

## ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА ЯМР С ПАРАМАГНИТНЫМ ДОПИНГОМ ДЛЯ ОЦЕНКИ АПОПЛАСТНОГО ПЕРЕНОСА ВОДЫ В КОРНЯХ ИНТАКТНЫХ РАСТЕНИЙ ПРИ ДЕЙСТВИИ АБИОТИЧЕСКИХ СТРЕССОВ

Суслов М.А.

Казанский институт биохимии и биофизики, ФИЦ Казанский научный центр РАН

ул. Лобачевского, 2/31, г. Казань, 420111, РФ; e-mail: makscom87@mail.ru

Поступила в редакцию 25.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0555

**Аннотация.** В настоящей работе предложен методический подход на базе низкочастотного ЯМР с применением парамагнитного комплекса GdDTPA (соль диэтиленetriаминпентауксусной кислоты) для качественной оценки транспорта воды по апопластному (внеклеточному) пути в корнях интактных растений пшеницы. Данный подход заключается в измерении времён спин-спиновой релаксации намагниченности воды в корнях при одновременном инкубировании корней в растворе парамагнитного комплекса GdDTPA и воздействии на растения стрессового фактора. В ходе инкубирования корней данный комплекс распространяется только по апопластной системе корня и укорачивает времена релаксации воды апопласта, но при этом GdDTPA не проникает внутрь клеток и, соответственно, не изменяет времена релаксации внутриклеточной воды. Таким образом, по скорости снижения времён релаксации намагниченности апопластной воды, которая прямо зависит от интенсивности водного переноса по апопласту, можно определить относительный вклад водного переноса по апопласту корня в ходе стрессового воздействия. В качестве абиотического фактора, предположительно влияющего на перенос воды по апопласту корня, было использовано двукратное повышение концентрации углекислого газа в надземной части растений. С использованием данного методического подхода было показано, что повышение концентрации CO<sub>2</sub> в зоне листьев растений пшеницы до 800 ppm приводит к снижению скорости водного переноса по апопласту корня в 2-2,5 раза по сравнению с контролем при концентрации CO<sub>2</sub> 400 ppm.

**Ключевые слова:** транспорт воды в растениях, ядерный магнитный резонанс, время спин-спиновой релаксации, апопластный путь водного переноса, парамагнитный допинг.

Транспорт воды в растениях является одним из ключевых биофизических процессов, определяющих рост и продуктивность. Задача исследования транспорта воды в растениях относится к сложному классу задач изучения массопереноса, так как здесь необходимо учитывать параллельность протекания водных растворов, а также функционирование различных движущих сил, каналов и барьеров водного переноса. Согласно композитной модели транспорта воды в корне растений, имеются три параллельных пути транспорта воды и растворенных в ней веществ: апопластный, симпластный и трансмембранный [1]. Апопластный путь обеспечивает перенос воды по внеклеточному пространству объема ткани. Симпластный перенос из клетки в клетку обеспечивается через плазмодесмы без выхода молекул воды по внеклеточное пространство ткани. И, наконец, перенос трансмембранным путем связан с пересечением молекулами воды объема клеток с выходом через мембраны во внеклеточное пространство с последующим входом в другие клетки. Симпластный и трансмембранный пути, из-за сложности экспериментального разделения, зачастую объединяют в путь из клетки в клетку (cell-to-cell) [1]. Предполагается, что в ходе адаптации растений к изменению условий внешней среды и действию абиотических стрессов вклад этих путей в суммарный водный перенос может изменяться. Считается, что в условиях хорошей оводнённости и при высокой скорости транспирации преобладает апопластный путь радиального переноса воды в корне, обеспечивающий пассивный перенос воды по градиенту водного потенциала. Несмотря на малую объёмную долю (около 15%) вклад апопластного пути в суммарный водный перенос в корне может составлять более 50%. При изменении условий окружающей среды основным регуляторным компонентом на уровне водного переноса в корне является трансклеточный путь водного переноса через мембраны клеток, опосредованный, главным образом, аквапоринами.

