
КЛЕТОЧНАЯ БИОЛОГИЯ И ФИЗИОЛОГИЯ

CELL BIOLOGY AND PHYSIOLOGY

УДК 577.352.46

ЭЛЕКТРОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ И РАДИОИЗОТОПНЫЙ АНАЛИЗ ПОТОКОВ ИОНОВ, ИНДУЦИРУЕМЫХ СОЛЕВЫМ И ОКИСЛИТЕЛЬНЫМ СТРЕССОМ, В КЛЕТКАХ КОРНЯ ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ

**В. В. САМОХИНА¹⁾, П. В. ГРИУСЕВИЧ¹⁾,
А. И. СОКОЛИК¹⁾, В. В. ДЕМИДЧИК¹⁾**

¹⁾Белорусский государственный университет, пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Беларусь

Под действием стресс-факторов среды активируется выход важнейших электролитов неорганической и органической природы из клеток корня во внешнее пространство. Данное явление описано для засоления, засухи, атаки патогенов, воздействия тяжелых металлов, окислительного стресса и др. Выход электролитов также наблюдается

Образец цитирования:

Самохина ВВ, Гриусевич ПВ, Соколик АИ, Демидчик ВВ. Электрофизиологический и радиоизотопный анализ потоков ионов, индуцируемых солевым и окислительным стрессом, в клетках корня высших растений. *Экспериментальная биология и биотехнология*. 2022;3:14–25. <https://doi.org/10.33581/2957-5060-2022-3-14-25>

For citation:

Samokhina VV, Hryvusevich PV, Sokolik AI, Demidchik VV. Electrophysiological and radioisotope analysis of ion fluxes induced by salt and oxidative stress in higher plant root cells. *Experimental Biology and Biotechnology*. 2022;3:14–25. Russian. <https://doi.org/10.33581/2957-5060-2022-3-14-25>

Авторы:

Вероника Валерьевна Самохина – старший преподаватель кафедры клеточной биологии и биоинженерии растений биологического факультета, научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории физиологии и биотехнологии растений.

Полина Вацлавовна Гриусевич – старший преподаватель кафедры клеточной биологии и биоинженерии растений биологического факультета, младший научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории физиологии и биотехнологии растений.

Анатолий Иосифович Соколик – кандидат биологических наук, доцент; заведующий научно-исследовательской лабораторией физиологии и биотехнологии растений кафедры клеточной биологии и биоинженерии растений биологического факультета.

Вадим Викторович Демидчик – член-корреспондент НАН Беларуси, доктор биологических наук, доцент; декан биологического факультета.

Authors:

Veranika V. Samokhina, senior lecturer at the department of plant cell biology and bioengineering, faculty of biology, and researcher at the laboratory of plant physiology and biotechnology.

samokhina@bsu.by

Palina V. Hryvusevich, senior lecturer at the department of plant cell biology and bioengineering, faculty of biology, and junior researcher at the laboratory of plant physiology and biotechnology.

hryvusevich@bsu.by

Anatoliy I. Sokolik, PhD (biology), docent; head of the laboratory of plant physiology and biotechnology, department of plant cell biology and bioengineering, faculty of biology.

sokolik@bsu.by

Vadim V. Demidchik, corresponding member of the National Academy of Sciences of Belarus, doctor of science (biology), docent; dean of the faculty of biology.

dzemidchik@bsu.by

в рамках некоторых процессов нормальной физиологии как часть гравитропического ответа, формирования полярности и роста клетки растяжением. Несмотря на длительное изучение данного феномена, его молекулярный механизм остается непонятным. В настоящем исследовании для изучения биофизической и молекулярной природы выхода ионов из клеток корня развит комплексный подход на основе метода меченых атомов (загрузка $^{86}\text{Rb}^+$ с последующей регистрацией параметров его выхода из клеток корня), реверсивной генетики и техники локальной фиксации потенциала на мембране. Продемонстрировано, что в корнях *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. выход K^+ при засолении и окислительном стрессе обеспечивается K^+ -каналами, кодируемыми геном *GORK* (*guard cell outward-rectifying K⁺ channel*), а выход органических анионов – анионными каналами, кодируемыми геном *ALMT1* (*aluminum-activated malate transporter 1*). Установлены особенности совместного функционирования данных систем при стрессе.

Ключевые слова: метод локальной фиксации потенциала; электрофизиология растений; радиоизотопный анализ; $^{86}\text{Rb}^+$; ионный канал; GORK; ALMT1.

Благодарность. Работа выполнена в рамках научно-исследовательского проекта «Характеризация пассивного транспорта органических анионов через плазматическую мембрану клеток корня высших растений» по гранту Министерства образования Республики Беларусь на 2022 г. (№ гос. регистрации 20220676), а также в рамках задания «Закономерности воздействия холодной плазмы на процессы клеточной сигнализации у высших растений» государственной программы научных исследований «Конвергенция-2025» (№ гос. регистрации 20211734).

Вклад авторов. В. В. Самохиной выполнен анализ выхода K^+ с использованием $^{86}\text{Rb}^+$ и написана часть работы, рассматривающая участие калиевых каналов GORK в стрессовых ответах у высших растений. П. В. Гриусевич проведена серия электрофизиологических тестов с помощью техники пэтч-кламп, а также написаны части статьи о молекулярной природе анионной и катионной проводимости. А. И. Соколик обеспечивал поддержку в проведении радиоизотопных тестов, приобретении изотопа, приготовлении изотопных растворов и расчете кинетических параметров выхода $^{86}\text{Rb}^+$. В. В. Демидчик осуществлял планирование экспериментов, подготовку растительного материала, анализ электрофизиологических данных и подготовку текста статьи.

ELECTROPHYSIOLOGICAL AND RADIOISOTOPE ANALYSIS OF ION FLUXES INDUCED BY SALT AND OXIDATIVE STRESS IN HIGHER PLANT ROOT CELLS

V. V. SAMOKHINA^a, P. V. HRYVUSEVICH^a,
A. I. SOKOLIK^a, V. V. DEMIDCHIK^a

^aBelarusian State University, 4 Niezaliežnasci Avenue, Minsk 220030, Belarus

Corresponding author: V. V. Demidchik (dzemidchik@bsu.by)

Environmental stresses induce the release of electrolytes from root cells into the extracellular space, including key inorganic and organic ions. This phenomenon is described for salinity, drought, attack of pathogens, exposure to heavy metals, oxidative stress, etc. The efflux of electrolytes is also observed during some processes of normal physiology, being part of the gravitropic response, the formation of polarity and the growth of the cell elongation. Despite the long study of this phenomenon, today its molecular mechanism remains unclear. In the present study, a combined approach based on the labeled atom method (loading isotope $^{86}\text{Rb}^+$ followed by recording the parameters of its efflux from root cells), reverse genetics and the patch-clamp technique has been developed for testing the biophysical and molecular nature of the efflux of electrolytes from the root cells. It has been demonstrated that in the roots of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., the K^+ efflux during salinisation and oxidative stress is catalysed by K^+ channels encoded by the *GORK* gene (*guard cell outward-rectifying K⁺ channel*), and the efflux of organic anions – by anion channels encoded by the *ALMT1* gene (*aluminum-activated malate transporter 1*). The characteristics of the combined functioning of these systems under stress have been established.

Keywords: patch-clamp; plant electrophysiology; radioisotope analysis; $^{86}\text{Rb}^+$; ion channel; GORK; ALMT1.

Acknowledgements. This study was supported as a part of the research project «Characterisation of the passive transport of organic anions across the plasma membrane of higher plant root cells» under a grant from the Ministry of Education of the Republic of Belarus for 2022 (No. 20220676), as well as within the framework of the assignment «Regularities of the impact of cold plasma on the processes of cell signaling in higher plants» of the state program of scientific research «Convergence-2025» (No. 20211734).

Author's contribution. V. V. Samokhina analysed K^+ efflux using $^{86}\text{Rb}^+$ and wrote a part of the work considering the participation of GORK potassium channels in stress responses in higher plants. P. V. Hryvusevich conducted a series of electrophysiological tests using the patch-clamp technique and also wrote parts of the article on the molecular nature of anion and cation conductivity. A. I. Sokolik provided support in carrying out radioisotope tests, isotope acquisition, preparation of isotope solutions, and calculation kinetic parameters of $^{86}\text{Rb}^+$ efflux. V. V. Demidchik carried out the planning of experiments, preparation of plant material, analysis of electrophysiological data and preparation of the article.

