. Толкачева,
А. В. Кулинкович, А. И. Соколик**

Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь

**ТРАНСПОРТ ОРГАНИЧЕСКИХ АНИОНОВ В КЛЕТКАХ КОРНЯ И ЕГО РОЛЬ
В ПРОЦЕССАХ КЛЕТОЧНОЙ СИГНАЛИЗАЦИИ У ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ**

(Представлено академиком А. В. Кильчевским)

Аннотация. Обмен органических анионов имеет большое значение для метаболических, биоэнергетических и электрохимических процессов в растительной клетке, напрямую влияя на качественные и количественные показатели продуктивности, а также реакции стрессоустойчивости у высших растений. Тем не менее, процессы перераспределения и мембранного транспорта данных веществ в тканях растений пока исследованы крайне недостаточно, в частности, до сих пор не установлены механизмы выхода анионов из клетки так называемым пассивным путем, т. е. посредством ионных каналов. В настоящей работе с использованием метода локальной фиксации потенциала (Patch-Clamp) впервые выявлены и детально охарактеризованы анионные каналы клеток корня *Arabidopsis thaliana*, *Triticum aestivum*, *Helianthus annuus*, опосредующие выходящий поток важнейших органических анионов, таких как аскорбат, малат, глюконат, цитрат, fumarат и пропионат. Установлено, что данные транспортные системы обладают высокой проницаемостью для аскорбата, малата и цитрата, одновременно демонстрируя низкую проницаемость для fumarата, пропионата и глюконата. Анионные каналы клеток корня имеют быструю кинетику активации и низкую потенциал-зависимость, они также ингибируются 9-антраценкарбоновой кислотой, что указывает на их возможную принадлежность к семейству ионных каналов ALMT, которое существует только у высших растений. С использованием эквириновой хемилюминометрии протестировано воздействие органических анионов на процессы Ca^{2+} -сигнализации в корне, в результате чего показано, что аскорбат способен индуцировать повышение уровня цитоплазматической активности Ca^{2+} . Данный эффект может лежать в основе ранее неизвестных функций экзогенного аскорбата, связанных с обеспечением реакций ближней и дальней сигнализации у высших растений.

Ключевые слова: органические кислоты, анионный транспорт, кальциевая сигнализация, метод локальной фиксации потенциала, электрофизиология растений, эквириновая люминометрия, *Arabidopsis thaliana*, *Triticum aestivum*, *Helianthus annuus*

Для цитирования. Транспорт органических анионов в клетках корня и его роль в процессах клеточной сигнализации у высших растений / В. В. Демидчик [и др.] // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2021. – Т. 65, № 3. – С. 320–329. <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2021-65-3-320-329>

**Vadim V. Demidchik, Palina V. Hryvusevich, Maryia A. Vaitsiakhovich, Julia V. Talkachova,
Aliaksandr V. Kulinkovich, Anatoliy I. Sokolik**

Belarusian State University, Minsk, Republic of Belarus

**TRANSPORT OF ORGANIC ANIONS IN ROOT CELLS AND ITS ROLE IN CELL SIGNALING
IN HIGHER PLANTS**

(Communicated by Academician Aleksandr V. Kilchevsky)

Abstract. The organic anion balance is critical for metabolic, bioenergetic, and electrochemical processes in plant cells, controlling the quality and quantity of yield and plant stress resistance. Nevertheless, the redistribution and membrane transport of these substances in plant tissues have not been investigated in detail. The mechanism of passive anion efflux from a plant cell through the ion channels has not been established so far. Here, using the patch-clamp technique, we have characterized the ion channel-mediated conductances of ascorbate, malate, gluconate, citrate, fumarate, and propionate in the root cells of *Arabidopsis thaliana*, *Triticum aestivum*, and *Helianthus annuus*. These conductances showed high permeability to ascorbate, malate, and citrate, as well as low permeability to fumarate, propionate, and gluconate. Anion channel conductances of root cells showed rapid activation kinetics and low potential dependence. They were also inhibited by 9-anthracenecarboxylic acid, suggesting that they belong to the ALMT family of anion channels found only in higher plants. Aequorin chemilu-

minometry was used to test the effect of organic anions on the Ca^{2+} signaling in root cells. Among four organic anions tested, only ascorbate induced a significant increase in the cytosolic Ca^{2+} activity at physiological levels (1 and 10 mM). This effect may underlie the previously unknown functions of exogenous ascorbate related to short- and long-distance signaling in higher plants.

Keywords: organic acids, anion transport, calcium signaling, patch-clamp, plant electrophysiology, aequorin luminometry, *Arabidopsis thaliana*, *Triticum aestivum*, *Helianthus annuus*

For citation. Demidchik V. V., Hryvusevich P. V., Vaitsiakhovich M. A., Talkachova J. V., Kulinkovich A. V., Sokolik A. I. Transport of organic anions in root cells and its role in cell signaling in higher plants. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2021, vol. 65, no. 3, pp. 320–329 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2021-65-3-320-329>

Введение. Анионы органических кислот, такие как аскорбат, глюконат, цитрат, малат и др., играют исключительно важную роль в жизни растений, участвуя в метаболических превращениях, наборе биомассы, энергетическом и водном обмене, формировании гидроскелета, электрическом балансе и антиоксидантной защите [1–3]. Вопросы биосинтеза и внутриклеточного обмена данных соединений хорошо проработаны и широко представлены в литературе, однако механизмы их экссудации (выхода из клеток) и роль во внеклеточном пространстве остаются малоизученными [2; 4]. Выход анионов из растительной клетки осуществляется пассивно по градиенту электрохимического потенциала – в результате работы анионных каналов плазматической мембраны [5]. Этот процесс обеспечивает ряд критически важных физиологических реакций. Во-первых, он контролирует распределение метаболитов в тканях, во-вторых, формирует специфический внеклеточный паттерн органических анионов, участвующих в физиологических процессах, локализованных в апопласте. Кроме того, немаловажной функцией экссудатов является формирование синергического взаимодействия с микроорганизмами, такими как микоризные грибы и азотфиксирующие бактерии.

