

Ф. Д. САМУИЛОВ, Е. А. НИКИФОРОВ, В. И. НИКИФОРОВА

ИССЛЕДОВАНИЕ СОСТОЯНИЯ ВОДЫ В ТКАНЯХ РАСТЕНИЙ МЕТОДОМ ЯДЕРНОГО СПИНОВОГО ЭХА

(Представлено академиком А. Л. Курсановым 6 III 1970)

В вопросе о состоянии воды в биологических системах в настоящее время существуют два различных представления. Одни исследователи считают, что вода и макромолекулы составляют в биологических системах единую упорядоченную систему, т. е. исходят из возможности дальнейшей упорядоченности воды (¹⁻⁶). Другие отрицают возможность дальнейшей упорядоченности воды в биосистемах и считают, что лишь малая часть внутриклеточной воды «связана» за счет гидратации и отличается по своим свойствам от обычной воды (⁷⁻¹³). Исследования состояния воды в растениях, проведенные методом ядерного магнитного резонанса (^{12, 13}), привели к представлению о том, что количество связанной (гидратной) воды в клетках незначительно, что почти вся вода в клетках представлена свободной водой и не отличается от воды *in vitro*. В результате опытов с тяжелой водой была установлена быстрая взаимообмениваемость различных фракций воды в клетке (^{14, 15}), что подтвердили также исследования методами ядерного магнитного резонанса и диэлектрической спектроскопии.

Поскольку максимальное время пребывания молекул в гидратных слоях ионов составляет лишь 10^{-4} сек. (¹⁶), экспериментальное определение и изучение различных фракций воды в тканях растений представляет большие трудности.

В настоящей работе для характеристики состояния воды в тканях растений определяли время спин-решеточной релаксации T_1 протонов воды. Измерение T_1 проводили на установке ядерного спинового эха в лаборатории физики Казанского педагогического института (¹⁷). Опыты проводились на растениях кукурузы, выращенных в гравийной культуре на питательном растворе Чеснокова и Базыриной.

Время T_1 измеряли с применением последовательности $\frac{\pi}{2}, \frac{\pi}{2}, \pi$ -импульсов (¹⁸). Зависимость амплитуды эха A от τ — промежутка времени между $\frac{\pi}{2}$ импульсами характеризуется формулой (¹⁸):

$$A = A_0 [1 - \exp(-\tau / T_1)], \quad (1)$$

где A_0 — амплитуда эха при $\tau = \infty$. Формула (1) может быть преобразована следующим образом:

$$\ln \frac{A_0}{A_0 - A} = \frac{1}{T_1} \tau. \quad (2)$$

Выражение (2) представляет собой уравнение прямой в координатах $\ln \frac{A_0}{A_0 - A} - \tau$, по наклону которой может быть определено время T_1 . Таким образом, формула (1) позволяет определить T_1 , если исследуемая система может быть охарактеризована единственным временем спин-решеточной релаксации. Ошибка измерений T_1 при применении данного метода составляет $\pm 5\%$.

Результаты и обсуждение. В разных органах кукурузы, как показали опыты, время протонной спин-решеточной релаксации значительно различается (табл. 1). В корнях величина T_1 больше, чем в листьях, что свидетельствует о большей подвижности воды в корнях и может зависеть от большей оводненности тканей корней. Наибольшие значения T_1 наблюдаются в корнях в зоне проведения (толщина 3—4 мм) и в стеблях, содержащих в основном свободную (транспортируемую) воду.

При определении времени спин-решеточной релаксации в тонких корешках (поглощающая зона) наши эксперименты показали, что зависимость $\ln \frac{A_0}{A_0 - A} = f(\tau)$ не может быть представлена прямой линией. Это отклонение от линейности свидетельствует о том, что исследуемая система не может быть охарактеризована одним временем T_1 . Для разделения времен релаксации мы разложили полученную кривую на две компоненты методом, описанным в (19). Если в системе имеется два времени релаксации T_{11} и T_{12} , причем условимся считать, что $T_{11} > T_{12}$, то вместо уравнения (1) мы должны записать следующую формулу:

$$A = A_{01}[1 - \exp(-\tau/T_{11})] + A_{02}[1 - \exp(-\tau/T_{12})] \quad (3)$$

или $A_{01} + A_{02} - A = A_{01} \exp(-\tau/T_{11}) + A_{02} \exp(-\tau/T_{12})$, (3') где $A_{01} + A_{02}$ — значение амплитуды A при $\tau = \infty$. Уравнение (3') позволяет определить T_{11} и T_{12} в отдельности.