Введение

Активация выхода электролитов из клеток корня растений – важнейшая реакция, наблюдаемая в ходе ответа на большинство стрессовых факторов, а также в рамках ряда процессов нормальной физиологии [1]. Данное явление характерно для ранних стадий влияния засоления [2], засухи [3], тяжелых металлов [4], повышенной кислотности почвы [5], свободного алюминия [6], ультрафиолета [7], экстремальных температур [8], ксенобиотиков и разнообразных патогенов [9]. Оно описано практически для всех важнейших семейств высших растений и считается универсальной маркерной реакцией на стресс [2; 10–18].

Несмотря на хорошую изученность стрессиндуцированного выхода (оттока, или утечки) электролитов, все еще не ясно, какими конкретно механизмами он реализуется. Так, известно, что выходящий поток электролитов состоит главным образом из ионов K^+ и противоионов (анионов) [19–22]. Тем не менее информация о конкретных ионных транспортерах, вовлеченных в данное явление, крайне фрагментарна. В частности, неясны молекулярные механизмы, запускающие активацию ионных транспортеров в ответ на стрессовое воздействие.

Сильный стресс может приводить к критическому снижению уровня K^+ в клетке (до 5–10 ммоль/л) [1], что в зависимости от степени повреждения вызывает обратимую или необратимую потерю K^+ , ионный дисбаланс, автофагию и запрограммированную клеточную гибель [7]. Недавно установлено, что введение в среду блокаторов ионных каналов приводит к значительному снижению оттока K^+ и анионов. Это предполагает вовлечение ионных каналов плазматической мембраны (ПМ) в данную реакцию, т. е. указывает на регулируемый характер рассматриваемого феномена [2; 23].

В оттоке катионов может быть задействована значительная группа ионных каналов. На сегодняшний день идентифицированы следующие семейства K^+ -проницаемых катионных каналов высших растений: потенциалзависимые K^+ -селективные каналы (Shakers); тандемно-поровые каналы (TPK); ионотропные глутаматные рецепторы (GLR); каналы, активируемые циклическими нуклеотидами (CNGC); двупоровые каналы (TPC); механочувствительные каналы (MCA); механочувствительноподобные каналы (MSC); механочувствительные пьезоканалы (Piezo); аннексины (ANN); каналы, активируемые гиперосмоляльностью (OSCA) [1; 7; 24; 25]. В последние годы показано, что в транспортировке выходящего потока K^+ доминируют деполяризационно-активируемые K^+ -селективные каналы семейства Shakers [24] и потенциалнезависимые неселективные катионные каналы [26]. Калиевые каналы (K^+ -каналы), активируемые при положительном напряжении на мембране, обеспечивают выходящий поток K^+ в большинстве растительных клеток, однако пока не ясно, какова молекулярная природа модулирования их активности при стрессе [27; 28]. Одним из возможных механизмов является воздействие активных форм кислорода (АФК), которые накапливаются в тканях растения при стрессе [29]. В последние годы показано, что на присутствие в среде АФК способны реагировать два типа K^+ -каналов:

- SKOR (*stelar K^+ outward-rectifying channel*) – опосредует отток K^+ из клеток стелы корня в ксилему [30];
- GORK (*guard cell outward-rectifying K^+ channel*) – может катализировать отток K^+ из устьичных клеток [23]. Примечательно, что ген *GORK* также обильно экспрессируется в эпидермисе корня [1]. Данный канал рассматривается в качестве наиболее вероятной доминирующей K^+ -проводящей системы при стрессе.

Выходящий поток анионов у высших растений обеспечивают анионные каналы [31], представленные тремя семействами генов: *SLAC* (*slow anion channel*), *ALMT* (*aluminum-activated malate transporter*) и *CLC* (*chloride channel*) [31]. Каналы *CLC* напрямую не задействованы в выходе анионов из клеток, поскольку локализованы в эндомембранах [32]. Имеются работы, показывающие прямое вовлечение каналов *SLAC1* в отток анионов из замыкающих клеток устьиц [33; 34]. Каналы *ALMT1* считаются важнейшей системой, транспортирующей из клеток корня как неорганические, так и органические анионы [31; 35; 36]. Однако пока не получено доказательство их роли на генетическом уровне, так как не проведены тесты на нокаутных линиях по гену *ALMT1*. Кроме того, непонятно, какой спектр анионов, помимо неорганических, данные каналы транспортируют.

Цель настоящего исследования – установить роль ионных каналов *GORK* и *ALMT1* в обеспечении выходящих потоков катионов и анионов из клеток корня модельного вида *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. с использованием метода меченых атомов (анализ выхода $^{86}Rb^+$), реверсивной генетики и техники локальной фиксации потенциала (пэтч-кламп).

Материалы и методы исследования

Растительный материал, использованный в работе. Объектом исследования являлись 7–12-дневные проростки *A. thaliana* (L.) Heynh. следующих генотипов:

- WS-0 (экотип Wassilevskija);
- *gork1-1* (нокаутная линия по гену *GORK*);

- Col-0 (экотип Columbia-0);
- *almt1* (нокаутная линия по гену *ALMT1*).

Семена были предоставлены Ноттингемским фондовым центром арабидопсиса (*Nottingham Arabidopsis Stock Centre*, Великобритания). Растения *A. thaliana* (L.) Heynh. культивировались в стерильных условиях на поверхности среды Мурасиге и Скуга (*Duchefa Biochemie*, Нидерланды) с добавлением 1 % сахарозы и 0,35 % Phytigel™ (*Sigma-Aldrich*, США), pH титровался до уровня 6,0 с помощью KOH. Чашки Петри помещались в ростовую камеру с контролируруемыми условиями освещения (плотность светового потока 100 мкмоль фотонов в секунду на 1 м²) и световым режимом 16 ч света и 8 ч темноты при температуре 22 °С. Внешний вид 7-дневных проростков различных генотипов, выращенных в стерильной культуре, представлен на рис. 1. Растения не отличались по ростовым показателям, длина корней достигала 5–6 см у всех генотипов.

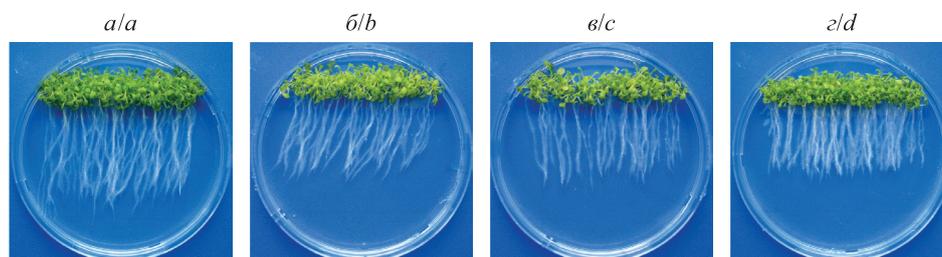


Рис. 1. Внешний вид проростков *A. thaliana* (L.) Heynh. различных генотипов, выращенных из семян в стерильной культуре на гелевой среде:
а – WS-0; б – *gork1-1*; в – Col-0; г – *almt1*

Fig. 1. Different genotypes of *A. thaliana* (L.) Heynh. seedlings grown from seeds in a sterile culture on gel medium:
а – WS-0; б – *gork1-1*; в – Col-0; г – *almt1*

Метод меченых атомов. В работе был использован изотоп $^{86}\text{Rb}^+$ (трейсер K^+), поставляемый фирмой-изготовителем (*POLATOM*, Польша) в форме хлорида. В связи с высоким периодом полураспада $^{86}\text{Rb}^+$ (18,6 дня) по сравнению с периодом полураспада $^{42}\text{K}^+$ (12 ч) данный трейсер применяется в качестве метки для изучения кинетики выхода K^+ [37]. Проростки закреплялись в специальных держателях и погружались в раствор состава 0,1 ммоль/л KCl, 0,1 ммоль/л CaCl₂ (уровень pH 6,0 фиксировался с помощью буферов Tris и MES (2 и 4 ммоль/л соответственно)), содержащий $^{86}\text{Rb}^+$. В течение 30 мин проростки загружались $^{86}\text{Rb}^+$, после чего переносились в раствор без изотопа. Далее определялся выход $^{86}\text{Rb}^+$. Остаточная активность проростков измерялась через определенные интервалы времени с помощью β-радиометра. Спустя 5 мин с момента начала регистрации выхода $^{86}\text{Rb}^+$ производилась обработка стрессорами, включая 200 ммоль/л NaCl, 10 ммоль/л H₂O₂ и смесь, генерирующую гидроксильные радикалы (1 ммоль/л CuCl₂, 1 ммоль/л L-аскорбата, 1 ммоль/л H₂O₂).