На сегодняшний день в геномах высших растений выявлено 3 семейства генов анионных каналов: SLAC(H)1 (SLOW Anion Channel 1 Homologues), ALMT1 (ALuminum-activated Malate Transporter 1) и CLC (Chloride Channel) [5]. Геном важнейшего модельного растения, *Arabidopsis thaliana* L., содержит 4 гена SLAC(H), 14 генов ALMT и 6 генов CLC [6]. Ввиду высокой редандности данных систем их свойства исследованы в основном в гетерологических экспрессионных системах (ооцитах и клетках НЕК293). Электрофизиологический анализ анионных каналов на интактном растительном материале проведен для крайне ограниченного круга объектов. В частности, исследованы анионные каналы в замыкающих клетках устьиц, для которых показана высокая проницаемость для малата и оксалоацетата (на примере растений *Vicia faba* и *Arabidopsis thaliana*) [7]. В корневых волосках *Arabidopsis thaliana* продемонстрированы анионные каналы, обладающие высокой проводимостью для цитрата [8], а в корнях *Lupinus albus* выявлены каналы, одинаково эффективно транспортирующие малат и цитрат [9]. Тем не менее, данные работы не дают ответа на вопрос о том, могут ли анионные каналы растений транспортировать такие важные органические ионы, как аскорбат, пропионат, глюконат или фумарат. Неисследованной также остается и физиологическая функция выделяемых в примембранное пространство органических анионов, в частности, их возможная роль в качестве сигнальных молекул. В связи с этим целью настоящей работы являлось зарегистрировать и детально изучить токи малата, аскорбата, пропионата, цитрата, глюконата и фумарата через плазматическую мембрану клеток корня высших растений, а также протестировать возможную роль эндогенного пула данных органических анионов в процессах Ca^{2+} -сигнализации в интактных клетках корня.

Материалы и методы исследования. В работе использовались 7–12-дневные проростки *Arabidopsis thaliana* L. Heynh. экотипов Columbia-0 (Col-0) и Wassilevskija (WS-0), 7–10-дневные проростки *Triticum aestivum* L. (сорт Василиса) и 7–10-дневные проростки *Helianthus annuus* L. (сорт КБШН-53). Растения *Arabidopsis thaliana* выращивались вертикально в стерильных условиях на среде Мурашиге и Скуга (Duchefa, Харлем, Нидерланды) с добавлением 1 % сахарозы и 0,35 % Phytigel™ (Sigma, США), pH титровался до уровня 6,0 при помощи КОН. Чашки Петри помещались в ростовую камеру с контролируемыми стандартизированными условиями освещения (100 мкмоль фотонов/с·м²), световым режимом (16 ч света/8 ч темноты) и температурой (22 °C). Проростки *Triticum aestivum* и *Helianthus annuus* выращивались рулонным методом в разбавленной среде Мурашиге и Скуга (10 %) в таких же условиях, что и растения *Arabidopsis thaliana*.

Протопласты изолировались ферментативно согласно ранее разработанным протоколам, на основе целлюлазы Onozuka RS (Yakult, Япония), целлюлолизина (CalBiochem, Великобритания) и пектолиазы Y-23 (Yakult, Япония) [10]. Осмоляльность растворов при работе с *Arabidopsis thaliana* L. доводилась до $300 \text{ мОсм} \cdot \text{кг}^{-1}$, а при работе с *Helianthus annuus* L. и *Triticum aestivum* L. до $600 \text{ мОсм} \cdot \text{кг}^{-1}$ при помощи D-сорбита и вапроосмометра Wescor (Wescor Inc., США). Раствор для хранения протопластов содержал 10 мМ KCl , 10 мМ CaCl_2 , 2 мМ MgCl_2 , pH 6,0 (2 мМ Mес , 1 мМ Трис). Протопласты содержались на льду, сохраняя жизнеспособность на протяжении 24 ч.

Регистрация и анализ трансмембранных токов осуществлялись при помощи стандартной техники локальной фиксации потенциала (Patch-Clamp), детально описанной нами ранее в приложении к исследованию ионных каналов мембран клеток корня [10]. Для создания гигаомной изоляции между микропипеткой и плазматической мембраной протопласта использовался наружный раствор с высоким уровнем Ca^{2+} (20 мМ) на фоне $0,1 \text{ мМ NaCl}$ (KCl в случае пшеницы и подсолнечника). Гигаомный контакт достигался за счет создания импульса негативного давления в микропипетке. Регистрация токов проводилась в конфигурации «целая клетка» (Whole-Cell Mode). Пипеточный раствор во всех вариантах содержал 10 мМ Cl^- , 100 нМ Ca^{2+} ($0,75 \text{ мМ 1,2-бис(о-аминофенокси)этан-N,N,N',N'-тетрауксусной кислоты}$, $0,3 \text{ мМ CaCl}_2$), pH 7,2 (1 мМ Трис , 2 мМ Mес). Состав пипеточного раствора варьировал в различных экспериментах и детально рассмотрен по тексту. Растворы фильтровались через бактериальный фильтр (Millipore, Великобритания). Диффузионный потенциал растворов рассчитывался при помощи компьютерной программы JPCALC (SDR Scientific, Австралия). Активность ионов рассчитывалась при помощи компьютерной программы GEOCHEM (GEOCHEM-EZ, США). Электрические токи через плазматическую мембрану регистрировались электрофизиологическим усилителем Dagan Cornevores Series (Dagan, Япония) с использованием компьютеризированного аналого-цифрового преобразователя Digidata 1322 A (Molecular Devices, США). Электрофизиологические данные анализировались при помощи компьютерных программ Clampex 9.2 и Clampfit 9.2 (Molecular Devices, США). Основным протоколом фиксации напряжения являлась подача прямоугольных импульсов амплитудой от -180 до -80 мВ с шагом 25 мВ при потенциале фиксации -90 мВ . Электрофизиологическая установка была установлена на антивибрационном столе PCT-12 (OFC Systems, Великобритания). Использовался инвертированный микроскоп Carl Zeiss IM-2F (Carl Zeiss, Германия), микропозиционер Hodgkin-Huxley (Hodgkin-Huxley Ltd, Великобритания) и набор периферийных устройств Axon Instruments (Axon Instruments, США). Токвые кривые и вольт-амперные характеристики анализировались при помощи компьютерной программы SigmaPlot 10.0 (Systat Software Inc., США).

Для регистрации уровня активности Ca^{2+} в цитоплазме ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$) в работе использовался высокочувствительный компьютеризированный хемилюминометр Turner BioSystems 20/20 (Turner Inc., США). Применялись стандартные экспериментальные подходы измерения $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$, основанные на регистрации люминесценции экворина в интактных корнях *Arabidopsis thaliana* [10]. Корни 200–250 проростков *Arabidopsis thaliana* L. (Col-0), конститутивно экспрессирующие фотобелок экворин, инкубировались в темноте в присутствии 4 мкг/мл целентеразина в течение 12–18 ч в растворе, содержащем $0,1 \text{ мМ CaCl}_2$ (pH 6,0) для реконституирования экворина. Эксперимент проводился с равным количеством корней в цилиндрических кварцевых кюветках в растворе, содержащем повышенную концентрацию Ca^{2+} (10 мМ CaCl_2) при pH 6,0 (Трис/Мес). Непосредственно перед тестированием кюветы с корнями ($0,3 \text{ мл}$) выдерживались в покое в темноте в течение 20 мин для стабилизации базального уровня $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$. В ходе опыта кювета помещалась в рабочий отсек люминометра, регистрация эмиссии светового сигнала экворина производилась с частотой 1 Гц. Равный объем ($0,3 \text{ мл}$) тестируемого раствора вводился в кювету через затемненный канал, измерялся временной ход изменения интенсивности люминесценции экворина. В конце опыта производилось так называемое гашение экворина, т. е. взаимодействие всего доступного пула экворина с Ca^{2+} с выделением максимального калибровочного светового сигнала (2 М CaCl_2 , 20% -ный этанол). Значения $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$ рассчитывались и анализировались согласно ранее разработанной методике [10].

