



І.І. ОВРУЦЬКА

Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України
вул. Терещенківська, 2, м. Київ, МСП-1, 01601, Україна
svitonline@com.ua

**УТВОРЕННЯ ЛІГНІНУ ТА АКТИВНІСТЬ
НЕСПЕЦИФІЧНОЇ ПЕРОКСИДАЗИ
В ЛИСТКАХ РОСЛИН *SIUM LATIFOLIUM* L.
ЗА РІЗНИХ УМОВ ВОДНОГО РЕЖИМУ**

Ключові слова: лігнін, пероксидаза, листки, водний режим, Sium latifolium

Зміна умов навколишнього середовища впливає на інтенсивність накопичення лігніну у вегетативних органах рослин. Лігнін забезпечує міцність стебел і листків та, крім того, механічну силу натягу і захист від інфікування, знижує проникність клітинних стінок для води. Це складна високомолекулярна сполука, яка містить ряд функціональних груп, зокрема гідроксильні, фенольні, метоксильні тощо [8]. Лігнін локалізований в оболонках клітин механічних, провідних і паренхімних тканин, формується в матриксі клітинної стінки, заповнюючи проміжки між полісахаридами, ксиланами і мікрофібрилами целюлози. У біосинтезі лігніну беруть участь пероксидази клітинної стінки [20]. Пероксидаза — функціонально дуже лабільний фермент, здатний реагувати на більшість порушень гомеостазу [1, 22]. Пероксидазна активність і синтез лігніну корелюють між собою [20]. Серед факторів навколишнього середовища, які значною мірою впливають на процес нагромадження лігніну в рослинах, — зміни водного режиму, зокрема посуха [17]. В умовах підвищеної вологості ґрунту зменшуються жорсткість клітинних оболонок, їх лігніфіка-

ція та вміст целюлози. Навпаки, водний дефіцит прискорює синтез лігніну [5, 11]. Новітні результати аналізу мутантів і трансгенних рослин засвідчують метаболічну пластичність у біосинтезі лігніну [14, 15, 21]. Різні тканини однієї рослини можуть відрізнятися за складом лігніну, що може бути результатом різної експресії генів біосинтезу лігніну [13].

Для з'ясування механізмів адаптації рослин до змін водного режиму в природних умовах досліджено взаємозв'язки між водним балансом і вмістом лігніну в листках *Sium latifolium* L. водного та суходільного екотипів. Оскільки синтез лігніну значною мірою визначається активністю неспецифічної пероксидази, ми також вивчали її активність.

Об'єкт та методика досліджень

Об'єктом дослідження були листові пластинки *S. latifolium* (*Apiaceae*), які за екотипом належать до повітряно-водних рослин. Рослини зростають уздовж берега р. Псьол біля смт Велика Багачка Полтавської обл. у воді (прибережна водна смуга) та на суходолі, на відстані 3—15 м від берега. Матеріал для досліджень збирали у фазах бутонізації (червень) та цвітіння-плодоношення (серпень) під час польових експедицій. Вивчали вирізки середньої частини другої пари листочків другого складного листка веху мінімум як із трьох рослин обох екотипів у триразовій повторності.

Вміст лігніну визначали за методом [2], який базується на його екстракції з висушеного рослинного матеріалу за допомогою хлориту натрію в присутності оцтової кислоти. 5 г сухої маси тканин веху поміщали в колбу, додавали 160 мл води, 10 крапель оцтової кислоти і 1,5 г хлориту натрію. Колбу нещільно закривали скляною кулькою. Через кожну годину додавали нові порції оцтової кислоти та хлориту натрію у початкових дозах. Повна екстракція лігніну із тканин триває 4 год. Досліджуваний матеріал поміщали у воронку зі скляним фільтром і кілька разів промивали льодяною водою, потім — ацетоном, висушували на повітрі та ретельно зважували. Різниця у показниках ваги до та після екстракції відповідає кількості лігніну в тканинах.

Активність неспецифічної пероксидази (КФ 1.11.1.7) встановили за методом [19], що ґрунтується на здатності ферменту окиснювати пірогалол до пурпургаліну, використовуючи пероксид водню як акцептор електронів. У контрольному зразку H_2O_2 замінено дистильованою водою. Реакцію починали додаванням H_2O_2 і визначали збільшення оптичної густини розчину внаслідок утворення пурпургаліну протягом 60 сек при 430 нм. Активність розраховували з використанням коефіцієнта мілімолярної екстиненції пурпургаліну $2,47 \text{ мМ}^{-1}\text{см}^{-1}$ і репрезентували у ммоль пурпургаліну/хв/г сирої речовини.

Одержані дані опрацьовували статистично за допомогою комп'ютерної програми БІО-8.