Таким образом, в тонких корешках экспериментально определяются два времени T_1 : большая величина соответствует фракции свободной воды, а меньшая — фракции связанной воды (см. табл. 1).

Сопоставление величин T_1 в разных органах кукурузы показывает, что наименее подвижна вода в листьях и в тонких корешках, имеющих сравнительно короткие времена релаксации. Можно полагать, что в листьях свободной воды мало, вследствие чего определяется всего одно усредненное время T_1 , величина которого меньше, чем в других органах. В работе (20) показано, что наличие различных фаз может быть надежно установлено, если скорости релаксации отличаются в 10 раз, а относительная концентрация ядер в фазах — не более чем в 5 раз.

В стеблях и в проводящей зоне корней время T_1 относительно длинное, что дает основание считать, что в них почти вся вода свободна, а содержание связанной воды незначительно.

Таблица 1
Время протонной спин-решеточной релаксации в разных органах кукурузы

Исследуемый орган	T_1 , мсек
Листья (листовые пластинки, отделенные от жилок)	262; 276
Корни толщиной в 1 мм (зона поглощения)	458 и 60; 480 и 60
Корни толщиной в 3—4 мм (приводящая зона)	960; 910
Стебли (междоузлие)	725; 680

Два времени протонной спин-решеточной релаксации определялись в опытах только в поглощающей зоне корней, где клетки отличаются высокой интенсивностью метаболических процессов, что сопровождается, по-видимому, связыванием в клетках части воды и одновременно интенсивным ее поглощением и передвижением, обуславливающими преобладание в них фракции свободной воды.

Определение двух времен T_1 дает возможность характеризовать фракции воды в корнях как с качественной (абсолютная величина T_1), так и с количественной стороны — путем определения содержания воды, соответ-

ствующей найденным величинам T_1 . В уравнении (3') A_{0s} и A_{0l} по смыслу, очевидно, представляют собой величины вкладов в суммарную амплитуду сигнала при $\tau = \infty$ от протонов с «короткими» и «длинными» временами спин-решеточной релаксации соответственно. Поскольку наблюдаемый сигнал спинового эха мы полностью связываем с присутствием воды в исследуемых системах (корнях, листьях), то, очевидно, величины A_{0s} и A_{0l} могут характеризовать относительное количество воды с «короткими» и «длинными» временами релаксации протонов. Эти величины непосредственно связаны с относительным количеством менее подвижной (A_{0s}) и более подвижной (A_{0l}) воды в общем ее содержании $A_{0s} + A_{0l}$. Количество менее подвижной (связанной) и более подвижной (свободной) воды можно выразить в процентах, принимая за 100% общее количество тканевой воды, протоны которой дают вклад в амплитуду сигнала эха.

Таким образом, имеют место соотношения:

$$C_{\text{своб}} = \frac{A_{0l}}{A_{0s} + A_{0l}} \cdot 100, \quad (5)$$

$$C_{\text{связ}} = \frac{A_{0s}}{A_{0s} + A_{0l}} \cdot 100, \quad (6)$$

где $C_{\text{своб}}$ и $C_{\text{связ}}$ — процентное содержание свободной и связанной воды в изучаемом растительном объекте.

Для характеристики состояния воды в клетках корней всасывающей зоны были произведены определения времен T_1 при изменении условий увлажнения. В I варианте растения находились в питательном растворе, который периодически сливался для улучшения аэрации корней (контроль), во II варианте создавалась засуха путем удаления питательного раствора из сосудов с растениями (остаточный водный дефицит 21% против 5–6% в контроле), в III варианте корни растений затоплялись питательным раствором на 4 суток (до завядания листьев) (табл. 2).

Снижение оводненности тканей корней при засухе приводит к сокращению времени T_{1l} (соответствующего фракции свободной воды), что свидетельствует об уменьшении ее подвижности, и к некоторому увеличению T_{1s} (соответствующего связанной воде). Это согласуется с изменением содержания свободной и связанной воды в тканях. Под влиянием засухи происходит снижение содержания свободной воды, количество же связанной воды соответственно увеличивается.