Результаты и их обсуждение. С использованием конфигурации «целая клетка» были зарегистрированы токи через плазматическую мембрану протопластов, изолированных из корней

Arabidopsis thaliana L. экотипа WS-0 (рис. 1–3). Особенностью метода локальной фиксации потенциала является возможность контроля внутренней среды протопласта (пипеточного раствора) посредством формирования электролитного контакта полрой микропипетки и цитоплазмы клетки. В настоящей работе на *Arabidopsis thaliana* L. в пипеточном растворе был задан высокий уровень органических анионов (40 мМ), что позволило измерить сравнительно невысокие по амплитуде анионные токи. Пипеточный раствор также содержал 50 мМ Na⁺ в качестве баланс-иона

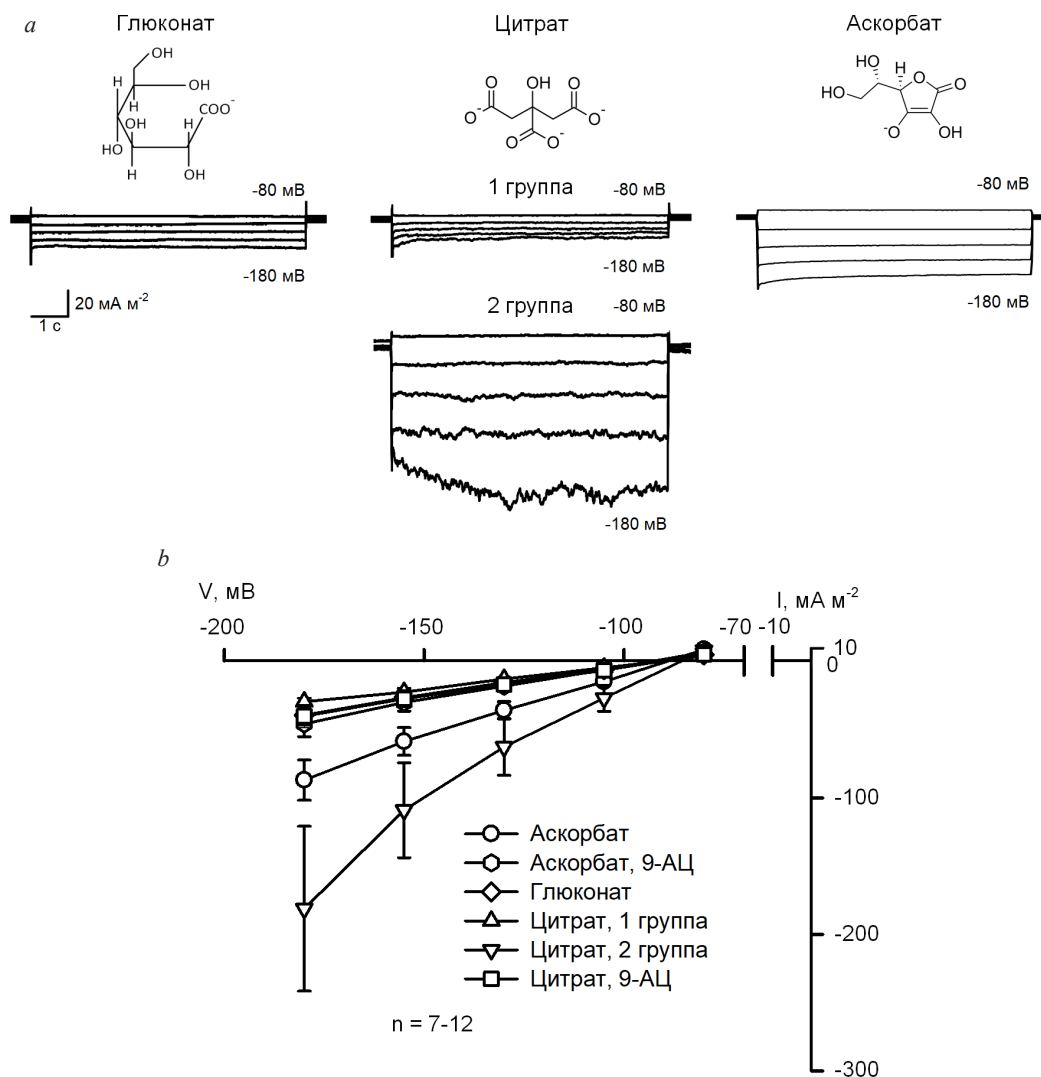


Рис. 1. Токи глюконата, цитрата и L-аскорбата через плазматическую мембрану клеток корня *Arabidopsis thaliana*: *a* – типичные токовые кривые, полученные в ответ на прямоугольные импульсы напряжения в диапазоне от –80 до –180 мВ при введении в пипеточный раствор 40 мМ глюконата, цитрата или L-аскорбата; *b* – вольт-амперные характеристики, полученные по средним значениям токов ($n = 7-12$; $x \pm Sx$). Наружный раствор: 20 мМ CaCl₂, 0,1 мМ NaCl, pH 6,0 (2 мМ Мес, 1 мМ Трис), 300 мОсм·кг⁻¹. Пипеточный раствор: 40 мМ NaOH, 40 мМ L-аскорбиновой кислоты (цитрата или глюконата), 100 нМ Ca²⁺ (0,75 мМ 1,2-бис(о-аминофенокси)этан-N,N,N',N'-тетрауксусной кислоты, 0,3 мМ CaCl₂), pH 7,2 (10 мМ Трис). 1 мМ 9-АЦ вводился в данный раствор при ингибиторном анализе токов

Fig. 1. Currents of gluconate, citrate, and L-ascorbate across the plasma membrane of *Arabidopsis thaliana* root cells: *a* – typical current curves obtained using a series of square voltage pulses (–80 to –180 mV) as a voltage-clamp protocol. Gluconate, citrate and L-ascorbate (40 mM) were added to the pipette solution; *b* – current-voltage curves, obtained from the average values of currents ($n = 7-12$; $x \pm Sx$). The standard bathing solution contained 20 mM CaCl₂, 0.1 mM NaCl, pH 6.0 (adjusted by 2 mM Mes, 1 mM Tris), 300 mOsm/kg (adjusted by D-sorbitol). The pipette solution contained the following salines: 40 mM NaOH, 40 mM gluconate, citrate or L-ascorbate, 100 nM Ca²⁺ (0.75 mM 1,2-bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid, 0.3 mM CaCl₂), pH 7.2 (adjusted by 10 mM Tris), 300 mOsm/kg (adjusted by D-sorbitol). 9-anthracenecarboxylic acid was added into this solution during inhibitory analysis of currents (the corresponding curves are indicated in the legend)

(также стабилизирующего электрический потенциал и ингибирующего K^+ -каналы), а также 10 мМ Cl^- (обеспечивающего электрический контакт AgCl-системы микроэлектрода).