Анализ выходящего потока $^{86}\text{Rb}^+$ продемонстрировал наличие трех фаз – фазы I (до 5-й минуты), фазы II (с 5-й до 10-й минуты) и фазы III (с 10-й до 25-й минуты) (рис. 2).

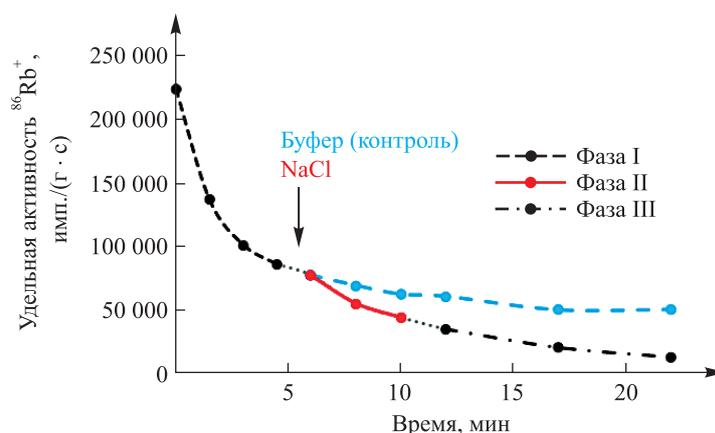


Рис. 2. Типичные кривые временного хода процесса выхода $^{86}\text{Rb}^+$ из корней *A. thaliana* (L.) Heynh. в контроле и под действием NaCl

Fig. 2. Typical time course curves of $^{86}\text{Rb}^+$ release from *A. thaliana* (L.) Heynh. roots in the control and in the presence of NaCl

Фаза I соответствовала выходу $^{86}\text{Rb}^+$ из клеточной стенки (апопласт). Фазы II и III были связаны с выходом $^{86}\text{Rb}^+$ из клеток корня (так называемый выход из симпласта).

По окончании эксперимента измерялась масса тестируемых корней и вычислялась удельная активность $^{86}\text{Rb}^+$, на основе которой рассчитывались значения скорости выхода $^{86}\text{Rb}^+$ для фазы II при обработке стрессорами. Далее определялись их соотношения со значениями скорости выхода в контрольных условиях.

Выделение протопластов. Протопласты изолировались из тканей корня ферментативным методом согласно ранее разработанным протоколам [10]. Использовался ферментативный раствор следующего состава: 1,5 % целлюлазы Onozuka™ RS (*Yakult Honsha*, Япония), 1 % целлюлозы (*Calbiochem*, Великобритания), 0,1 % пектолиазы Y-23 (*Yakult Honsha*), 0,1 % альбумина (*Sigma-Aldrich*), 2 ммоль/л KCl, 10 ммоль/л CaCl_2 , 1 ммоль/л MgCl_2 (уровень pH 5,8–6,0 фиксировался с помощью буферов Tris и MES (1 и 2 ммоль/л соответственно)). Осмоляльность всех растворов для работы в технике пэтч-кламп поддерживалась на уровне 300 мосмоль/кг добавлением D-сорбитола. После выделения протопласты содержались на льду, сохраняя жизнеспособность на протяжении 24 ч.

Регистрация и анализ ионных токов. Регистрация и анализ трансмембранных ионных токов выполнялись с применением техники пэтч-кламп [38]. Для создания гигаомной изоляции между специально изготовленной пэтч-пипеткой и ПМ протопласта использовался наружный раствор с высоким содержанием Ca^{2+} , состоящий из 20 ммоль/л CaCl_2 , 0,1 ммоль/л KCl или NaCl (уровень pH 6,0 фиксировался с помощью буферов Tris и MES (1 и 2 ммоль/л соответственно)). Гигаомный контакт достигался за счет создания импульса негативного давления в пэтч-пипетке. Регистрация токов проводилась в конфигурации «целая клетка» (*whole-cell mode*). Состав пипеточного раствора варьировался в зависимости от цели эксперимента (см. далее по тексту). Экспериментальные растворы фильтровались через бактериальный фильтр (*Millipore*, Великобритания). Диффузионный потенциал растворов рассчитывался с помощью компьютерной программы JPCalc (*SDR Scientific*, Австралия), активность ионов – с помощью компьютерной программы *Geochem-EZ* (США).

Ионные токи через ПМ регистрировались усилителем PC-ONE Patch/Whole Cell Clamp (Cornerstone Series) (*Dagan*, США) с использованием компьютеризированного аналого-цифрового преобразователя Digidata 1322A (*Molecular Devices*, США). Для анализа данных применялись компьютерные программы *Clampex 9.2* и *Clampfit 9.2* (*Molecular Devices*). Протоколами фиксации напряжения на мембране предусматривалась подача прямоугольных импульсов от –180 до +95 мВ (регистрация наружунаправленных K^+ -токов и внутрьнаправленных Ca^{2+} -токов) и от –180 до –80 мВ (регистрация наружунаправленных анионных токов) с шагом 25 мВ при потенциале фиксации –90 мВ. Электрофизиологическая система была установлена на антивибрационном столе Nexus (*Thorlabs*, США). Использовались инвертированный микроскоп IM-2F (*Carl Zeiss*, Германия), микропозиционер MP-85 (*Sutter Instrument*, США) и набор периферийных устройств Axon Instruments (*Axon Instruments*, США). Токковые кривые и вольт-амперные характеристики (BAX) анализировались с помощью компьютерной программы *SigmaPlot 10.0* (*Systat Software Inc.*, США).

Статистическая обработка. Для обработки полученных результатов применялись стандартные методы вариационной статистики. Основными статистическими характеристиками служили средняя арифметическая величина (\bar{X}), среднее квадратичное отклонение (σ) и ошибка средней величины (SE).

Результаты и их обсуждение

Регистрация скорости выходящего потока $^{86}\text{Rb}^+$. Одним из наименее инвазивных способов регистрации потока ионов является метод меченых атомов [39; 40]. В настоящей работе использовался меченый β -эмиттер $^{86}\text{Rb}^+$ – классический радиотрейсер K^+ . Применение рубидия было обусловлено его высоким сходством с K^+ по физико-химическим параметрам [39], а также тем, что ионтранспортные системы, обеспечивающие наружунаправленные потоки K^+ , проницаемы по отношению к $^{86}\text{Rb}^+$ [40].

При регистрации накопления $^{86}\text{Rb}^+$ в растении одновременно имеют место два потока – постоянный входящий и возрастающий выходящий. На рис. 3 и 4 представлены типичные кривые временного хода суммарного выхода $^{86}\text{Rb}^+$ из корней *A. thaliana* (L.) Heynh. дикого типа и нокаутов по K^+ -каналу GORK в контрольных условиях и при воздействии засоления и окислительного стресса. Инкубация проростков *A. thaliana* (L.) Heynh. в растворе с изотопом на протяжении 30 мин приводила к накоплению $^{86}\text{Rb}^+$ в тканях растений. Средняя удельная активность $^{86}\text{Rb}^+$ составила 600–800 тыс. имп./г · с). Выходящий поток $^{86}\text{Rb}^+$ включал фазу I (до 5-й минуты), фазу II (с 5-й до 10-й минуты) и фазу III (с 10-й до 25-й минуты). Фазы наружунаправленного потока $^{86}\text{Rb}^+$ были зарегистрированы в контрольных условиях, а также при добавлении стрессоров в отмывочный раствор. При стрессе наблюдалось увеличение скорости выхода $^{86}\text{Rb}^+$ из клеток корня *A. thaliana* (L.) Heynh. во время фазы II. Фокус настоящего исследования был направлен на данную «цитоплазматическую» фазу, так как ее кинетические параметры отражают

работу ионно-канальных систем. Для нее рассчитаны скорости выхода $^{86}\text{Rb}^+$ при обработке стрессорами и получены их соотношения со скоростью выхода в контрольных условиях (см. таблицу). В течение 2–4-й минуты (фаза I выхода) средняя удельная активность $^{86}\text{Rb}^+$ снижалась одинаково (в 3–4 раза, до уровня 200 тыс. имп./г · с) у *A. thaliana* (L.) Heynh. дикого типа и линии *gork1-1*, лишенной функционального наружувыврямляющего K^+ -канала GORK (см. рис. 3 и 4).

