

РЕГУЛЯЦИЯ МЕТАБОЛИЗМА НИТРАТА С УЧАСТИЕМ СИСТЕМЫ ПОЛИКОМПАРТМЕНТАЦИИ АНИОНА В КОРНЯХ РАСТЕНИЙ

© 2000 г. Н.Д. Алехина, Е.В. Харитонашвили, Г.Ю. Ризниченко, Т.Ю. Плюснина, С.В. Сидоров*, А.Б. Рубин

Биологический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119899, Москва, Воробьевы горы;

*Институт текстильной индустрии, Москва

Поступила в редакцию 27.04.99 г.

Предложена новая концепция регуляции обмена нитрата посредством поликомпартаментации аниона в корне. На проростках пшеницы, выращенных при 25 и 12°C в зоне корней, исследованы поглощение нитрата, компартаментация и восстановление в корнях и транслокация в побеги. Показано, что нитрат корня компартиментирован в нескольких функциональных пулах: запасном, метаболическом и подвижном, предназначенном для перемещения в надземные органы. Нетто-поступление, отношение вход/выход (в/из корней), размер подвижного пула и транслокация изменяются в зависимости от температуры выращивания. Выявлены колебания скорости нетто-поглощения и концентрации нитрата в тканях, а также изменения этих колебаний под действием температуры. Эмпирическая модель регуляции базируется на том, что нетто-поступление посредством изменения соотношения вход/выход контролируется нитратом подвижного пула, размер которого зависит от оттока аниона в побеги. Математическая модель представляет собой систему линейных дифференциальных уравнений и после упрощения в соответствии с иерархией констант скоростей отдельных процессов сводится к системе двух дифференциальных уравнений, которая имеет на фазовой плоскости предельный цикл в определенной области значений параметров. Модель обосновывает регуляцию по принципу положительной обратной связи процесса транспорта нитрата из вновь поглощенного пула в транслокационный пул и его формирования в клетках коры корня. Модель воспроизводит явления, наблюдаемые экспериментально.

Ключевые слова: пулы нитрата, поглощение нитрата, колебания, компартиментальная регуляция, математическая модель.

Нитрат – основной источник азота для растений. Процессы поглощения нитрата и его усвоения зависят от внешних факторов среды и находятся под метаболическим и генным контролем [1–4]. Математические модели играют важную роль как инструмент анализа механизмов регуляции биологических процессов. При изучении нитратного обмена растений усилия математиков и биологов были сфокусированы, главным образом, на исследовании регуляции транспорта нитрата через плазмаллему клеток корня [5–9]. Использование короткоживущего изотопа азота ^{15}N позволило предложить модель, количественно описывающую изменение двух составляющих поглощения NO_3^- – вхо-

да/выхода в зависимости от путей метаболизма нитрата в тканях корня [6]. Другая модель воспроизводит динамику потоков нитрата через мембрану симпласта корней и регуляцию входа и выхода эндогенной концентрации нитрата и некоторыми аминокислотами [9].

Детальное исследование поглощения и усвоения нитрата на интактных растениях пшеницы в стационарном состоянии позволило выявить окологосовые колебания скорости поглощения нитрата и колебания концентрации нитрата в тканях корня, которые происходят в противофазе [7,10,11]. Предполагается, что обнаруженные колебания связаны с компартиментацией нитрата в тканях корня и отражают особенности механизма регуляции поглощения NO_3^- у растений в стационарном состоянии.

Результаты многолетних исследований поглощения и обмена нитрата у проростков пше-

Сокращения: НР – нитратредуктаза, МП – метаболический пул, ЗП – запасной пул, ПП – подвижный пул, НП – новопоглощенный пул, ТП – транслокационный пул, ЭР – эндоплазматический ретикулум.

ницы, обобщенные в схеме, позволили разработать принципиально новую кинетическую математическую модель регуляции поступления нитрата, демонстрирующую возможность осцилляции скорости поглощения и эндогенной концентрации [12]. Данная работа посвящена развитию предложенной модели и более глубокому анализу ее соответствия результатам физиологического исследования.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ДАННЫЕ И ЭМПИРИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ РЕГУЛЯЦИИ МЕТАБОЛИЗМА НИТРАТА В КОРНЯХ

Основные параметры, характеризующие использование нитрата растениями, представлены в таблице и на рис. 1. Исследование поглощения, восстановления, компартиментации и транслокации нитрата [3,7,10,11,13] выполнено на проростках пшеницы, выращенных на растворе питательной смеси при значениях температуры: 25/25°C или 25/12°C в зонах «надземные органы/корни». При проведении экспериментов соблюдались все условия (концентрация ионов в растворе, pH, температура, освещенность), которые были в период выращивания, и манипуляции с проростками были максимально щадящими. Таким образом, объектом изучения служили steady-state растения, в которых процессы обмена и их регуляция протекали в стационарном режиме.