В первой группе опытов были измерены токи наиболее крупных органических анионов (глюконата, аскорбата и цитрата), соответствующие выходу данных анионов из растительной клетки (рис. 1). Во всех случаях были зарегистрированы быстро активирующиеся токи, отличающиеся низкой потенциал-зависимостью (небольшой рост проводимости был отмечен в области гиперполяризации). В случае глюконата и цитрата токи были значительно ниже, чем в случае аскорбата. Для цитрата четко выделялись 2 группы протопластов по проводимости: первая (около 70 %) с низким, а вторая (около 30 %) с высокими значениями анионного тока. Максимальный ток при гиперполяризации до -180 мВ составлял в случае цитрата для 1 и 2 группы клеток $-29,4 \pm 2,7$ и $-181,2 \pm 60,4$ mA/m^2 ($n = 12$; $x \pm Sx$) соответственно. При этом в случае глюконата он был $-39,9 \pm 8,3$ mA/m^2 ($n = 11$; $x \pm Sx$), а в случае аскорбата $-86,9 \pm 14,8$ mA/m^2 ($n = 7$; $x \pm Sx$).

Введение в пипеточный раствор блокатора анионных каналов 9-антраценкарбоновой кислоты (9-АЦ) приводило к ингибированию анионного тока до уровня, близкого к току, измеренному в случае глюконата. Таким образом, существовал компонент тока, неингибируемый 9-АЦ и опо-

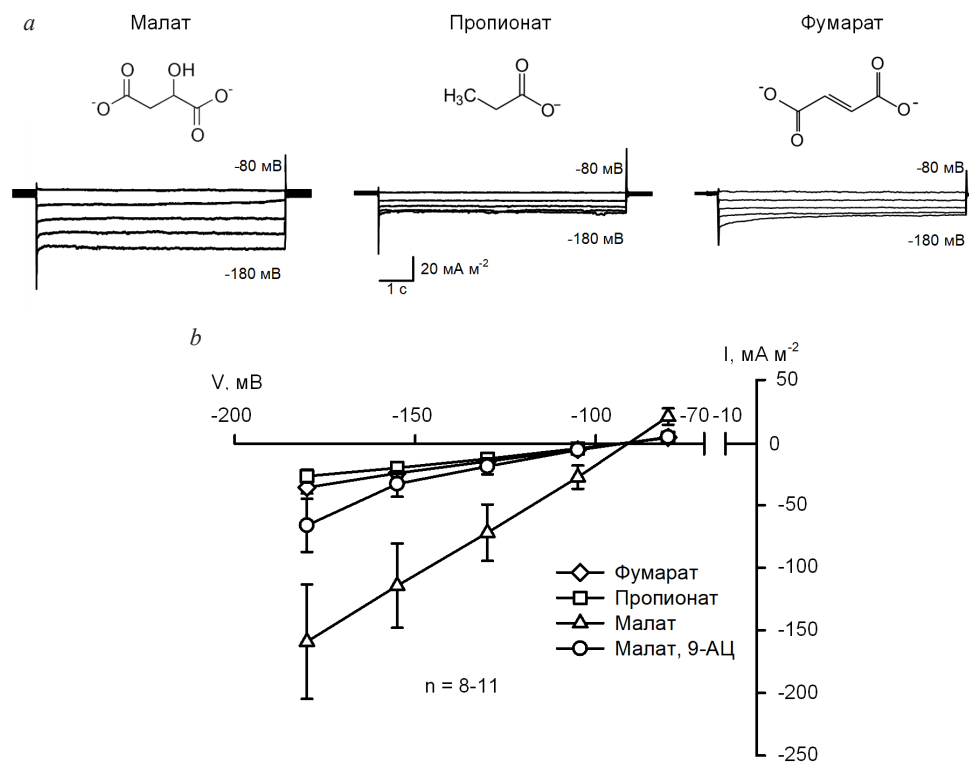


Рис. 2. Токи L-малата, пропионата и фумарата через плазматическую мембрану клеток корня *Arabidopsis thaliana*: *a* – типичные токовые кривые, полученные в ответ на прямоугольные импульсы напряжения в диапазоне от -80 до -180 мВ. В пипеточный раствор вводилось 40 мМ L-малата, пропионата или фумарата; *b* – вольт-амперные характеристики, полученные по средним значениям токов ($n = 8-11$; $x \pm Sx$). Наружный раствор: 20 мМ $CaCl_2$, 0,1 мМ $NaCl$, pH 6,0 (2 мМ Мес, 1 мМ Трис), 300 мОсм·кг⁻¹. Пипеточный раствор: 40 мМ $NaOH$, 40 мМ L-малата (пропионата или фумарата), 100 нМ Ca^{2+} (0,75 мМ 1,2-бис(о-аминофенокси)этан-N,N,N',N'-тетрауксусной кислоты, 0,3 мМ $CaCl_2$), pH 7,2 (10 мМ Трис). 1 мМ 9-АЦ вводился в данный раствор при ингибиторном анализе токов

Fig. 2. Currents of L-malate, propionate, and fumarate across the plasma membrane of *Arabidopsis thaliana* root cells: *a* – typical current curves obtained using a series of square voltage pulses (-80 to -180 mV) as a voltage-clamp protocol. L-malate, propionate and fumarate (40 mM) were added to the pipette solution; *b* – current-voltage curves, obtained from the average values of currents ($n = 8-11$; $x \pm Sx$). The standard bathing solution contained 20 mM $CaCl_2$, 0.1 mM $NaCl$, pH 6.0 (adjusted by 2 mM Mes, 1 mM Tris), 300 mOsm/kg (adjusted by D-sorbitol). The pipette solution contained the following salines: 40 mM $NaOH$, 40 mM L-malate, propionate or fumarate, 100 nM Ca^{2+} (0.75 mM 1,2-bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid, 0.3 mM $CaCl_2$), pH 7.2 (adjusted by 10 mM Tris), 300 mOsm/kg (adjusted by D-sorbitol). 9-anthracenecarboxylic acid was added into this solution during inhibitory analysis of currents (the corresponding curves are indicated in the legend)