Установлено, что у растений *A. thaliana* (L.) Heynh. дикого типа выход $^{86}\text{Rb}^+$ под действием 200 ммоль/л NaCl ускорялся в 5,4 раза, под действием 1 ммоль/л CuCl_2 , 1 ммоль/л L-аскорбата, 1 ммоль/л H_2O_2 – в 3,2 раза, а под действием 10 ммоль/л H_2O_2 – в 2,6 раза (см. таблицу). Скорость стрессиндуцируемого выхода $^{86}\text{Rb}^+$ у нокаутных по K^+ -каналу растений *gork1-1* была почти в 2 раза ниже, что свидетельствует об участии K^+ -канала GORK в оттоке K^+ из корней *A. thaliana* (L.) Heynh. при стрессе.

Ранее выходящие потоки K^+ из тканей высших растений с использованием метода меченых атомов ($^{86}\text{Rb}^+$ как трэйсер K^+) были описаны для клеток корня *A. thaliana* (L.) Heynh., *Oryza sativa* L. и других видов [41–43]. В исследовании Ф. Жолдоса [43] отмечена массивная утечка K^+ ($^{86}\text{Rb}^+$) из корней *O. sativa* L. при обработке системным фунгицидом китазином ($1 \cdot 10^{-3}$ и $5 \cdot 10^{-4}$ моль/л). Было сделано предположение, что данное явление связано с нарушением целостности ПМ [43]. В лаборатории А. Мерфи установлено, что при воздействии Cu^{2+} наблюдается отток K^+ из корней арабидопсиса [41]. С использованием радиоизотопа $^{86}\text{Rb}^+$ также показано, что у линии *A. thaliana* (L.) Heynh. *akt-1* (K^+ -канал семейства Shakers, ответственный за вход K^+ в клетки корня высших растений) происходило снижение потоков K^+ в корнях, нарушение прорастания семян и замедление роста на фоне обеспеченности NH_4^+ [42]. Полученные в настоящем исследовании данные впервые указывают на конкретный тип ионных каналов, вовлеченных в наружунаправленный транспорт калия. Предположительно, канал GORK и канал АКТ-1 формируют единую систему для селективного выходящего и входящего потоков калия в корнях растений.

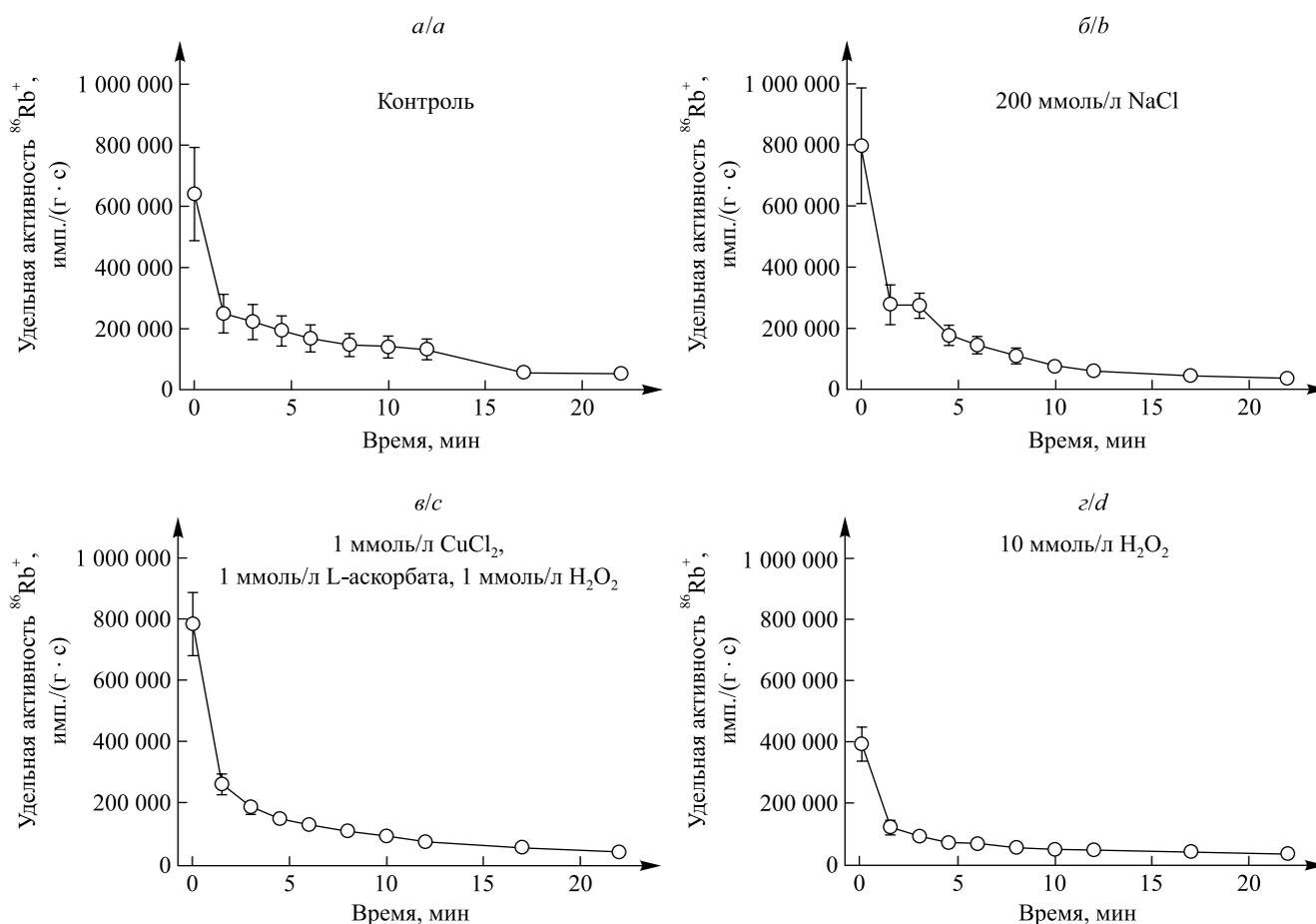


Рис. 3. Кривые временного хода процесса выхода $^{86}\text{Rb}^+$ ($n = 7-10$; $X \pm SE$) из корней *A. thaliana* (L.) Heynh. дикого типа (WS-0)

Fig. 3. Mean curves ($n = 7-10$; $X \pm SE$) of the time course of $^{86}\text{Rb}^+$ release from *A. thaliana* (L.) Heynh. roots of wild-type (WS-0)