В подавляющем большинстве работ исследование водного переноса в корнях сводится, в основном, к измерению гидравлической проводимости, отражающей суммарный водный перенос по тканям корня. Однако данный метод предполагает отсечение частей и органов растений и приводит к нарушению функционирования гидравлики всего растения. Недостаточность методов неразрушающего контроля является одной из главных причин торможения в решении проблемы транспорта воды. В связи с вышесказанным актуальной задачей внутри проблемы исследования транспорта воды в растениях является поиск методов и подходов для неинвазивной оценки вклада путей водного переноса в корне непосредственно при воздействии абиотических стрессов. В настоящей работе предложен методический подход на базе ЯМР с применением парамагнитного комплекса GdDTPA (соль диэтиленetriаминпентауксусной кислоты) для качественной оценки транспорта воды по апопластному (внеклеточному) пути в корнях интактных растений. Отличительной особенностью данной работы является использование техники низкочастотного ЯМР с импульсным градиентом магнитного поля и оригинальных климатических камер роста растений (рис. 1), сопряжённых с ЯМР оборудованием.

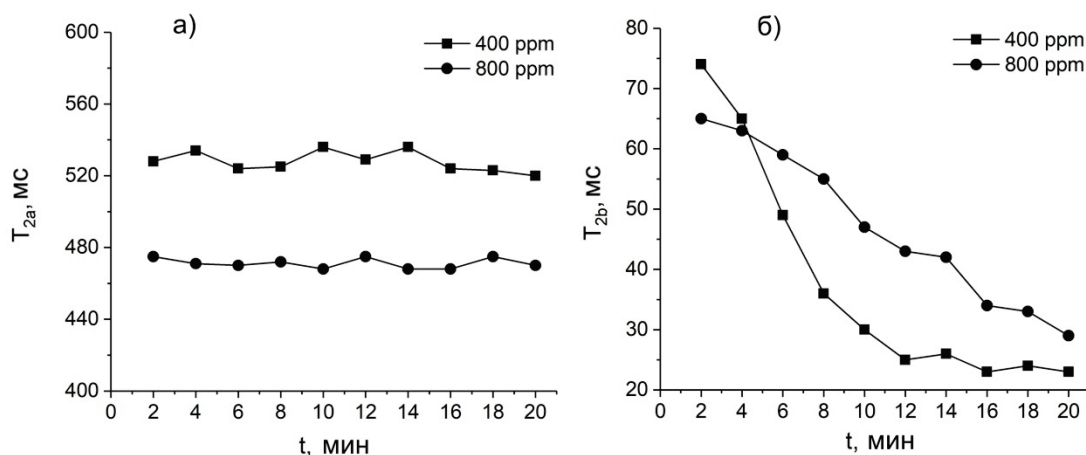


**Рисунок 1.** Климатические камеры роста растений с контролем температуры, относительной влажности воздуха и концентрации углекислого газа. Камеры имеют возможность сопряжения с ЯМР оборудованием и газовой системой для непрерывного исследования параметров водного переноса при одновременном воздействии на растения стрессовых факторов

Преимущество данного подхода по сравнению с имеющимися методами оценки гидравлической проводимости корня [2] заключается в том, что он позволяет в динамике исследовать параметры радиального водного переноса и вклад апопластного пути водного переноса в зоне всасывания корней интактных растений при контролируемых параметрах окружающей среды и внешнем воздействии. В качестве абиотического фактора, предположительно влияющего на перенос воды по апопласту корня, было использовано двукратное (до 800 ppm) повышение концентрации углекислого газа в надземной части растений. Оценка изменения интенсивности радиального водного переноса по апопласту корня была основана на измерении динамики магнитной релаксации внеклеточной (апопластной) воды в процессе проникновения во внеклеточное пространство парамагнитного комплекса GdDTPA (парамагнитный допинг). Парамагнитный комплекс GdDTPA имеет широкое применение в качестве контрастанта в магнитно-резонансной томографии. Будучи парамагнетиком с высокой релаксационной способностью, данный комплекс достаточно хорошо проникает во внеклеточное пространство тканей корня и приводит к укорочению времён магнитной релаксации внеклеточной воды [3]. При этом цитоплазматическая мембрана не проницаема для GdDTPA, что ограничивает проникновение GdDTPA в клетки, и, следовательно, времена магнитной релаксации внутриклеточной воды остаются неизменными. Таким образом, по скорости снижения времён магнитной релаксации, в частности времени спин-спиновой релаксации апопластной воды вследствие распространения парамагнетика, можно качественно судить о скорости транспорта воды по апопласту корня. Для чистой воды затухание сигнала намагниченности является однокомпонентным, в то время как для корней затухание имеет как минимум два ярко выраженных компонента – быстроспадающий и медленноспадающий [3,4]. Инкубация корней в растворе парамагнетика, который не проникает внутрь клеток, приводит к изменению скорости затухания только начального, быстроспадающего участка затухания, что позволяет отнести этот участок затухания к внеклеточной (апопластной) воде. Соответственно медленно-затухающий участок релаксационной кривой, имеющий большую населённость и «не реагирующий» на парамагнетик, относится к внутриклеточной воде, где основную долю в сигнал вносит вакуолярная вода [4].