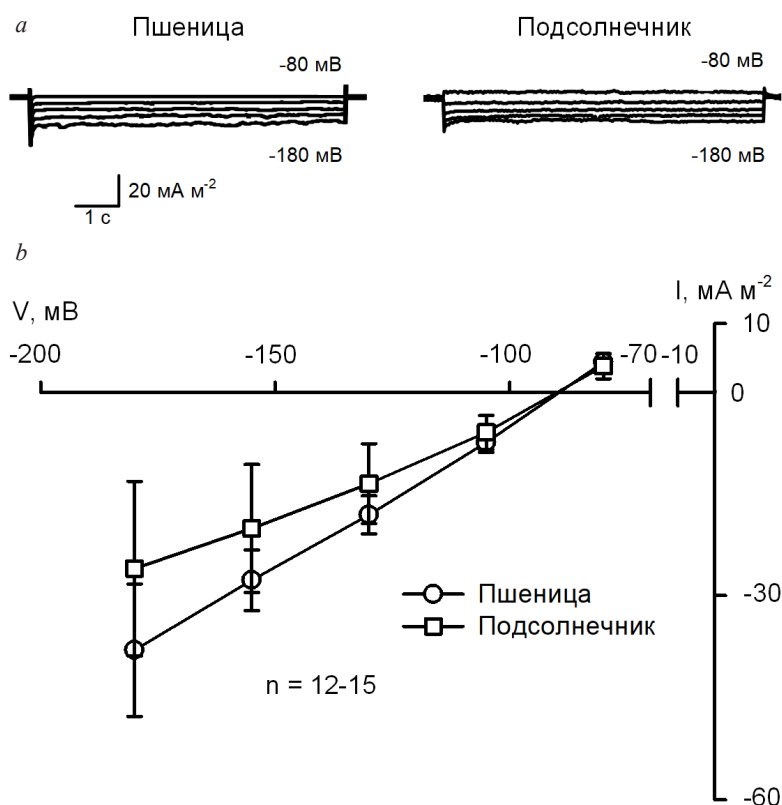


Рис. 3. Токи глюконата через плазматическую мембрану клеток корня *Triticum aestivum* и *Helianthus annuus*: *a* – типичные семейства токовых кривых, полученные при подаче прямоугольных импульсов напряжения на мембрану клеток корня *Triticum aestivum* и *Helianthus annuus* (левая и правая панели соответственно); *b* – вольт-амперные характеристики, полученные по средним значениям токов ($n = 12-15$; $x \pm Sx$). Наружный раствор: 20 мМ CaCl_2 , 0,3 мМ KCl , pH 6,0 (2 мМ Трис, 1 мМ Мес), 600 мОсм·кг⁻¹. Пипеточный раствор: 70 мМ K^+ -глюконата, 10 мМ KCl , 100 нМ Ca^{2+} (0,75 мМ 1,2-бис(о-аминофенокси)этан- N,N,N',N' -тетрауксусной кислоты, 0,3 мМ Ca^{2+}), pH 6,0 (2 мМ Трис, 1 мМ Мес)

Fig. 3. Gluconate currents across the plasma membrane of *Triticum aestivum* and *Helianthus annuus* root cells: *a* – typical membrane currents obtained by applying square voltage in *Triticum aestivum* and *Helianthus annuus* root protoplasts (left and right panels, respectively); *b* – current-voltage curves obtained from the average values of currents ($n = 12-15$; $x \pm Sx$). Bathing solution contained 20 mM CaCl_2 , 0.3 mM KCl , pH 6.0 (adjusted by 2 mM Mes, 1 mM Tris), 600 mOsm/kg (adjusted by D-sorbitol). The pipette solution contained 70 mM K^+ gluconate, 10 mM KCl , 100 nM Ca^{2+} (0.75 mM 1,2-bis(o-aminophenoxy)ethane- N,N,N',N' -tetraacetic acid, 0.3 mM Ca^{2+}), pH 6.0 (adjusted by 2 mM Tris and 1 mM Mes), 600 mOsm/kg (adjusted by D-sorbitol)

средуемый выходом анионов, таких как глюконат. Характеристики транспортной системы, опосредующей данный ток, требуют дальнейшего исследования.

Важно отметить высокую проводимость плазматической мембраны к аскорбату, что ранее не было отмечено другими исследователями. Чувствительность токов аскорбата к 9-АЦ (1 мМ) свидетельствует о том, что данные токи были опосредованы анионными каналами. В целом слабая потенциал-зависимость при быстрой кинетике активации, обнаруженная в настоящей работе, свойственна для описанных ранее у высших растений анионных каналов семейства ALMT и некоторых каналов семейств SLAC(H) [11]. Большинство представителей семейства ALMT экспрессируется в плазматической мембране клеток корня, в то время как каналы SLAC(H) экспрессируются главным образом в клетках листа. Каналы ALMT известны вовлечением в реакции выброса малата из клеток корня с целью связывания избытка Al^{3+} при закислении почв. Они также, вероятно, служат для загрузки углеводов в семена и их перераспределения в запасующих тканях растения [11].

В ходе представленного исследования также были проанализированы токи меньших по размерам органических анионов, таких как малат, пропионат и фумарат (рис. 2). В данном случае

наибольший ток при добавлении 40 мМ анионов в пипеточный раствор был зарегистрирован для малата ($-159,1 \pm 45,7$ мА/м² при -180 мВ; $n = 8$; $x \pm Sx$). Ниже по максимальной амплитуде были токи fumarата ($-36,0 \pm 4,7$ мА/м² при -180 мВ; $n = 11$; $x \pm Sx$) и пропионата ($-26,9 \pm 5,3$ мА/м² при -180 мВ; $n = 9$; $x \pm Sx$). Токи пропионата практически не отличались от токов глюконата (рис. 1), что указывает на возможное вовлечение одной транспортной системы в случае обоих анионов. Добавление 9-АЦ (1 мМ) в пипеточный раствор вызывало блокирование токов малата, однако в отличие от блока токов аскорбата данный эффект не был полным. По электрофизиологическим характеристикам токи малата, пропионата и fumarата не отличались от токов цитрата, аскорбата и глюконата. Интересным фактом являются сравнительно низкие значения токов fumarата. Ранее высокая избирательность к fumarату была отмечена для анионных каналов замыкающих клеток устьиц *Arabidopsis thaliana* [3]. При этом у замыкающих клеток устьиц fumarат-проницаемые каналы имели доминирующую времязависимую составляющую в отличие от каналов в корне, исследованных в настоящей работе, не проявивших существенной времязависимой кинетики активации (рис. 2).

Общепринятой практикой в биологии растений на сегодняшнее время является экстраполяция результатов, полученных на *Arabidopsis thaliana*, на другие высшие растения, включая сельскохозяйственные. В настоящей работе было проведено пилотное исследование проводимости к глюконату анионных каналов клеток корня пшеницы и подсолнечника (рис. 3). Согласно полученным данным токи глюконата у данных растений не отличались по основным электрофизиологическим характеристикам от аналогичных токов у арабидопсиса. Наблюдалась такая же низкая потенциал-зависимость и крайне высокая кинетика активации. Наличие схожей системы пассивного выхода анионов у *Arabidopsis thaliana*, *Triticum aestivum* и *Helianthus annuus* свидетельствует о схожем эволюционном происхождении ее у разных групп растений, а также о высоком потенциале использования арабидопсиса как модельного организма при исследовании анионных каналов. Важно также отметить, что ранее анионные токи у подсолнечника исследованы не были. Представленные записи являются первыми электрофизическими данными, раскрывающими работу ион-транспортных систем данного растения.