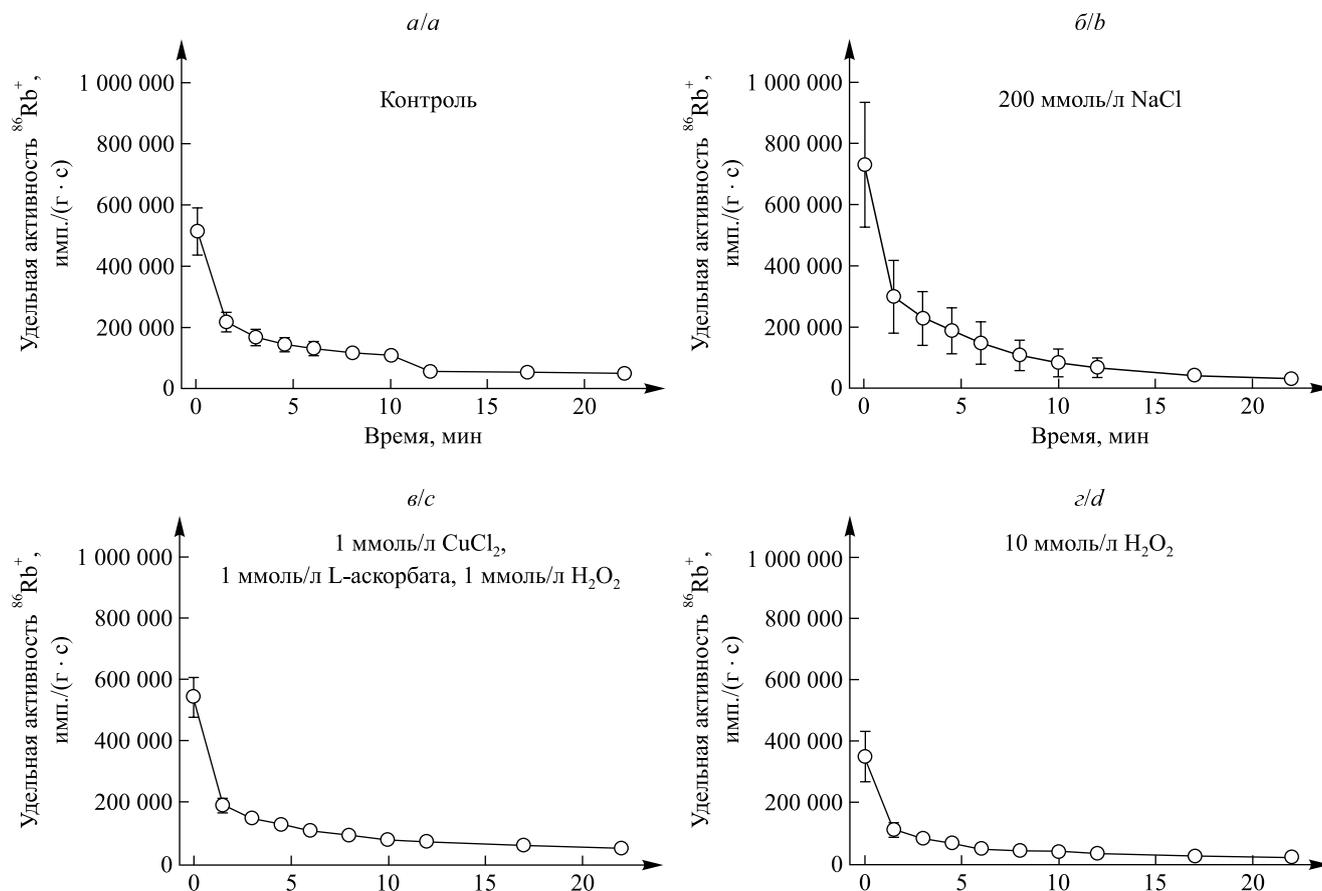


Рис. 4. Кривые временного хода процесса выхода $^{86}\text{Rb}^+$ ($n = 7-10$; $X \pm SE$) из корней *A. thaliana* (L.) Heynh. линии *gork1-1*
 Fig. 4. Mean curves ($n = 7-10$; $X \pm SE$) of the time course of $^{86}\text{Rb}^+$ release from *A. thaliana* (L.) Heynh. roots of *gork1-1* line

Средние значения скорости выхода $^{86}\text{Rb}^+$ из корней *A. thaliana* (L.) Heynh. дикого типа (WS-0) и линии *gork1-1*
Mean values of $^{86}\text{Rb}^+$ release rate from *A. thaliana* (L.) Heynh. roots of wild-type (WS-0) and *gork1-1* line

Состав растворов, которыми производилась обработка корней, загруженных $^{86}\text{Rb}^+$	Отношение скоростей, отн. ед. ($n = 8-10$; $X \pm SE$)	
	WS-0	<i>gork1-1</i>
200 ммоль/л NaCl	$5,4 \pm 0,5$	$3,3 \pm 0,5$
1 ммоль/л CuCl_2 , 1 ммоль/л L-аскорбата, 1 ммоль/л H_2O_2	$3,2 \pm 0,3$	$1,6 \pm 0,4$
10 ммоль/л H_2O_2	$2,6 \pm 0,5$	$1,2 \pm 0,4$

Анализ калиевых токов. В конфигурации «целая клетка» были зарегистрированы ионные токи через ПМ клеток корня *A. thaliana* (L.) Heynh. дикого типа (WS-0) при окислительном стрессе. В данной технике возможно задать уровень содержания ионов во внутриклеточном пространстве (пипеточный раствор) и снаружи клетки (наружный раствор). В настоящем исследовании в пипеточном растворе поддерживался высокий уровень K^+ (50 ммоль/л) для регистрации его оттока из клеток, а также высокий уровень глюконат-ионов (40 ммоль/л), плохо проникающих через ПМ, и Cl^- (10 ммоль/л (минимальная активность для обеспечения электрического контакта)).

Анализ выходящих ионных токов продемонстрировал наличие классических быстро и медленно активирующихся компонент в наружунаправленной проводимости ПМ. Типичные кривые токов через ПМ представлены на рис. 5.

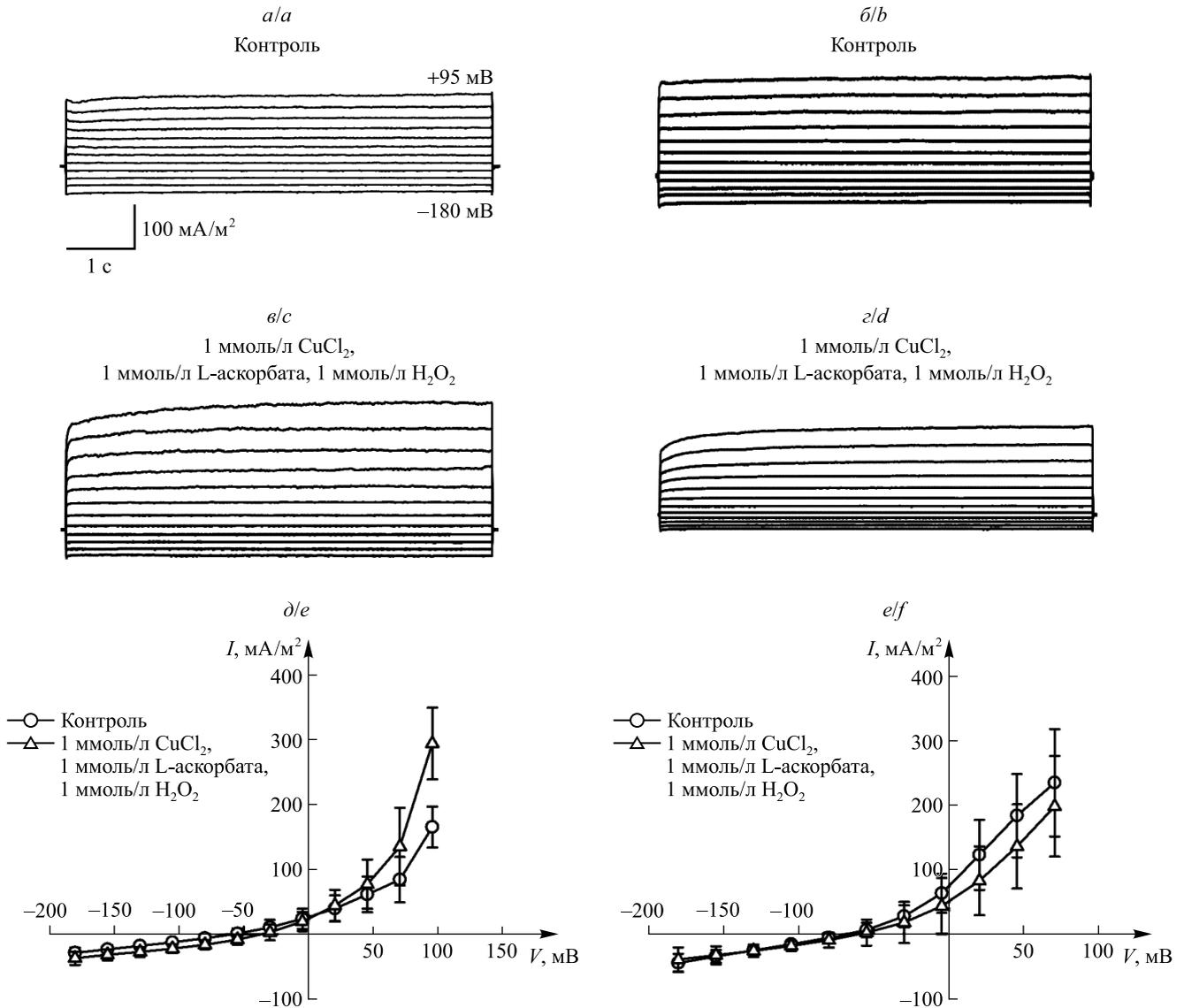


Рис. 5. Модификации ионных токов через ПМ протопластов, изолированных из клеток корня *A. thaliana* (L.) Heynh.: *a, в, д* – дикого типа (WS-0); *б, з, е* – линии *gork1-1*. Типичные токовые кривые, полученные в ответ на прямоугольные импульсы напряжения в диапазоне от -180 до $+95$ мВ (*a–z*), и ВАХ, построенные по средним значениям токов ($n = 5–6$; $X \pm SE$) (*д, е*). Наружный раствор – 20 ммоль/л CaCl_2 , $0,1$ ммоль/л KCl (рН $6,0$ (2 ммоль/л MES , 1 ммоль/л Tris), осмоляльность 300 мосмоль/кг). Пипеточный раствор – 40 ммоль/л K^+ -глюконата, 10 ммоль/л KCl , 100 нмоль/л Ca^{2+} ($0,75$ ммоль/л $1,2$ -бис(*o*-аминофенокси)этан- $\text{N},\text{N},\text{N}',\text{N}'$ -тетрауксусной кислоты, $0,3$ ммоль/л CaCl_2) (рН $7,2$ (2 ммоль/л MES , 1 ммоль/л Tris), осмоляльность 300 мосмоль/кг)