При пониженной температуре поглощение нитрата уменьшается (таблица), что часто объясняют усилением выхода NO_3^- вследствие его накопления в тканях корня [2,5,9,11]. Оказалось, что у проростков, росших при 12°C в зоне корней, меняются оба потока: снижается вход и увеличивается выход (таблица). Впервые выявлено, что скорость поглощения NO_3^- ритмически меняется (рис. 1) и при температуре, равной 25°C, амплитуда колебаний (разница между минимальными и максимальными величинами) больше, чем при температуре 12°C [7,10,11]. Содержание нитрата в корнях при температуре 12°C возрастает, хотя его поглощение уменьшается (таблица). Определение концентрации нитрата в тканях параллельно с измерением скорости поглощения позволило обнаружить колебания эндогенной концентрации NO_3^- , которые происходят в противофазе со скоростью поглощения (рис. 1, [7,10]). Накопление нитрата в растении связано с компартиментацией аниона в клетках и тканях. Основная часть клеточного нитрата локализована в вакуоли и рассматривается как запасной пул (ЗП). Меньшая доля нитрата – метаболический

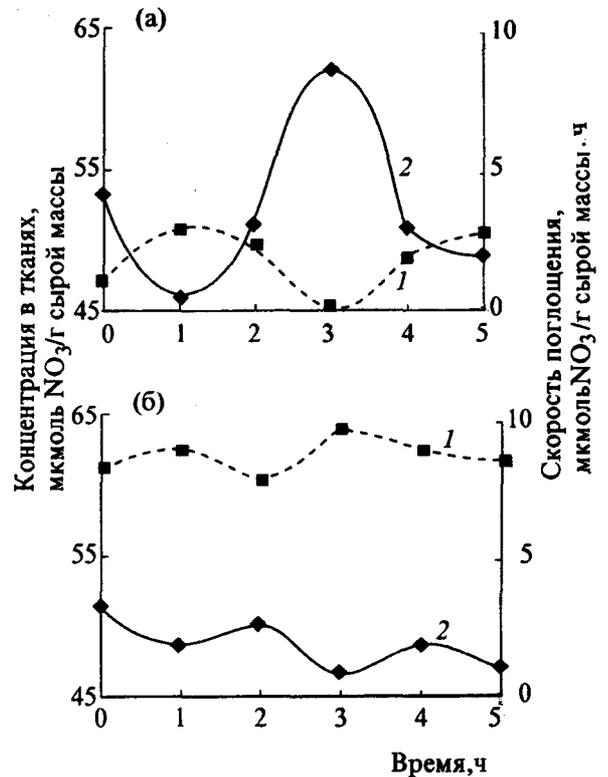


Рис. 1. Колебания скорости нетто-поглощения и эндогенной концентрации нитрата у корней пшеницы, растущей при температуре 25°C (а) и 12°C (б) в зоне корней [7,10]. 1 – концентрация в тканях; 2 – нетто-поглощение.

пул (МП) – присутствует в цитозоле [2,4,14] и служит субстратом для нитратредуктазы (НР) и для последующего усвоения N-NO_3^- . Но двухкомпартиментная схема (МП и ЗП) не отражает реального распределения NO_3^- в тканях корня, так как не учитывает нитрат, предназначенный для перемещения из корней в надземные органы [2,3,15,16]. Мы предложили понятие «подвижный пул» (ПП), чтобы выделить нитрат, радикально транспортируемый в ксилему и далее транслоцируемый в листья [3,12,16].

Размер ЗП не менялся в зависимости от температурных условий, так же как и очень небольшой размер МП, который оценивали на основе определения активности НР *in vivo* или по восстановлению $^{15}\text{NO}_3^-$ *in situ* (таблица). В корнях при пониженной температуре только ПП значительно увеличивается (таблица), и, следовательно, общее накопление нитрата в корнях при температуре 12°C связано с этим пулом [3,11]. Большая часть поглощенного растениями пшеницы нитрата перемещается из корней в листья [1,3]. При температуре, равной

Показатели обмена нитрата в корнях пшеницы, растущей при двух температурных режимах (нетто-поглощение, вход, выход, транслокация в побеги: мкмоль $\text{NO}_3/\text{г}$ сырой массы·ч; эндогенная концентрация и размеры пулов: мкмоль $\text{NO}_3/\text{г}$ сырой массы)

Полученные показатели	Вариант выращивания ($t^\circ\text{C}$ в зоне корней)		Литературный источник
	25	12	
Нетто-поглощение	3,81	1,93	[7,10,11]
Вход*	5,65	4,36	[3,7]
Выход	1,84	2,43	[7]
Концентрация в тканях	48,9	62,4	[3,10,11]
Запасной пул	21,6	21,6	[3,11]
Подвижной пул	26,0	40,0	[3,11]
МП** АНР***	1,1	0,8	[3,11,13]
	$^{15}\text{NO}_3$ редукция	0,9	0,9
Транслокация в побеги*	4,12	2,53	[3,11,13]

* Эти процессы были исследованы одновременно.

** Метаболический пул.

*** Активность нитратредуктазы.

12°C , скорость транслокации нитрата снижается (таблица) так, что уменьшение притока нитрата из корней в листья в середине дня становится фактором, ограничивающим усвоение нитрата в листьях [13]. Ингибирование оттока нитрата из корней приводит к его накоплению в тканях, точнее, в ПП корней. В итоге у проростков пшеницы при пониженной температуре уменьшается нетто-поглощение (таблица) и меняется характер колебательных процессов (рис. 1).