Согласно литературным данным, существует взаимосвязь между уровнями отдельных органических кислот, таких как малат, цитрат, аскорбат и сукцинат в апопласте и устойчивостью растений к стрессовым воздействиям, в частности, голоданию по фосфору, ультрафиолету, низким рН или токсическому влиянию Al^{3+} [2; 12; 13]. Помимо прямого протекторного влияния, как в случае связывания избытка Al^{3+} , влияние органических анионов может быть связано и с их сигнальным эффектом. Например, аскорбат, предположительно, может модифицировать редокс-превращения в апопласте, как в направлении антиоксидантного, так и прооксидантного действия [14]. В связи с этим представляло интерес протестировать воздействие важнейших органических анионов на центральный сигнальный феномен растительной клетки – волнообразное увеличение цитоплазматической активности ионов кальция ($[Ca^{2+}]_{цит}$). В представленной работе были использованы растения *Arabidopsis thaliana*, экспрессирующие экворин – люминесцирующий белок, отвечающий на увеличение уровня $[Ca^{2+}]_{цит}$ свечением в синей области спектра, которое может быть зарегистрировано и проанализировано [10]. В работе было протестировано влияние аскорбата, малата, цитрата и fumarата в концентрации 1, 10 и 30 мМ на изменение уровня $[Ca^{2+}]_{цит}$ в корнях *Arabidopsis thaliana* (рис. 4). Полученные данные показали, что в ответ на аскорбат наблюдалось временное повышение уровня $[Ca^{2+}]_{цит}$ для всех протестированных концентраций. В то же время для малата и цитрата рост $[Ca^{2+}]_{цит}$ был обнаружен только в случае концентрации 30 мМ, однако данный эффект носил необратимый характер (уровень $[Ca^{2+}]_{цит}$ не восстанавливался до исходных значений). Fumarат не вызывал статистически достоверного увеличения $[Ca^{2+}]_{цит}$.

Повышение уровня $[Ca^{2+}]_{цит}$ в ответ на введение в наружный раствор аскорбата имело волнообразную форму с одним пиком. Из данных, приведенных на рис. 4, b, следует, что 1 мМ аскорбат в наружном буферном растворе (10 мМ $CaCl_2$, рН 6,0) вызывал временное увеличение $[Ca^{2+}]_{цит}$ на $41,0 \pm 2$ нМ, что в 5,9 раз больше по сравнению с контролем ($[Ca^{2+}]_{цит} = 7,05 \pm 1,2$ нМ). В то же время аскорбат в концентрациях 10 и 30 мМ индуцировал увеличение $[Ca^{2+}]_{цит}$ на $147,6 \pm 12,8$

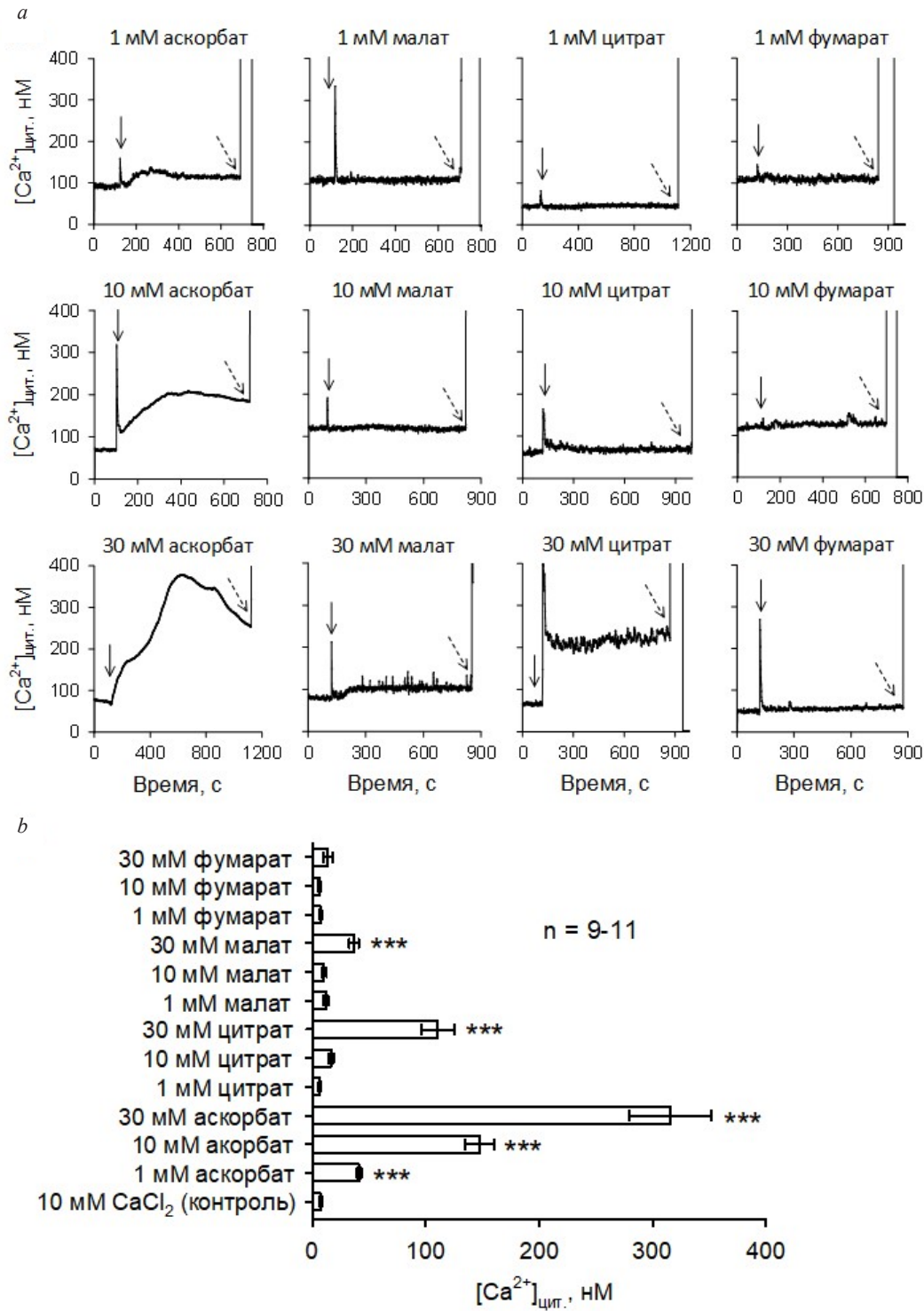


Рис. 4. Изменение цитоплазматической активности ионов кальция ($[Ca^{2+}]_{цит.}$) под действием органических анионов: *a* – типичные кривые временного хода изменения $[Ca^{2+}]_{цит.}$ при добавлении к корням *Arabidopsis thaliana* аскорбата, малата, цитрата и фумарата в концентрации 1, 10 и 30 мМ. Сплошной стрелкой обозначен момент введения в наружную среду органических анионов, пунктирной указан момент «гашения» экворина; *b* – средние пиковые значения повышения $[Ca^{2+}]_{цит.}$ в ответ на введение в среду органических анионов в различных концентрациях ($n = 9-11$; $x \pm Sx$). Наружный раствор во всех опытах содержал 10 мМ $CaCl_2$, pH 6,0 (Трис/Мес)