Для проведения эксперимента пробирку с контрольными или опытными растениями помещали в ЯМР зонд, не извлекая растения из климатической камеры и, соответственно, не нарушая параметров внешней среды. При этом в центре ЯМР зонда размещали зону всасывания корней. Далее, через отверстие в нижней части пробирки с помощью шприца в корневую среду вводили водный раствор парамагнетика (GdDTPA 20mM, pH 7). Сразу после этого в течение 20 минут регистрировали релаксационные затухания намагниченности воды от образца с шагом в 2 минуты. Затухания намагниченности воды в образце получали с использованием импульсной последовательности Карр-Парселла. Измерения проводили через сутки после повышения концентрации CO<sub>2</sub>.

На рисунке 2 приведена динамика изменения времён спин-спиновой релаксации внутриклеточной (вакуолярной) и внеклеточной (апопластной) воды в ходе инкубации корней интактных растений пшеницы в контрольных условиях и в условиях повышенной концентрации атмосферного углекислого газа. В течение всего времени инкубации, которое составляло примерно 20 минут, времена релаксации внутриклеточной воды в корнях контрольных и опытных растений практически не изменялись (рис. 2, а). Это свидетельствует о том, что парамагнитный комплекс не проникает внутрь растительных клеток, по крайней мере, в течение приведённого времени инкубации. Для апопластной воды, напротив, времена релаксации начали снижаться практически сразу после начала инкубации корней растений в растворе парамагнетика, при этом скорость снижения в растениях под действием повышенной концентрации CO<sub>2</sub> была примерно в 2-2,5 раза ниже по сравнению с контролем (рис. 2, б).



**Рисунок 2.** Динамика изменения времени спин-спиновой релаксации  $T_{2a}$  внутриклеточной воды (а) и времени спин-спиновой релаксации  $T_{2b}$  внеклеточной (апопластной) воды (б) в корнях интактных растений пшеницы в ходе инкубации корней в водном растворе парамагнитного комплекса GdDTPA в условиях нормальной (400 ppm) и повышенной (800 ppm) концентрации атмосферного углекислого газа

Объяснением этого может быть то, что повышение концентрации углекислого газа в атмосфере приводит к снижению скорости испарения воды с поверхности листьев за счёт закрытия устьиц (специализированных пор на поверхности листьев). В результате потребность растений в водопоглощении снижается, и, соответственно, снижается пассивный перенос воды и растворённого в ней парамагнетика по апопластной системе корня. Стоит обратить внимание на то, что значения времён релаксации внутриклеточной воды для контрольных растений при нормальной концентрации  $\text{CO}_2$  400 ppm в течение всего времени инкубации в растворе парамагнетика были выше, чем для растений, подвергнутых воздействию повышенной концентрации  $\text{CO}_2$  (рис. 2, а). Это может свидетельствовать о замедлении под действием повышенной концентрации  $\text{CO}_2$  водного переноса также и по трансклеточному пути, так как более высокие значения времён спин-спиновой релаксации соответствуют более интенсивному межклеточному водообмену [4].