Результаты исследования (таблица, рис. 1) и сведения, полученные другими авторами [2,14,15,17,18], позволили разработать оригинальную эмпирическую схему регуляции усвоения нитрата, связывающую процессы поглощения и процессы распределения нитрата между функциональными и пространственными компартментами корней steady-state растений (рис. 2а). Транспорт нитрата в корни контролируется через соотношение потоков вход/выход. Доступность нитрата и сопутствующие катионы (K^+ , NH_4^+) принято считать основными внешними регуляторами потоков, а концентрацию

нитратов в тканях, НР и некоторые аминокислоты – главными эндогенными регуляторами поступления [1,2,5,8–10,15,18]. Предлагаемая компартментальная схема регуляции поступления и обмена нитрата (рис. 2) базируется на одноклеточной модели корня [3,4,19,20] и связывает температурозависимые изменения поглощения с ПП и рассматривает транслокацию нитрата из корней в побеги как этап, лимитирующий поглощение нитрата из среды [1,3]. Нитрат ЗП и МП не включен в регуляцию нетто-поглощения, поскольку размеры пулов не меняются в зависимости от температуры среды (таблица). Кроме того, нитрат в ЗП обновляется очень медленно [14,16,18], а размер МП очень мал. Очевидно, что у пшеницы, адаптированной к росту при разных температурных условиях, для регуляции входа и выхода NO_3 и поступления в целом имеют значение изменения размера ПП (таблица). Накопление или убыль нитрата в ПП являются следствием изменений в транслокации, и отсюда размер ПП определяется процессами радиального и ксилемного транспорта. К сожалению, механизмы дальнего транспорта ионов из корней в побеги и загрузки ксилемы еще не получили окончательного объяснения [4,17,20–22].

Схема регуляции (рис. 2а), базирующаяся на одноклеточной модели корня [4,19,20] и системе распределения нитрата между тремя функциональными пулами (МП, ЗП и ПП) [3,12], является упрощением реальной ситуации. Показано, что активность иона нитрата, связанного с цитозольным компартментом, выше в эпидермальных клетках корней ячменя, но концентрация нитрата выше в кортикальных клетках за счет накопления в вакуолях [23]. В цитозоле нитрат распределен между разными пространственными компартментами МП и ПП. Обосновывается, что эндоплазматический ретикулум (ЭР) может представлять структуру, где находится нитрат, предназначенный для транспорта в надземные органы [15,17,19]. ЭР соседних клеток связан через десмотрубочки плазмодесм клеточной стенки в единую сеть, которая может служить удобной магистралью для радиального переноса растворенных веществ. Кроме того, отдельные порции нитрата ПП помимо симпласта локализованы в апопласте (преимущественно в сосудах ксилемы, частично в кажущемся свободном пространстве коры и стели) [3,15,18,22]. В симпласте наряду с нитратом транслокационного пула, перемещающимся радиально от поверхности корня до ксилемы по системе ЭР [15], должен существовать пул, обеспечивающий выход нитрата из корня

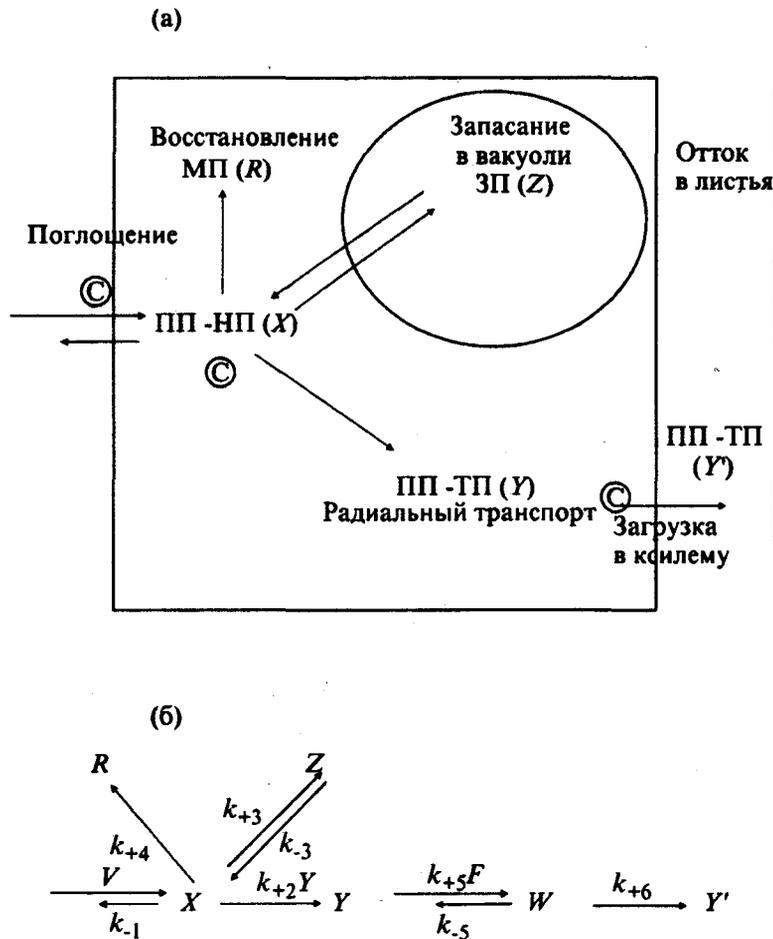


Рис. 2. Эмпирическая (а) и кинетическая (б) схемы регуляции поглощения нитрата, включающие поликомпар-
 тментацию и механизмы, контролирующие транспорт и транслокацию. Функциональные пулы на схеме (а)
 обозначены: МП (R) – метаболический; ЗП (Z) – запасной; ПП, разделенный на вновь поглощенный НП (X)
 и транслоцируемый ТП (Y). © – места контроля; стрелки указывают направление потоков. Обозначения на
 схеме (б): X (НП) – пул вновь поглощенного нитрата, переносимого из среды через плазмалемму; Y (ТП) – пул
 нитрата, транслоцируемый из корней в побег; Z (ЗП) – пул нитрата, запасенного в вакуоли; R (МП) – пул
 нитрата, восстанавливаемого нитратредуктазой (НР); F – переносчик, формирующий комплекс W с нитратом
 ТП и высвобождающий нитрат Y' в ксилему; V – константа скорости входа; k_{+i} , k_{-i} – константы скоростей
 соответствующих стадий трансформации нитрата.