Таблица 2

Изменение времени протонной спин-решеточной релаксации в корнях кукурузы в зависимости от условий увлажнения

Варианты опыта	Общее содержание, г/г сух. в-ва	T_{1l} , мсек	T_{1s} , мсек	Содержание воды в процентах	
				свободной	связанной
I Нормальное увлажнение и аэрация (контроль)	9,3	320	24	80	20
II Засуха	7,0	266	28	66	34
III Затопление корней	9,1	338	35	62	38

При затоплении корней происходит увеличение фракции связанной воды, что может быть обусловлено усилением гидролитических процессов в клетках под влиянием анаэробноза, а содержание свободной воды в тканях корней снижается. Однако время T_{1l} , соответствующее свободной воде, в условиях затопления удлиняется, что свидетельствует об увеличении подвижности свободной воды. Увеличение подвижности свободной воды в тканях при затоплении может быть обусловлено структурными нарушениями в клетках в результате анаэробноза при затоплении корней (21). Из

данных табл. 2 видно также, что под действием неблагоприятных факторов (засухи и затопления) увеличивается содержание связанной воды.

Таким образом, исследование времени протонной спин-решеточной релаксации в тканях корней дает возможность, несмотря на большую подвижность воды в клетках, различать в ней две различные фракции воды: 1) связанную (соответствующую T_{1s}), которая образует, по-видимому, единую структуру с остальными компонентами цитоплазмы, и 2) свободную (соответствующую T_{1f}), которая близка по своему состоянию к воде *in vitro*. Соотношение этих фракций воды изменяется в различных тканях растений, в связи с чем не во всех органах экспериментально определяются два времени T_1 . Это указывает на значительные различия в состоянии воды в отдельных органах и тканях растений. Исследования с помощью данного метода могут дать более полное представление о состоянии воды в растениях.

Казанский сельскохозяйственный институт
им. М. Горького

Поступило
5 III 1970

Казанский педагогический институт

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ А. Сент-Дьердьи, Биоэнергетика, 1960. ² А. А. Абдурахманов, А. М. Алексеев, В сборн. Вопросы водообмена культурных растений, Казань, 1965. ³ К. С. Тринчер, Усп. совр. биол., 61, в. 3, 338 (1966). ⁴ В. М. Вдовенко, Ю. В. Гуриков, Е. К. Легин, В сборн. Структура и роль воды в живом организме, Л., 1966. ⁵ А. М. Алексеев, В сборн. Водный режим растений и их продуктивность, «Наука», 1968. ⁶ А. М. Алексеев, Водный режим клеток растений в связи с обменом веществ и структурированностью цитоплазмы, 28-е Тимирязевское чтение, «Наука», 1969. ⁷ А. Г. Пасынский, Биофизическая химия, М., 1963. ⁸ Ф. Гаурович, Химия и функция белков, М., 1965. ⁹ Э. Л. Андроникашвили, Г. М. Мревлишвили, П. Л. Привалов, ДАН, 171, № 5, 1198 (1966). ¹⁰ Э. Л. Андроникашвили, Г. М. Мревлишвили, П. Л. Привалов, В сборн. Состояние и роль воды в биологических системах, «Наука», 1967. ¹¹ Л. А. Абеледарская, Ф. Г. Мифтахутдинова, В. Д. Федотов, Биофизика, 13, в. 4 (1968). ¹² Н. А. Гусев, с.-х. биол. 3, № 2, 210 (1968). ¹³ Ф. Г. Мифтахутдинова, Исследование состояния воды в растительных тканях методом спинного эха ЯМР, Автореф. кандидатской диссертации, Казань, 1968. ¹⁴ Б. В. Вартапетян, А. Л. Курсанов, Физиол. раст., 8, в. 5, 569 (1961). ¹⁵ Ф. Д. Самуилов, Ю. Я. Ефремов, Физиол. раст., 9, в. 4, 438 (1962). ¹⁶ Н. Клотц, В сборн. Горизонты биохимии, М., 1964. ¹⁷ А. Ш. Агишев, М. З. Зиннатов и др., Приборы и техн. экп., 1, 78 (1963). ¹⁸ E. L. Hahn, Physics to day, 6, 4 (1953). ¹⁹ H. Yoshiaka, T. Fujita, J. Phys. Soc. Japan, 14, 1717 (1959). ²⁰ M. Sasaki, T. Kawai et al., J. Phys. Soc. Japan, 15, 1652 (1960). ²¹ И. Н. Андреева, Г. М. Гриднева, В сборн. Хлоропласты и митохондрии, «Наука», 1969.