Fig. 5. Modifications of ion currents across the plasma membrane of *A. thaliana* (L.) Heynh. root cells in protoplasts isolated: *a, c, e* – from wild-type (WS-0); *b, d, f* – from *gork1-1* line. Typical current curves obtained using a series of square voltage pulses (from -180 to $+95$ mV) as a voltage-clamp protocol (*a–d*) and current-voltage curves obtained from the average values of currents ($n = 5–6$; $X \pm SE$) (*e, f*). The standard bathing solution contained 20 mmol/L CaCl_2 , 0.1 mmol/L KCl (pH 6.0 (2 mmol/L MES , 1 mmol/L Tris), osmolality 300 mosmol/kg). The pipette solution contained 40 mmol/L K^+ gluconate, 10 mmol/L KCl , 100 nmol/L Ca^{2+} (0.75 mmol/L $1,2$ -bis(*o*-aminophenoxy)ethane- $\text{N},\text{N},\text{N}',\text{N}'$ -tetraacetic acid, 0.3 mmol/L CaCl_2) (pH 7.2 (2 mmol/L MES , 1 mmol/L Tris), osmolality 300 mosmol/kg)

Введение в наружный раствор смеси, генерирующей гидроксильные радикалы (1 ммоль/л CuCl_2 , 1 ммоль/л L-аскорбата, 1 ммоль/л H_2O_2), приводило к увеличению медленно активирующейся компоненты выходящего тока и небольшому росту мгновенных токов (быстрой компоненты проводимости) во всех протестированных протопластах ($n = 5$; $X \pm \text{SE}$). Активация ионных токов наблюдалась в течение 15–20 мин с момента начала генерации HO^\bullet в наружном растворе (введения смеси, генерирующей гидроксильные радикалы). В контрольных условиях максимальная плотность ионного тока при деполяризации ПМ у растений *A. thaliana* (L.) Heynh. дикого типа составляла ($165,4 \pm 31,6$) mA/m^2 ($n = 6$; $X \pm \text{SE}$), воздействие HO^\bullet приводило к повышению плотности тока до ($294,3 \pm 55,3$) mA/m^2 ($n = 5$; $X \pm \text{SE}$). Наружунаправленная проводимость снижалась при замене калия на блокатор K^+ -каналов (30 ммоль/л ТЭА⁺) в составе пипеточного раствора. Полученные данные свидетельствуют о том, что в отток K^+ при воздействии HO^\bullet вовлечены ТЭА⁺-чувствительные K^+ -селективные каналы, которые, как было показано ранее, кодируются геном *GORK* и локализуются в ПМ клеток ризодермы высших растений [23]. В контрольных условиях зарегистрирована низкая внутрьнаправленная проводимость. Так как в наружном растворе поддерживался высокий уровень Ca^{2+} (20 ммоль/л), вероятно, данная проводимость была обусловлена входом Ca^{2+} в клетку. Введение в наружный раствор смеси, генерирующей гидроксильные радикалы, не вызывало изменение этой компоненты. Использование протокола регистрации ионных токов при высоком напряжении (более +90 мВ) приводило к нарушению гигаомного контакта в большинстве случаев (80 % протопластов).

Для установления группы ионных каналов, обеспечивающих отток K^+ при окислительном стрессе, была проведена серия электрофизиологических тестов на трансгенной линии *A. thaliana* (L.) Heynh. *gork1-1*, лишенной функционального наружувыпрямляющего K^+ -канала *GORK*. Анализ ионных токов через ПМ протопластов, выделенных из клеток корня *A. thaliana* (L.) Heynh. данной линии, в контрольных условиях продемонстрировал наличие только быстро активирующейся компоненты тока (отсутствие времязависимости наружунаправленных токов) (см. рис. 5). Редукция медленной части тока свидетельствует об отсутствии активности канала *GORK*. Мгновенная компонента тока, вероятно, была обусловлена активацией неселективных катионных каналов, ответственных за наружунаправленный поток K^+ . Введение в наружный раствор смеси, генерирующей гидроксильные радикалы, не приводило к модификации ионных токов через ПМ клеток корня арабидопсиса ($n = 5$; $X \pm \text{SE}$). В контрольных условиях максимальная плотность ионного тока при деполяризации ПМ у растений *A. thaliana* (L.) Heynh., нокаутных по гену *GORK*, составила ($234,1 \pm 83,2$) mA/m^2 ($n = 5$; $X \pm \text{SE}$), воздействие HO^\bullet приводило к снижению плотности тока до ($197,5 \pm 78,0$) mA/m^2 ($n = 5$; $X \pm \text{SE}$).

Полученные данные указывают на активацию каналов *GORK* под действием HO^\bullet . АФК-активируемые ионные каналы ранее были описаны в клетках корня *A. thaliana* (L.) Heynh. [44; 45], *Pisum sativum* L. [46], пыльцевой трубке *Pyrus pyrifolia* (Burm. f.) Nakai [47] и *Lilium longiflorum* Thunb. [48]. В настоящем исследовании, как и в более ранних работах других авторов, показано, что при воздействии АФК активируются две группы ионных токов – внутрьнаправленные Ca^{2+} -токи и наружунаправленные K^+ -токи [44]. Внутринаправленная проводимость характеризовалась низкой селективностью и потенциалнезависимостью. Наружунаправленная проводимость обладала высокой селективностью к K^+ , кинетика активации напоминала активацию Shakers-подобных K^+ -каналов [38]. Позднее было установлено, что для образования АФК и активации ионных каналов ПМ в апопластическом пространстве клеток корня в цикле Хабера – Вейса необходимы переходные металлы (Cu^{2+} или др.), L-аскорбиновая кислота и H_2O_2 [29].

Анализ анионных токов. В настоящем исследовании были зарегистрированы и проанализированы наружунаправленные токи L-малата из клеток корня *A. thaliana* (L.) Heynh. дикого типа (Col-0) и линии *almt1*, лишенной канала *ALMT1*. У растений дикого типа зарегистрированы быстро активирующиеся токи, характеризующиеся слабой зависимостью от потенциала на мембране и чувствительные к блокатору анионных каналов – 9-антраценкарбоновой кислоте (рис. 6). Максимальный ток через ПМ при гиперполяризации у растений дикого типа составил $-159,1 \text{ mA/m}^2$ ($n = 13$; $X \pm \text{SE}$). При этом малатный ток у линии *almt1* при подаче на мембрану напряжения -180 mV составил $-28,6 \text{ mA/m}^2$ ($n = 5$; $X \pm \text{SE}$).

Таким образом, в настоящей работе показано, что нокаутирование канала *ALMT1* приводит к снижению оттока малата из клеток корня высших растений. Ранее было продемонстрировано, что каналы *ALMT* обеспечивают выходящие потоки фумарата, цитрата, Cl^- , NO_3^- и других анионов из клеток растений [35; 36]. Вероятно, отток K^+ из клеток корня *A. thaliana* (L.) Heynh. через наружувыпрямляющие K^+ -каналы *GORK* происходит совместно с утечкой органических кислот (малат и др.) через каналы *ALMT1*.