в окружающую среду. Вероятно, выход нитрата в среду происходит из цитозоля эпидермальных клеток [15,18], из пула вновь поглощенного нитрата (НП). Нитрат из НП поступает также в МП и используется для пополнения и обновления ЗП. Поэтому в предложенной модели (рис. 2а) ПП распределен между двумя функциональными компартментами: ТП и НП. При изменении концентрации нитрата в ПП модифицируются потоки входа и выхода через плазмалемму, и динамическое взаимодействие компонентов системы проявляется через колебания скорости нетто-поглощения и концентрации нитрата в тканях (рис. 1).

Система регуляции поглощения нитрата у проростков пшеницы, адаптированных к температурным условиям, может быть представлена как последовательность взаимосвязанных событий, включающих поликомпар-
 тментацию и комплексную систему транспортных процессов, обеспечивающих транслокацию аниона в надземные органы (рис. 2а). Лимитирующим этапом в этой системе является перемещение нитрата из корней в надземные органы [3,11,13]. Обычно считается, что транслокация ионов из корней в побег регулируется на участке высвобождения ионов из симпласта в сосуды ксилемы [19,21,22]. Мы полагаем, что транспорт нитрата

через мембрану ЭР и формирование ТП в клетках коры может быть еще одним этапом, определяющим скорость транслокации (рис. 2а). Подобная локализация контролирующего механизма позволяет интегрировать потоки на плазмалемме, транслокацию и компартиментацию в единую систему регуляции поступления.

МАТЕМАТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ

Чтобы понять механизм регуляции процесса утилизации нитрата, включающий систему поликомпартиментации, была разработана математическая модель на базе схемы рис. 2а. В модели переменные X , Y , Z , R соответствуют концентрациям нитрата в НП, ТП, ЗП и МП соответственно (рис. 2а,б). Пул X обеспечивает выход нитрата из корня и обмен с МП и ЗП, а пул Y определяет взаимодействие с нитратом НП и скорость транслокации NO_3^- в надземные органы.

Кинетическая схема регуляции поглощения нитрата построена, исходя из данных исследования (таблица, рис. 1) и некоторых допущений, которые сводятся к следующему. 1. Скорость входа V в корни при данной температуре имеет постоянную константу, что соответствует условиям эксперимента, когда концентрация NO_3^- практически не меняется вследствие поглощения. 2. Выход из корней пропорционален концентрации нитрата в X и имеет константу скорости k_{-1} . 3. Обмен нитрата между X и Z пропорционален величине X , поскольку в соответствии с данными эксперимента цитозольный пул X намного меньше вакуолярного Z . Справедливость этого допущения подтверждается фактом медленного обмена нитрата в ЗП [14,18]. 4. Транспорт нитрата из симпласта в ксилему осуществляется переносчиком F согласно механизму Михаэлиса-Ментен [21]. 5. Перемещение нитрата X в Y регулируется по принципу положительной обратной связи. Такой тип автокаталитической регуляции с участием продукта реакции хорошо известен для некоторых метаболических процессов [25, 26].

В соответствии с изложенным выше можно записать следующую систему обыкновенных дифференциальных уравнений:

$$dX/dt = V - k_{-1}X - k_{+3}X + \quad (1a)$$

$$+ k_{-3}Z - k_{+4}X(R_0 - R) - k_{+2}XY,$$

$$dY/dt = k_{+2}XY - k_{+5}YF + k_{-5}W, \quad (1b)$$

$$dZ/dt = k_{+3}X - k_{-3}Z, \quad (1b)$$

$$dW/dt = k_{+5}YF - k_{-5}W - k_{+6}W, \quad (1g)$$

$$dR/dt = k_{+4}(R_0 - R)X, \quad (1d)$$

$$F + W = F_0, \quad (1e)$$

где R – концентрация нитрата в МП; R_0 – потенциальное количество нитрата, которое может быть восстановлено НР; F_0 – общая концентрация переносчика.

В системе протекают процессы трех временных масштабов: медленный обмен нитрата в Z ($t_{1/2} \approx 20$ ч для нитрата ЗП) [14], быстрые реакции восстановления нитрата и обмена в R ($t_{1/2} \approx 17$ мин [14] или 7,5 мин [18] для нитрата в МП) и процессы промежуточного временного диапазона, такие как колебания содержания и скорости поглощения нитрата в ПП (с периодом $\approx 1-2$ ч) (рис. 2).