Fig. 4. The effect of organic acids (ascorbate, malate, citrate, fumarate) on the activity of cytosolic Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_{цит.}$) in *Arabidopsis thaliana* roots expressing aequorin: *a* – typical $[Ca^{2+}]_{цит.}$ transients induced by 1, 10 and 30 mM organic acids. Addition of organic anion: solid arrow; discharge: dashed arrow; *b* – mean peak $[Ca^{2+}]_{цит.}$ increase induced by different levels of organic anions ($n = 9-11$; $x \pm Sx$). The bathing solution in all tests contained 10 mM $CaCl_2$, pH 6.0 (Tris/Mes)

и $315,5 \pm 36,2$ нМ соответственно, что в 25 и 45 раз выше, чем в контроле. Уровень $[Ca^{2+}]_{цит}$ возвращался к исходному в течение 10–20 мин. Обнаруженные изменения $[Ca^{2+}]_{цит}$ были схожи с описанными ранее в литературе Ca^{2+} -сигналами в ответ на фитогормоны, регуляторные агенты и стрессовые воздействия [15]. Соответственно, можно предположить, что аскорбат-анион, выходящий во внеклеточную среду через ALMT-подобные анионные каналы, может выступать в качестве медиатора системы Ca^{2+} -сигнализации в тканях высших растений.

Закключение. Представленные данные показывают, что анионные каналы клеток корня высших растений обладают высокой проницаемостью к аскорбату, малату и цитрату. При этом их проницаемость к фумарату, пропионату и глюконату невысока. Анионные каналы клеток корня демонстрируют быструю кинетику активации, низкую зависимость от потенциала на мембране и высокую чувствительность к 9-АЦ, что указывает на то, что данные транспортные системы, вероятно, принадлежат к уникальному для высших растений семейству анионных каналов ALMT, вовлеченных в важнейшие физиологические процессы клетки. Высокая проницаемость анионных каналов к аскорбату ранее не была описана в литературе и может иметь большое значение как для развития фундаментальных представлений о физиологической роли данного аниона, так и для более глубокого понимания механизмов функционирования системы ионного обмена у высших растений.

Благодарности. Работа выполнена при поддержке БРФФИ (проекты Б19М-108, Б19КИТГ-006).

Acknowledgments. The work was sponsored by the Belarusian Republican Foundation for Fundamental Research (Projects Б19М-108, Б19КИТГ-006).

Список использованных источников

1. Organic acid metabolism in plants: from adaptive physiology to transgenic varieties for cultivation in extreme soils / J. López-Bucio [et al.] // *Plant Sci.* – 2000. – Vol. 160, N 1. – P. 1–13. [https://doi.org/10.1016/s0168-9452\(00\)00347-2](https://doi.org/10.1016/s0168-9452(00)00347-2)
2. Igamberdiev, A. U. Role of organic acids in the integration of cellular redox metabolism and mediation of redox signaling in photosynthetic tissues of higher plants / A. U. Igamberdiev, N. V. Bykova // *Free Radic. Biol. Med.* – 2018. – Vol. 122. – P. 74–85. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.01.016>
3. Malate transport by the vacuolar AtALMT6 channel in guard cells is subject to multiple regulation / S. Meyer [et al.] // *Plant Journal.* – 2011. – Vol. 67, N 2. – P. 247–257. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113x.2011.04587.x>
4. Root exudation of primary metabolites: mechanisms and their roles in plant responses to environmental stimuli / A. Canarini [et al.] // *Front. Plant Sci.* – 2019. – Vol. 10. – Art. 157. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00157>
5. Anion channels/transporters in plants: from molecular bases to regulatory networks / H'el'ene Barbier-Brygoo [et al.] // *Annu. Rev. Plant Biol.* – 2011. – Vol. 62, N 1. – P. 25–51. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042110-103741>
6. Hedrich, R. Biology of SLAC1-type anion channels – from nutrient uptake to stomatal closure / R. Hedrich, D. Geiger // *New Phytol.* – 2017. – Vol. 216, N 1. – P. 46–61. <https://doi.org/10.1111/nph.14685>
7. Cytosolic malate and oxaloacetate activate S-type anion channels in *Arabidopsis* guard cells / C. Wang [et al.] // *New Phytologist.* – 2018. – Vol. 220, N 1. – P. 178–186. <https://doi.org/10.1111/nph.15292>
8. Characterization of anion channels in the plasma membrane of *Arabidopsis* epidermal root cells and the identification of a citrate-permeable channel induced by phosphate starvation / E. Diatloff [et al.] // *Plant Physiol.* – 2004. – Vol. 136, N 4. – P. 4136–4149. <https://doi.org/10.1104/pp.104.046995>
9. Zhang, W-H. Citrate-permeable channels in the plasma membrane of cluster roots from white lupin / W-H. Zhang, P. R. Ryan, S. D. Tyerman // *Plant Physiology.* – 2004. – Vol. 136, N 4. – P. 3771–3783. <https://doi.org/10.1104/pp.104.046201>
10. Демидчик, В. В. Неселективные катионные каналы плазматической мембраны клеток корня высших растений / В. В. Демидчик. – Минск, 2014. – 172 с.
11. The ALMT family of organic acid transporters in plants and their involvement in detoxification and nutrient security / T. Sharma [et al.] // *Front. Plant Sci.* – 2016. – Vol. 7. – Art. 1488. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01488>
12. Miller, A. J. Cytosolic nitrate ion homeostasis: could it have a role in sensing nitrogen status? / A. J. Miller, S. J. Smith // *Annals of Botany.* – 2008. – Vol. 101, N 4. – P. 485–489. <https://doi.org/10.1093/aob/mcm313>
13. Lipton, D. S. Citrate, malate, and succinate concentration in exudates from p-sufficient and p-stressed *Medicago sativa* L. seedlings / D. S. Lipton, R. W. Blanchard, D. G. Blevins // *Plant Physiol.* – 1987. – Vol. 85, N 2. – P. 315–317. <https://doi.org/10.1104/pp.85.2.315>
14. Demidchik, V. Mechanisms of oxidative stress in plants: from classical chemistry to cell biology / V. Demidchik // *Environmental and experimental botany.* – 2015. – Vol. 109. – P. 212–228. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2014.06.021>
15. Calcium transport across plant membranes: mechanisms and functions / V. Demidchik [et al.] // *New Phytologist.* – 2018. – Vol. 220, N 1. – P. 49–69. <https://doi.org/10.1111/nph.15266>