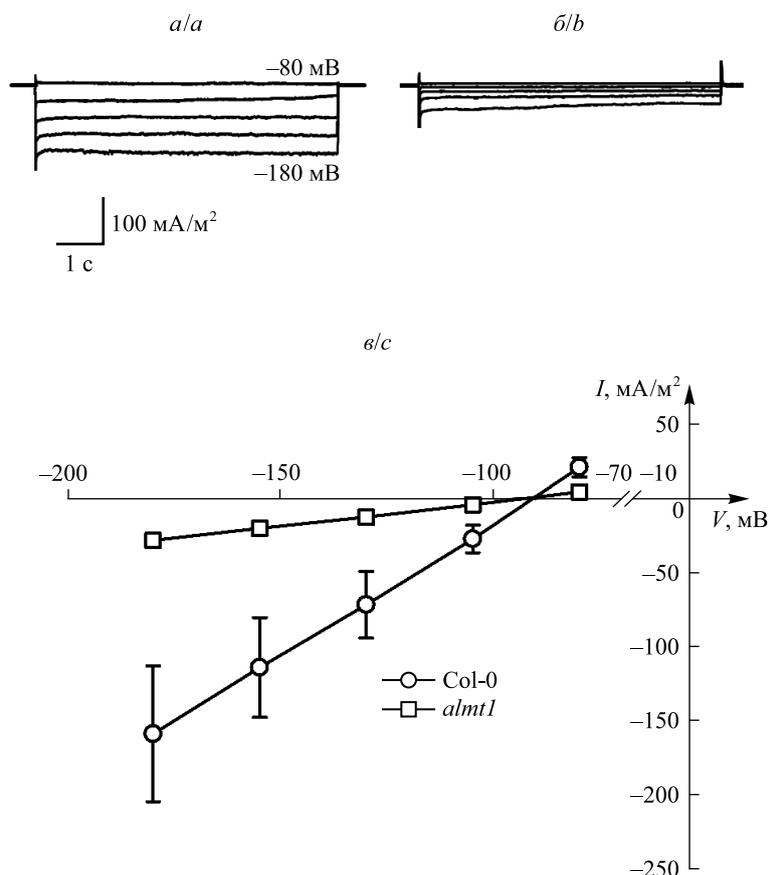


Рис. 6. Токи малата через ПМ клеток корня *A. thaliana* (L.) Heynh. дикого типа (Col-0) и линии *almt1*. Типичные токовые кривые, полученные в ответ на прямоугольные импульсы напряжения в диапазоне от -180 до -80 мВ (*a* – Col-0; *b* – *almt1*), и ВАХ, построенные по средним значениям токов ($n = 5-13$; $X \pm SE$) (*в*). Наружный раствор – 20 ммоль/л $CaCl_2$, $0,1$ ммоль/л $NaCl$ (рН 6,0 (2 ммоль/л MES, 1 ммоль/л Tris), осмоляльность 300 мосмоль/кг). Пипеточный раствор – 40 ммоль/л $NaOH$, 40 ммоль/л L-малата, 100 нмоль/л Ca^{2+} ($0,75$ ммоль/л 1,2-бис(*o*-аминофенокси)этан-N,N,N',N'-тетрауксусной кислоты, $0,3$ ммоль/л $CaCl_2$) (рН 7,2 (10 ммоль/л Tris), осмоляльность 300 мосмоль/кг)

Fig. 6. Malate currents across the plasma membrane of *A. thaliana* (L.) Heynh. root cells in protoplasts isolated from wild-type (Col-0) and *almt1* line. Typical current curves obtained using a series of square voltage pulses (from -180 to -80 mV) as a voltage-clamp protocol (*a* – Col-0; *b* – *almt1*) and current-voltage curves obtained from the average values of currents ($n = 5-13$; $X \pm SE$) (*c*). The standard bathing solution contained 20 mmol/L $CaCl_2$, 0.1 mmol/L $NaCl$ (pH 6.0 (2 mmol/L MES, 1 mmol/L Tris), osmolality 300 mosmol/kg). The pipette solution contained 40 mmol/L $NaOH$, 40 mmol/L L-malate, 100 nmol/L Ca^{2+} (0.75 mmol/L 1,2-bis(*o*-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid, 0.3 mmol/L $CaCl_2$) (pH 7.2 (10 mmol/L Tris), osmolality 300 mosmol/kg)

Заключение

В настоящем исследовании с использованием метода меченых атомов продемонстрировано, что обработка $NaCl$, HO^\bullet и H_2O_2 стимулирует выход K^+ ($^{86}Rb^+$) из клеток корня *A. thaliana* (L.) Heynh. Показано, что K^+ -канал GORK опосредует индуцированный $NaCl$, HO^\bullet и H_2O_2 выход K^+ из клеток корня, так как растения, нокаутные по данной транспортной системе, демонстрируют более медленную кинетику выхода $^{86}Rb^+$. С помощью техники пэтч-кламп получено подтверждение того, что K^+ -каналы GORK играют доминирующую роль в наружунаправленном токе K^+ из клеток корня *A. thaliana* (L.) Heynh. при окислительном стрессе. Установлено, что нокаутирование этого канала приводит к снижению выхода K^+ под действием АФК. Также в работе впервые получено экспериментальное (на основе электрофизиологических данных) доказательство того, что ионные каналы ALMT1 катализируют отток органических анионов (на примере малата) из клеток корня.

Библиографические ссылки/References

1. Demidchik V, Straltsova D, Medvedev SS, Pozhvanov GA, Sokolik A, Yurin V. Stress-induced electrolyte leakage: the role of K^+ -permeable channels and involvement in programmed cell death and metabolic adjustment. *Journal of Experimental Botany*. 2014; 65(5):1259–1270. DOI: 10.1093/jxb/eru004.
2. Shabala S, Demidchik V, Shabala L, Cuin TA, Smith SJ, Miller AJ, et al. Extracellular Ca^{2+} ameliorates NaCl-induced K^+ loss from *Arabidopsis* root and leaf cells by controlling plasma membrane K^+ -permeable channels. *Plant Physiology*. 2006;141(4):1653–1665. DOI: 10.1104/pp.106.082388.
3. Verma H, Devi K, Baruah AR, Sarma RN. Relationship of root aquaporin genes, *OsPIP1;3*, *OsPIP2;4*, *OsPIP2;5*, *OsTIP2;1* and *OsNIP2;1* expression with drought tolerance in rice. *The Indian Journal of Genetics and Plant Breeding*. 2020;80(1):50–57. DOI: 10.31742/IJGPB.80.1.6.
4. Murphy AS, Eisinger WR, Shaff JE, Kochian LV, Taiz L. Early copper-induced leakage of K^+ from *Arabidopsis* seedlings is mediated by ion channels and coupled to citrate efflux. *Plant Physiology*. 1999;121(4):1375–1382. DOI: 10.1104/pp.121.4.1375.
5. Holzer P. Acid-sensitive ion channels and receptors. In: Canning BJ, Spina D, editors. *Sensory nerves*. Dordrecht: Springer; 2009. p. 283–332 (Handbook of experimental pharmacology; volume 194). DOI: 10.1007/978-3-540-79090-7_9.
6. Bojórquez-Quintal E, Escalante-Magaña C, Echevarría-Machado I, Martínez-Estévez M. Aluminum, a friend or foe of higher plants in acid soils. *Frontiers in Plant Science*. 2017;8:01767. DOI: 10.3389/fpls.2017.01767.
7. Demidchik V, Tyutereva EV, Voitsekhovskaja OV. The role of ion disequilibrium in induction of root cell death and autophagy by environmental stresses. *Functional Plant Biology*. 2018;45(1–2):28–46. DOI: 10.1071/FP16380.
8. Cui Yongmei, Lu Shan, Li Zhan, Cheng Jiawen, Hu Peng, Zhu Tianquan, et al. Cyclic nucleotide-gated ion channels 14 and 16 promote tolerance to heat and chilling in rice. *Plant Physiology*. 2020;183(4):1794–1808. DOI: 10.1104/pp.20.00591.
9. Blatt MR, Grabov A, Brearley J, Hammond-Kosack K, Jones JDG. K^+ channels of *Cf-9* transgenic tobacco guard cells as targets for *Cladosporium fulvum* Avr9 elicitor-dependent signal transduction. *The Plant Journal*. 1999;19(4):453–462. DOI: 10.1046/j.1365-313x.1999.00534.x.
10. Demidchik V, Tester M. Sodium fluxes through nonselective cation channels in the plasma membrane of protoplasts from *Arabidopsis* roots. *Plant Physiology*. 2002;128(2):379–387. DOI: 10.1104/pp.010524.
11. Chen Z, Pottosin II, Cuin TA, Fuglsang AT, Tester M, Jha D, et al. Root plasma membrane transporters controlling K^+/Na^+ homeostasis in salt-stressed barley. *Plant Physiology*. 2007;145(4):1714–1725. DOI: 10.1104/pp.107.110262.
12. Hanin M, Ebel C, Ngom M, Laplace L, Masmoudi K. New insights on plant salt tolerance mechanisms and their potential use for breeding. *Frontiers in Plant Science*. 2016;7:01787. DOI: 10.3389/fpls.2016.01787.
13. Atkinson MM, Midland SL, Sims JJ, Keen NT. Syringolide 1 triggers Ca^{2+} influx, K^+ efflux, and extracellular alkalization in soybean cells carrying the disease-resistance gene *Rpg4*. *Plant Physiology*. 1996;112(1):297–302. DOI: 10.1104/pp.112.1.297.
14. Finlayson JE, Pritchard MK, Rimmer SR. Electrolyte leakage and storage decay of five carrot cultivars in response to infection by *Sclerotinia sclerotiorum*. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 1989;11(3):313–316. DOI: 10.1080/07060668909501119.
15. Kang H-M, Saltveit ME. Chilling tolerance of maize, cucumber and rice seedling leaves and roots are differentially affected by salicylic acid. *Physiologia Plantarum*. 2002;115(4):571–576. DOI: 10.1034/j.1399-3054.2002.1150411.x.
16. Biswas SK, Pandey NK, Rajik M. Inductions of defense response in tomato against *Fusarium wilt* through inorganic chemicals as inducers. *Journal of Plant Pathology & Microbiology*. 2012;3(4):128–135. DOI: 10.4172/2157-7471.1000128.
17. McKersie BD, Stinson RH. Effect of dehydration on leakage and membrane structure in *Lotus corniculatus* L. seeds. *Plant Physiology*. 1980;66(2):316–320. DOI: 10.1104/pp.66.2.316.
18. Becwar MR, Stanwood PC, Roos EE. Dehydration effects on imbibitional leakage from desiccation-sensitive seeds. *Plant Physiology*. 1982;69(5):1132–1135. DOI: 10.1104/pp.69.5.1132.
19. Bajji M, Kinet J-M, Lutts S. The use of the electrolyte leakage method for assessing cell membrane stability as a water stress tolerance test in durum wheat. *Plant Growth Regulation*. 2002;36(1):61–70. DOI: 10.1023/A:1014732714549.
20. Kashtoh H, Baek K-H. Structural and functional insights into the role of guard cell ion channels in abiotic stress-induced stomatal closure. *Plants*. 2021;10(12):2774. DOI: 10.3390/plants10122774.
21. Colcombet J, Mathieu Y, Peyronnet R, Agier N, Lelièvre F, Barbier-Brygoo H, et al. R-type anion channel activation is an essential step for ROS-dependent innate immune response in *Arabidopsis* suspension cells. *Functional Plant Biology*. 2009;36(9):832–843. DOI: 10.1071/FP09096.
22. Guo Wei, Wang Chengcheng, Zuo Zhangli, Qiu Jin-Long. The roles of anion channels in *Arabidopsis* immunity. *Plant Signaling & Behavior*. 2014;9(7):e29230. DOI: 10.4161/psb.29230.
23. Demidchik V, Cuin TA, Svistunenko D, Smith SJ, Miller AJ, Shabala S, et al. *Arabidopsis* root K^+ -efflux conductance activated by hydroxyl radicals: single-channel properties, genetic basis and involvement in stress-induced cell death. *Journal of Cell Science*. 2010;123(9):1468–1479. DOI: 10.1242/jcs.064352.
24. Demidchik V, Davenport RJ, Tester M. Nonselective cation channels in plants. *Annual Reviews of Plant Biology*. 2002;53:67–107. DOI: 10.1146/annurev.arplant.53.091901.161540.
25. Hedrich R. Ion channels in plants. *Physiological Reviews*. 2012;92(4):1777–1811. DOI: 10.1152/physrev.00038.2011.
26. Demidchik V, Maathuis FJM. Physiological roles of nonselective cation channels in plants: from salt stress to signalling and development. *New Phytologist*. 2007;175(3):387–404. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2007.02128.x.
27. Dreyer I, Uozumi N. Potassium channels in plant cells. *The FEBS Journal*. 2011;278(22):4293–4303. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2011.08371.x.
28. Demidchik V, Shabala S, Isayenkov S, Cuin TA, Pottosin I. Calcium transport across plant membranes: mechanisms and functions. *New Phytologist*. 2018;220(1):49–69. DOI: 10.1111/nph.15266.
29. Demidchik V. ROS-activated ion channels in plants: biophysical characteristics, physiological functions and molecular nature. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018;19(4):1263. DOI: 10.3390/ijms19041263.
30. Gaymard F, Pilot G, Lacombe B, Bouchez D, Bruneau D, Bouchez J, et al. Identification and disruption of a plant Shaker-like outward channel involved in K^+ release into the xylem sap. *Cell*. 1998;94(5):647–655. DOI: 10.1016/s0092-8674(00)81606-2.
31. Barbier-Brygoo H, De Angeli A, Filleur S, Frachisse J-M, Gambale F, Thomine S, et al. Anion channels/transporters in plants: from molecular bases to regulatory networks. *Annual Review of Plant Biology*. 2011;62:25–51. DOI: 10.1146/annurev-arplant-042110-103741.