Перейдем к безразмерным переменным:

$$x = X/K_M, y = Y/K_M,$$

$$\text{где } K_M = (k_{-5} + k_{+6})/k_{+5},$$

$$r = R/R_0, w = W/F_0, f = F/F_0, z = ZK_3/K_M,$$

$$\text{где } K_3 = k_{-3}/k_{+3}, \quad (2)$$

$$\tau = tF_0k_{+6}/K_M.$$

Величина константы Михаэлиса-Ментен K_M имеет тот же порядок, что и концентрация нитрата X и Y . Величины $k_{-3}K_M$ и F_0k_{+6} представляют собой скорости оттока нитрата из вакуоли и его потока в ксилему. Экспериментально установленное соотношение $k_{-3}K_M \ll F_0k_{+6}$ позволяет ввести малый параметр $\epsilon_1 = k_{-3}K_M/(F_0k_{+6})$. Концентрация переносчика представляет собой величину, значительно меньшую концентрации субстрата: $F_0 \ll K_M$, что позволяет ввести еще один малый параметр $\epsilon_2 = F_0/K_M$.

С учетом иерархии времен система безразмерных переменных примет вид:

$$\begin{aligned} dx/d\tau &= V/(F_0k_{+6}) - k_{-1}/(F_0k_{+6})x - \\ &- k_{+3}K_M/(F_0k_{+6})(x - z) - k_{+4}R_0K_M/(F_0k_{+6})x(1 - r) - \\ &- k_{+2}K_MK_M/(F_0k_{+6})xy, \end{aligned} \quad (3a)$$

$$dy/dt = k_{+2}K_M K_M / (F_0 k_{+6}) xy - k_{+5}K_M / k_{+6} yf + k_{-5} / k_{+6} w, \quad (3б)$$

$$dz/dt = \epsilon_1(x - z), \quad (3в)$$

$$\epsilon_2 dw/dt = k_{+5}K_M / k_{+6} (yf - w), \quad (3г)$$

$$\epsilon_2 dr/dt = k_{+4}K_M / k_{+6} (1 - r)x, \quad (3д)$$

$$f + w = 1. \quad (3е)$$

Уравнение (3в) содержит малый параметр ϵ_1 в правой части, в то время как уравнения (3г) и (3д) – малый параметр ϵ_2 в левой части. Это означает, что уравнение (3в) описывает наиболее медленные процессы, а уравнения (3г), (3д) – наиболее быстрые процессы в системе. При $\epsilon_1 \rightarrow 0$, получим уравнение $dz/dt = 0$ для медленной переменной z . Это означает, что $z = z_0 = \text{const}$. Совершив предельный переход в соответствии с теоремой Тихонова (при $\epsilon_1 \rightarrow 0$), получим алгебраические уравнения для быстрых переменных системы.

Введем безразмерные параметры:

$$v = (V + k_{+3}K_M z_0) / (F_0 k_{+6}),$$

$$k = (k_{-1}K_M + k_{+3}K_M) / (F_0 k_{+6}), \quad (4)$$

$$m = k_{+2}K_M / (F_0 k_{+6}).$$

Учитывая сделанные допущения и предельные переходы для быстрых и медленных переменных, получим редуцированную систему дифференциальных уравнений для переменных с «промежуточными» характерными временами.

$$\begin{aligned} dx/dt &= v - kx - mxy, \\ dy/dt &= mxy - y/(1 + y). \end{aligned} \quad (5)$$

Стационарные концентрации для системы (5)

$$\begin{aligned} x_c &= (v - 1)/(k - m), \\ y_c &= (v - k/m)/(1 - v). \end{aligned} \quad (6)$$

Для удобства аналитического исследования системы (5) введем параметр $p = \sqrt{(1 - v)^2(v - k/m)/(m(1 - k/m)^2)}$. Условие неустойчивости стационарного решения (6): $v < p^2$. Условием возникновения колебательного режима является выполнение неравенства: $(v + p)^2 <$

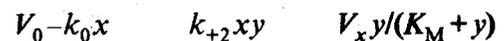
4р. Бифуркационная диаграмма системы (5) представлена на рис. 3; условия существования устойчивого предельного цикла выполнены в области I. Для сопоставления результатов вычислительных экспериментов (система уравнений (5)) с экспериментальными данными вернемся к размерным величинам, используя соотношение (4). Приходим к следующей системе:

$$dX/dt = V_0 - k_0X - k_{+2}XY,$$

$$dY/dt = k_{+2}XY - V_x Y / (K_M + Y), \quad (7)$$

где $V_0 = V + k_{-3}Z_c$ – общая константа скорости поступления нитрата из среды и вакуоли в X ; $k_0 = k_{-1} + k_{+3}$ – константа скорости выхода нитрата из НП в среду и транспорта в вакуоль; $V_x = k_{+6}F_0$ – максимальная возможная скорость потока в ксилему; $K_M = (k_{-5} + k_{+6})/k_{+5}$ – кажущаяся константа Михаэлиса – Ментен.

В соответствии с этим исходную схему рис. 2б можно представить в виде редуцированной схемы потока нитрата из внешней среды в корень и далее в ксилему



$$\Rightarrow X \Rightarrow Y \Rightarrow$$

Схема

Поскольку экспериментальные данные описывают колебания скорости нетто-поглощения и эндогенной концентрации нитрата в тканях корня (рис. 1), рассмотрим следующие переменные: $V_0 - k_0X$, которая соответствует нетто-поглощению нитрата и $X + Y$, соответствующую содержанию нитрата в ПП.