References

1. López-Bucio J., Nieto-Jacobo M. F., Ramírez-Rodríguez V., Herrera-Estrella L. Organic acid metabolism in plants: from adaptive physiology to transgenic varieties for cultivation in extreme soils. *Plant Science*, 2000, vol. 160, no. 1, pp. 1–13. [https://doi.org/10.1016/s0168-9452\(00\)00347-2](https://doi.org/10.1016/s0168-9452(00)00347-2)

2. Igamberdiev A. U., Bykova N. V. Role of organic acids in the integration of cellular redox metabolism and mediation of redox signalling in photosynthetic tissues of higher plants. *Free Radical Biology and Medicine*, 2018, vol. 122, pp. 74–85. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.01.016>
3. Meyer S., Scholz-Starke J., De Angeli A., Kovermann P., Burla B., Gambale F., Martinoia E. Malate transport by the vacuolar AtALMT6 channel in guard cells is subject to multiple regulation. *Plant Journal*, 2011, vol. 67, no. 2, pp. 247–257. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313x.2011.04587.x>
4. Canarini A., Kaiser C., Merchant A., Richter A., Wanek W. Root exudation of primary metabolites: mechanisms and their roles in plant responses to environmental stimuli. *Frontiers in Plant Science*, 2019, vol. 10, art. 157. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00157>
5. Barbier-Brygoo H., De Angeli A., Filleur S., Frachisse J.-M., Gambale F., Thomine S., Wege S. Anion channels/transporters in plants: from molecular bases to regulatory networks. *Annual Review of Plant Biology*, 2011, vol. 62, no. 1, pp. 25–51. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042110-103741>
6. Hedrich R., Geiger D. Biology of SLAC1-type anion channels – from nutrient uptake to stomatal closure. *New Phytologist*, 2017, vol. 216, no. 1, pp. 46–61. <https://doi.org/10.1111/nph.14685>
7. Wang C., Zhang J., Wu J., Brodsky D. E., Schroeder J. I. Cytosolic malate and oxaloacetate activate S-type anion channels in *Arabidopsis* guard cells. *New Phytologist*, 2018, vol. 220, no. 1, pp. 178–186. <https://doi.org/10.1111/nph.15292>
8. Diatloff E., Roberts M., Sanders D., Roberts S. K. Characterization of anion channels in the plasma membrane of *Arabidopsis* epidermal root cells and the identification of a citrate-permeable channel induced by phosphate starvation. *Plant Physiology*, 2004, vol. 136, no. 4, pp. 4136–4149. <https://doi.org/10.1104/pp.104.046995>
9. Zhang W.-H., Ryan P. R., Tyerman S. D. Citrate-permeable channels in the plasma membrane of cluster roots from white lupin. *Plant Physiology*, 2004, vol. 136, no. 3, pp. 3771–3783. <https://doi.org/10.1104/pp.104.046201>
10. Demidchik V. Non-selective cationic channels of the plasma membrane of root cells of higher plants. Minsk, 2014. 172 p. (in Russian).
11. Sharma T., Dreyer I., Kochian L., Piñeros M. A. The ALMT family of organic acid transporters in plants and their involvement in detoxification and nutrient security. *Frontiers in Plant Science*, 2016, vol. 7, art. 1488. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01488>
12. Miller A. J., Smith S. J. Cytosolic nitrate ion homeostasis: could it have a role in sensing nitrogen status? *Annals of Botany*, 2008, vol. 101, no. 4, pp. 485–489. <https://doi.org/10.1093/aob/mcm313>
13. Lipton D. S., Blanchard R. W., Blevins D. G. Citrate, malate, and succinate concentration in exudates from p-sufficient and p-stressed *Medicago sativa* L. seedlings. *Plant Physiology*, 1987, vol. 85, no. 2, pp. 315–317. <https://doi.org/10.1104/pp.85.2.315>
14. Demidchik V. Mechanisms of oxidative stress in plants: from classical chemistry to cell biology. *Environmental and Experimental Botany*, 2015, vol. 109, pp. 212–228. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2014.06.021>
15. Demidchik V., Shabala S., Isayenkov S., Cui T. A., Pottosin I. Calcium transport across plant membranes: mechanisms and functions. *New Phytologist*, 2018, vol. 220, no. 1, pp. 49–69. <https://doi.org/10.1111/nph.15266>

Информация об авторах

Демидчик Вадим Викторович – д-р биол. наук, профессор, декан. Белорусский государственный университет (пр. Независимости, 4, 220030, Минск, Республика Беларусь). E-mail: dzemidchik@bsu.by.

Гриусевич Полина Вацлавовна – аспирант, мл. науч. сотрудник, ст. преподаватель. Белорусский государственный университет (пр. Независимости, 4, 220030, Минск, Республика Беларусь). E-mail: hryvusevich@bsu.by.

Войтехович Мария Аркадьевна – мл. науч. сотрудник, старший преподаватель. Белорусский государственный университет (пр. Независимости, 4, 220030, Минск, Республика Беларусь). E-mail: vaitsiakhovichm@bsu.by.

Толкачева Юлия Витальевна – студент. Белорусский государственный университет (пр. Независимости, 4, 220030, Минск, Республика Беларусь). E-mail: tolkachovajulia2020@gmail.com.

Куликович Александр Витальевич – студент. Белорусский государственный университет (пр. Независимости, 4, 220030, Минск, Республика Беларусь). E-mail: kulinkovichav@gmail.com.

Соколик Анатолий Иосифович – канд. биол. наук, доцент, заведующий лабораторией. Белорусский государственный университет (пр. Независимости, 4, 220030, Минск, Республика Беларусь). E-mail: sokolik@bsu.by.

Information about the authors

Demidchik Vadim V. – D. Sc. (Biology), Professor, Dean. Belarusian State University (4, Nezavisimosti Ave., 220030, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: dzemidchik@bsu.by.

Hryvusevich Palina V. – Postgraduate student, Junior researcher, Senior Lecture. Belarusian State University (4, Nezavisimosti Ave., 220030, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: hryvusevich@bsu.by.

Vaitsiakhovich Maryia A. – Junior researcher, Senior Lecture. Belarusian State University (4, Nezavisimosti Ave., 220030, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: vaitsiakhovichm@bsu.by.

Tolkachova Julia V. – Student. Belarusian State University (4, Nezavisimosti Ave., 220030, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: tolkachovajulia2020@gmail.com.

Kulinkovich Aliaksandr V. – Student. Belarusian State University (4, Nezavisimosti Ave., 220030, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: kulinkovichav@gmail.com.

Anatoliy Sokolik I. – Ph. D. (Biology), Associate professor, Head of the Laboratory. Belarusian State University (4, Nezavisimosti Ave., 220030, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: sokolik@bsu.by.