32. Nedelyaeva OI, Shuvalov AV, Balnokin YuV. Chloride channels and transporters of the CLC family in plants. *Russian Journal of Plant Physiology*. 2020;67(5):767–784. DOI: 10.1134/S1021443720050106.
33. Linder B, Raschke K. A slow anion channel in guard cells, activating at large hyperpolarization, may be principal for stomatal closing. *FEBS Letters*. 1992;313(1):27–30. DOI: 10.1016/0014-5793(92)81176-m.
34. Vahisalu T, Kollist H, Wang Y-F, Nishimura N, Chan W-Y, Valerio G, et al. SLAC1 is required for plant guard cell S-type anion channel function in stomatal signaling. *Nature*. 2008;452(7186):487–491. DOI: 10.1038/nature06608.
35. Kovermann P, Meyer S, Hörtensteiner S, Picco C, Scholz-Starke J, Ravera S, et al. The *Arabidopsis* vacuolar malate channel is a member of the ALMT family. *The Plant Journal*. 2007;52(6):1169–1180. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2007.03367.x.
36. Meyer S, Scholz-Starke J, De Angeli A, Kovermann P, Burla B, Gambale F, et al. Malate transport by the vacuolar AtALMT6 channel in guard cells is subject to multiple regulation. *The Plant Journal*. 2011;67(2):247–257. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2011.04587.x.
37. Sim CC, Zaharah AR. Potassium uptake kinetics by oil palm root via radiotracer techniques. *Asian Journal of Plant Sciences*. 2014;13(4–8):195–197. DOI: 10.3923/ajps.2014.195.197.
38. Demidchik V. Characterisation of root plasma membrane Ca²⁺-permeable cation channels: techniques and basic concepts. In: Volkov AG, editor. *Plant electrophysiology: signaling and responses*. Heidelberg: Springer; 2012. p. 339–369. DOI: 10.1007/978-3-642-29110-4_14.
39. Läuchli A, Epstein E. Transport of potassium and rubidium in plant roots: the significance of calcium. *Plant Physiology*. 1970;45(5):639–641. DOI: 10.1104/pp.45.5.639.
40. Demidchik V. Mechanisms and physiological roles of K⁺ efflux from root cells. *Journal of Plant Physiology*. 2014;171(9):696–707. DOI: 10.1016/j.jplph.2014.01.015.
41. Murphy A, Taiz L. Correlation between potassium efflux and copper sensitivity in 10 *Arabidopsis* ecotypes. *New Phytologist*. 1997;136(2):211–222. DOI: 10.1046/j.1469-8137.1997.00738.x.
42. Lebaudy A, Véry A-A, Sentenac H. K⁺ channel activity in plants: genes, regulations and functions. *FEBS Letters*. 2007;581(12):2357–2366. DOI: 10.1016/j.febslet.2007.03.058.
43. Zsoldos F. Uptake and efflux of ions in fungicide-treated rice plants. *Plant and Soil*. 1974;41(1):41–49.
44. Demidchik V, Shabala SN, Coutts KB, Tester MA, Davies JM. Free oxygen radicals regulate plasma membrane Ca²⁺- and K⁺-permeable channels in plant root cells. *Journal of Cell Science*. 2003;116(1):81–88. DOI: 10.1242/jcs.00201.
45. Foreman J, Demidchik V, Bothwell JHF, Mylona P, Miedema H, Torres MA, et al. Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature*. 2003;422(6930):442–446. DOI: 10.1038/nature01485.
46. Zepeda-Jazo I, Velarde-Buendía AM, Enríquez-Figueroa R, Bose J, Shabala S, Muñiz-Murguía J, et al. Polyamines interact with hydroxyl radicals in activating Ca²⁺ and K⁺ transport across the root epidermal plasma membranes. *Plant Physiology*. 2011;157(4):2167–2180. DOI: 10.1104/pp.111.179671.
47. Wu H, Shabala L, Zhou M, Shabala S. Chloroplast-generated ROS dominate NaCl induced K⁺ efflux in wheat leaf mesophyll. *Plant Signaling & Behavior*. 2015;10(5):e1013793. DOI: 10.1080/15592324.2015.1013793.
48. Breygina MA, Abramochkin DV, Maksimov NM, Yermakov IP. Hydrogen peroxide affects ion channels in lily pollen grain protoplasts. *Plant Biology*. 2016;18(5):761–767. DOI: 10.1111/plb.12470.

Получена 21.06.2022 / исправлена 24.06.2022 / принята 24.06.2022.
Received 21.06.2022 / revised 24.06.2022 / accepted 24.06.2022.