Результаты численного анализа системы дифференциальных уравнений (7) представлены на рис. 4. Проводя численные расчеты, мы подбирали параметры модели таким образом, чтобы получить качественное соответствие с экспериментальными кривыми (рис. 1), а именно уменьшение амплитуды колебаний при понижении температуры, которое сопровождается увеличением $(X + Y)$ и уменьшением уровня $(V - k_0X)$. Содержание нитрата оценивали по положению стационарной точки системы (7).

С процессами, исследуемыми в эксперименте при двух температурных режимах, в модели (7) могут быть сопоставлены два набора параметров для $V_0, k_0, k_{+2}, V_x, K_M$. Колебания скорости поступления нитрата $(V_0 - k_0X)$ и эндогенной концентрации нитрата $(X + Y)$ происходят почти в противофазе (рис. 4а,б). Кривые 1 соот-

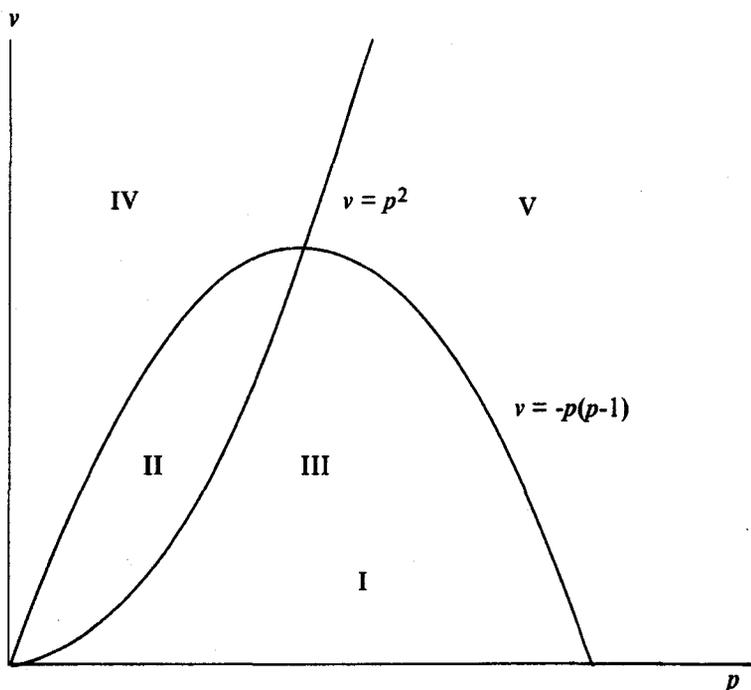


Рис. 3. Бифуркационная диаграмма для модели (5). Указаны границы областей с определенным типом поведения: I – предельный цикл; II – устойчивый фокус; III – неустойчивый фокус; IV – устойчивый узел; V – неустойчивый узел. По оси абсцисс – параметр p ($p = (1 - v)/(1 - k/m)\sqrt{(v - k/m)/(m - k)}$); по оси ординат – v (см. 4) Такой выбор координатных осей дает наиболее простое представление для границ областей бифуркационной диаграммы.

ветствуют экспериментальным данным, наблюдаемым при температуре 25°C , и описывают колебания с большей амплитудой. При температуре 12°C амплитуда колебаний уменьшается (кривые 2). При этой температуре по сравнению с температурой, равной 25°C , происходит изменение положения предельного цикла на фазовой плоскости (рис. 4в). Предельный цикл 2 смещен в сторону меньших значений величины $V_0 - k_0X$ (скорость нетто-поглощения нитрата в эксперименте) и в сторону больших значений величины $X+Y$ (нитрат ПП).

Модели процесса поглощения нитрата корнями, тем более те, где учитывается компартиментация нитрата, немногочисленны [6,18,21]. Они базируются в основном на экспериментальной оценке и расчете потоков нитрата и регуляции входа/выхода нитратом среды и тканей, или эндогенными аминокислотами. Эти модели представлены системой линейных дифференциальных уравнений. Их анализ дает экспоненциальную форму кривой насыщения нитратом тканей корня.

Разработанная нами математическая модель позволяет объяснить следующие основные эффекты, установленные в эксперименте: измене-

ние скорости нетто-поглощения нитрата, его эндогенной концентрации и размера пулов в зависимости от температурных условий; наличие колебаний скорости поглощения и концентрации нитрата в тканях; варьирование амплитуды колебаний в зависимости от температуры среды; изменения процесса транслокации нитрата из корней в надземные органы. Мы исходили также из косвенных свидетельств [2,3,15,18,23] обоснованности нашего вывода, что нитрат ПП компартиментирован в двух пространственных пулах – X (НП) и Y (ТП) (рис. 2а,б). Если радиальное перемещение нитрата происходит по ЭР [15,17,19], то барьером, разделяющим цитозольный ПП на два функционально разных пула, будет мембрана ЭР, а объектом регуляции распределения нитрата между этими компартаментами – система транспорта ЭР мембраны. Поглощенный нитрат переносится в ЭР клеток коры и, вероятно, основная часть аниона оказывается в ЭР уже в клетках эпидермиса [15,23]. Хотя механизм транспорта нитрата через мембрану ЭР неизвестен, очевидно, что этот перенос, как и транспорт нитрата через плазмалемму и тонопласт, требует затрат энергии, т.е. является активным

и контролируемым. Кроме того, есть основания полагать, что NO_3 транспортер мембраны ЭР (как и в тонопласте) сопряжен с АТФазой и регулируется нитратом цитозоля [2,4,27].