Таким образом, с использованием приведённого в работе методического подхода было показано, что повышение концентрации углекислого газа в зоне листьев растений пшеницы до 800 ppm приводит к снижению скорости водного переноса по апопласту корня приблизительно в 2-2,5 раза по сравнению с контролем при 400 ppm. Очевидным преимуществом представленного в работе методического подхода является то, что данный подход не предполагает повреждение растений, позволяет проводить измерения в динамике непосредственно при действии абиотических стрессов и при этом является менее трудоёмким, например, по сравнению с использованием флуоресцентных красителей [5]. В дополнение к этому метод позволяет осуществлять параллельное измерение физиологических параметров в листовой зоне растений, например, скорости транспирации и фотосинтеза, что может представлять ценность при исследовании координации корней и листьев растений в ходе адаптации к абиотическим стрессам. К недостаткам метода следует отнести невозможность полного и быстрого выведения парамагнетика из тканей растений и соответственно исключается возможность проведения повторных экспериментов на одних и тех же растениях.

*Исследование проведено в рамках работы по гос. заданию для ФИЦ Казанского научного центра РАН.*

#### **Список литературы / References:**

1. Kim Y.X., Ranathunge K., Lee S., Lee Y., Lee D., Sung J. Composite transport model and water and solute transport across plant roots: an update. *Frontiers in Plant Science*, 2018, vol. 9, no. 193, doi: 10.3389/fpls.2018.00193.
2. Sarker B., Hara M. Effects of elevated  $\text{CO}_2$  and water stress on root structure and hydraulic conductance of *solanum melongena* l. *Bangladesh J. Bot.*, 2009, vol. 38, no. 1, pp. 55-63.
3. Anisimov A.V., Suslov M.A. Estimating the MRI contrasting agents effect on water permeability of plant cell membranes using the  $^1\text{H}$  NMR gradient technique. *Applied Magnetic Resonance*, 2021, vol. 52, no. 3, pp. 235-246, doi: 10.1007/s00723-021-01313-6.
4. Anisimov A.V., Suslov M.A. The effect of external gas pressure on the magnetic relaxation of water in plant cells. *Biophysics*, 2016, vol. 61, no. 1, pp. 67-72, doi: 10.1134/S0006350916010024.
5. Vitali V., Sutka M., Ojeda L., Aroca R., Amodeo G. Root hydraulics adjustment is governed by a dominant cell-to-cell pathway in *Beta vulgaris* seedlings exposed to salt stress. *Plant Science*, 2021, vol. 306, doi: 10.1016/j.plantsci.2021.110873.

**APPLICATION OF THE NMR METHOD WITH PARAMAGNETIC DOPING TO ESTIMATION THE APOPLASTIC WATER TRANSFER IN THE ROOTS OF INTACT PLANTS UNDER IMPACT OF ABIOTIC STRESSES**

**Suslov M.A.**

Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, Federal Research Center Kazan Scientific Center RAS  
*Lobachevsky str., 2/31, Kazan, 420111, Russia; e-mail: makscom87@mail.ru*  
Received 25.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbpc.2022.0555

**Abstract.** In this work, the methodological approach based on low-field NMR using the GdDTPA paramagnetic complex for the qualitative assessment of water transport along the apoplastic (extracellular) pathway in the roots of intact wheat plants is proposed. This approach consists in measuring the spin-spin relaxation times of the water magnetization in the roots during simultaneous incubation of the roots in a solution of the paramagnetic Gd-DTPA complex and the impact of a stress factor on the plants. During root incubation, this complex spreads only along the root apoplast system and shortens the apoplast water relaxation times. GdDTPA does not penetrate into the cells and, accordingly, does not change the intracellular water relaxation times. Thus, the rate of decrease in the relaxation times of the magnetization of apoplast water, which directly depends on the intensity of water transfer through the apoplast, can be used to determine the relative contribution of water transfer through the root apoplast during stress exposure. A twofold increase in the concentration of carbon dioxide in the aerial parts of plants was used as an abiotic factor presumably influencing the transfer of water along the root apoplast. Using this methodological approach, it was shown that increase in the CO<sub>2</sub> concentration in the leaf zone of wheat plants to 800 ppm leads to decrease in the rate of water transfer through the root apoplast by 2–2.5 times compared with the control at ambient CO<sub>2</sub> concentration of 400 ppm.

**Key words:** *water transport in plants, nuclear magnetic resonance, spin-spin relaxation time, apoplastic water transport pathway, paramagnetic doping.*