Анализ модели (рис. 2а,б, схема) показывает, что колебания скорости поглощения и эндогенного нитрата, как и их изменения при 25 и 12°C (рис. 1, 4а,б), могут быть адекватно математически описаны только, если транспорт через мембрану ЭР представить в виде системы нелинейных уравнений. Так как изменения основных переменных во времени являются периодическими, все потоки (нетто-поглощение, выход в среду и поток в ксилему) также меняются периодически. Такой тип описания подразумевает регуляцию системы по принципу положительной обратной связи [24–26], которая приводит к осцилляциям и в других метаболических системах. Так, на начальных стадиях гликолиза колебания скорости реакции фосфорилирования субстрата обусловлены аденилатным контролем активности фосфофруктокиназы по принципу положительной обратной связи [24]. Другой пример осцилляций – высвобождение кальция из внутриклеточных структур. Выход запускается возрастанием его цитозольной концентрации [25].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Организация метаболизма в пространстве и во времени основана на компартментации процессов, метаболических путей и соединений и перемещении метаболитов и веществ. Система управления посредством компартментации и изменения скоростей и направлений потоков действует наряду с другими известными типами регуляции (метаболической, генной, гормональной) [2,4,12,18].

Поликомпарментальная модель (рис. 2) регуляции обмена нитрата в корнях растений пшеницы, адаптированной к разным температурным режимам, базируется на следующем: 1 – наличии в тканях корня подвижного пула (ПП) и распределении его частей между разными структурами корня; 2 – тесной взаимосвязи между ПП и поглощением нитрата, что отражается в противофазности колебаний скорости поглощения и эндогенной концентрации нитрата; 3 – значительном изменении транслокации NO_3^- из корней в побег в зависимости от температуры среды; 4 – регуляции погло-

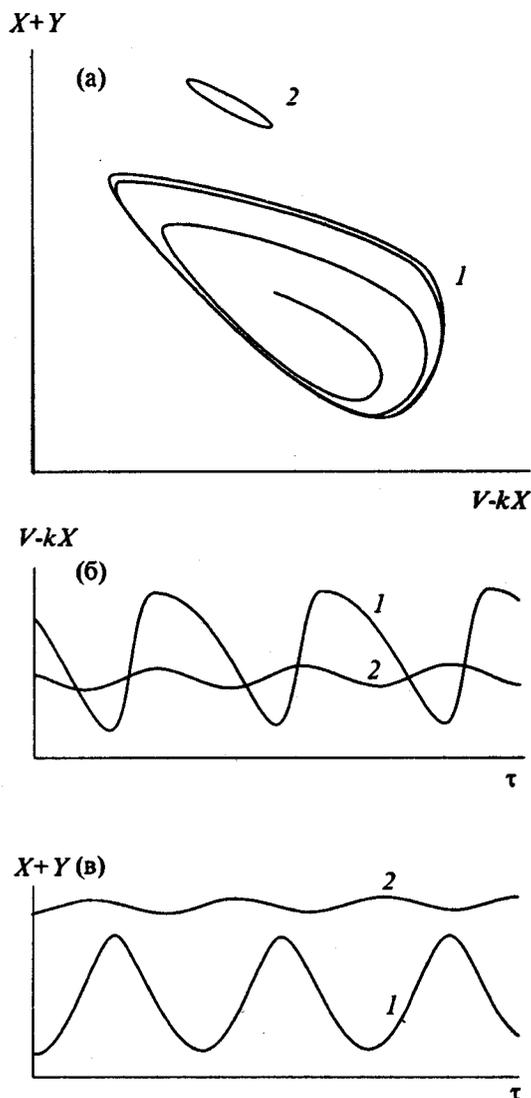


Рис. 4. Численное решение модельной системы (7), соответствующее двум температурным режимам. Кривые 1 соответствуют температуре 25°C; параметры модели: $V_0 = 38$; $k_0 = 0,5$; $k_{+2} = 0,7$; $V_x = 63$; $K_M = 3,8$. Кривые 2 соответствуют температуре 12°C; параметры модели: $V_0 = 50$; $k_0 = 0,8$; $k_{+2} = 0,43$; $V_x = 157$; $K_M = 12$. (а) – Фазовый портрет. По оси абсцисс – скорость нетто-поглощения нитрата ($V_0 - k_0 X$); по оси ординат – общая концентрация поглощенного нитрата ($X + Y$). (б) – Модельные кривые кинетики нетто-поглощения $V_0 - k_0 X$. (в) – Модельные кривые кинетики общей концентрации эндогенного нитрата ($X + Y$).

щения нитрата в сопряжении с системой транслокации.

По результатам исследований, обобщенным в модели (рис. 2), а также по дополнительным сведениям [2,3,12,15,16,18,23] можно предполо-

жить, что в корнях существует система функциональных, пространственно разделенных пулов нитрата: в симпласте – запасного, метаболического, новопоглощенного и транслокационного, и в апопласте – транслокационного. ТП апопласта представлен нитратом кислого сока и, очевидно, пулом свободного пространства клеток коры. Математическая модель подтверждает существование двух пулов: НП и ТП, вместе составляющих ПП, и их участие в регуляции поглощения NO_3^- . Имеется достаточно оснований полагать, что формирование симпластного ТП происходит в клетках коры, где вновь поглощенный нитрат перемещается в эндоплазматический ретикулум [15,19,23]. Модель демонстрирует, как с участием механизма регуляции по принципу положительной обратной связи возникают колебания концентрации нитрата в тканях корня и скорости поглощения и происходят изменения амплитуды колебаний в зависимости от температуры (рис. 1, рис. 4а,б). Обратная связь между двумя частями цитозольного ПП ответственна за повышение содержания эндогенного нитрата и увеличение его выхода в среду при низкой температуре (таблица).

Колебательный характер реакций и процессов обеспечивает корреляцию во времени между разными этапами, протекающими с разной скоростью одного процесса или между разными процессами. Колебания в таких системах, как рост coleoptily кукурузы и секреция ионов кальция из coleoptily [27], гликолитическая стадия дыхания [24], выход вторичного мессенджера (Ca^{2+}) в цитозоль [25], наконец, поглощение нитрата и изменение его концентрации в тканях корня (рис. 1) [7,10,11], иллюстрируют общность фундаментальных принципов регуляции в биологических системах.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, грант № 97-04-49477.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алехина Н.Д., Ключикова А.И. // Физиология растений. 1986. Т. 33, вып.2. С. 372.
2. Clarkson D.T. // Fundamental, Ecological and Agricultural Aspects of Nitrogen Metabolism in Higher Plants / Eds. H. Lambers, J.J. Neeteson, I. Stulen. Dordrecht, Boston, Lancaster: Martinus Nijhoff Publ., 1986. P. 3.
3. Alekhina N.D. // Root Ecology and its Practical Application / By ed. L. Kutschera et al. (Verein fur Wurzelforschung A-1992 Klagenfurt). 1992. P. 163.
4. Crawford N.M., Glass A.D.M. // Trends in Plant Sci. 1998. V. 3. P. 389.
5. Deane-Drummond C.E., Glass A.D.M. // Plant Physiol. 1983. V. 73. P. 100.
6. Presland M.R., McNaughton G.S. // J. Exp. Bot. 1984. V. 35. P. 1277.
7. Kharitonashvili E.V., Alekhina N.D. // Root Ecology and its Practical Application / By ed. L. Kutschera et al. (Verein fur Wurzelforschung A-1992 Klagenfurt). 1992. P. 49.
8. King B.J., Siddiqi M.Y., Ruth T.J., Warner R.L., Glass A.D.M. // Plant Physiol. 1993. V. 102. P. 1279.
9. Muller B., Tillard P., Touraine B. // Plant, Cell and Environment. 1995. V. 18. P. 1267.
10. Харитонашвили Е.В., Алехина Н.Д. // Физиология растений. 1986. Т. 33, вып. 2. С. 244.
11. Алехина Н.Д., Харитонашвили Е.В., Ключикова А.И. // Физиология растений. 1988. Т. 35, вып. 3. С. 303.
12. Харитонашвили Е.В., Лебедева Г.В., Плюснина Т.Ю., Ризниченко Г.Ю., Алехина Н.Д. // Физиология растений. 1997. Т. 44, № 4. С. 568.
13. Ключикова А.И., Алехина Н.Д. // Вестн. МГУ. 1983. Сер. 16. Биология. № 1. С. 35.
14. Deane-Drummond C.E., Glass A.D.M. // Plant Physiol. 1982. V. 70. P. 50.
15. Rufty T.W.Jr., Thomas J.F., Remmler J.L., Campbell W.H., Volk R.J. // Plant Physiol. 1986. V. 82. P. 675.
16. Харитонашвили Е.В., Черный С.Г., Алехина Н.Д. // Физиология растений. 1993. Т. 40, № 3. С. 443.
17. Гамалей Ю.В. Эндоплазматическая сеть растений. Происхождение, структура и функции. (53-е Тимирязевское чтение) Санкт-Петербург: БИН РАН, 1994. 80 с.
18. Kronzucker H.J., Glass A.D.M., Siddiqi M.Y. // Planta. 1995. V. 196. P. 683.
19. Clarkson D.T. // Solute Transport in Plant Cells and Tissues / By ed. D.A. Baker, Y.L. Hall. (Longman Scientific Technical). 1988. P. 586.
20. Pitman M.G. // Ann. Rev. Plant. Physiol. 1977. V. 28. P. 71.
21. Morgan M.A., Jackson W.A., Volk R.J. // J. Exp. Bot. 1985. V. 36. P. 859.
22. Wegner L.H., Raschke K. // Plant Physiol. 1994. V. 105. P. 799.
23. Zhen R.-G., Koyro H.-W., Leigh R.A., Tomos A.D., Miller A.J. // Planta. 1991. V. 185. P. 356.
24. Reich J.G., Selkov E.E. Energy Metabolism of Cell. 1981.
25. Goldbetter A., Dupont G., Berridge M.J. // Proc. Natl. Acad. Sci. Biophysics. USA. 1990. V. 87. P. 1461.
26. Ризниченко Г.Ю., Рубин А.Б. Математические модели биологических продукционных процессов. М.: Изд-во МГУ, 1993. 301 с.
27. Hedrich R., Schroeder J.I. // Annu. Rev. Plant. Physiol. 1989. V. 40. P. 539.
28. Маркова И.В., Катриченко М.И., Шевцов Ю.И., Батов А.Ю., Медведев С.С. // Физиология растений. 1997. Т. 44, № 6. С. 900.