Результати досліджень та їх обговорення

Дослідження *S. latifolium* в онтогенезі показали, що вміст лігніну та активність неспецифічної пероксидази змінюються як у суходільного, так і повітряно-

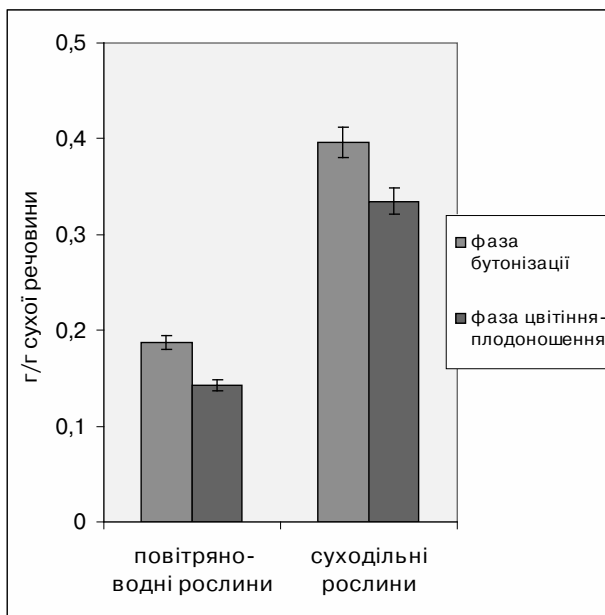


Рис. 1. Вміст лігніну в листкових пластинках *Sium latifolium* L.

Fig. 1. Lignin content in the leaves plates of *Sium latifolium* L.

водного еко типу. Зокрема, вміст лігніну в листках повітряно-водних рослин у фазі бутонізації становить $0,187 \pm 0,099$ г/г сухої маси, у фазі цвітіння-плодоношення дещо знижується — $0,143 \pm 0,014$ г/г (рис. 1). У суходільних рослин ці параметри становлять відповідно $0,396 \pm 0,042$ і $0,314 \pm 0,032$ г/г сухої маси. Порівняння накопичення лігніну в листках повітряно-водних та суходільних рослин виявило суттєві відмінності між екотипами: помірний дефіцит вологи у ґрунті призводить до суттєвого збільшення (вдвічі) кількості лігніну в суходільних рослин порівняно з тими, які зростали за достатнього водозабезпечення (див. рис. 1). Ці закономірності відзначені як у фазу бутонізації, так і цвітіння-плодоношення рослин.

Активність неспецифічної пероксидази у листках повітряно-водних та суходільних рослин також змінювалась у фазах бутонізації і цвітіння-плодоношення (рис. 2). Зокрема, активність ферменту знижувалася у фазу цвітіння-плодоношення порівняно з періодом бутонізації у представників обох екотипів. З'ясовано, що вона була вищою (вдвічі) у суходільних рослин на обох стадіях розвитку. Тобто активність ферменту змінювалась аналогічно до змін у синтезі лігніну.

Таким чином, отримані результати засвідчили, що вміст лігніну в листках *S. latifolium* зменшується від фази бутонізації до фази цвітіння-плодоношення, причому це характерно для представників обох екотипів. За даними літературних джерел існує тісний зв'язок між синтезом лігніну і станом диференціювання та росту окремих органів і тканин вищих рослин. Зокрема, в молодих листках сорго, петрушки, гречки, вівса, жита, клітини яких діляться та розтягуються, інтенсивно синтезується лігнін, з віком ця активність поступово зменшується і припиняється

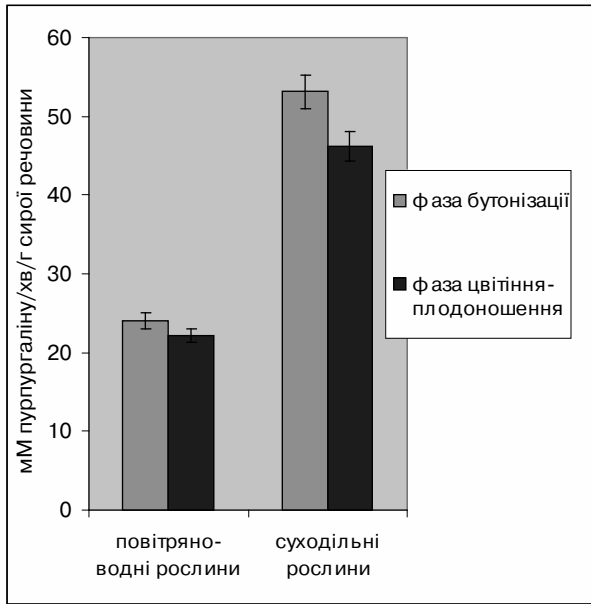


Рис. 2. Активність неспецифічної пероксидази у листових пластинках *S. latifolium*

Fig. 2. Activity of the nonspecific peroxidase in the leaf blades of *S. latifolium*

у зрілих листках із закінченням росту [9, 12]. В рослинах відбувається постійна адаптація потенціалу активності шикиматного шляху до змін у потребі в його продуктах, які витрачаються на біосинтез лігніну, білків та вторинних речовин.

Зменшення вмісту лігніну у фазі цвітіння-плодоношення в листках обох екотипів *S. latifolium*, відзначене нами, може свідчити також про катаболічні перетворення фенольних сполук. Вважалося, що вищі рослини здатні лише синтезувати феноли [3, 4, 6]. Проте здатність рослин розщеплювати циклічні структури фенолів до CO_2 і простих аліфатичних метаболітів, очевидно, є універсальною і виявляється стосовно більшості природних мономерних поліфенолів. Фенольні сполуки в рослинній клітині зазнають суттєвих катаболічних перетворень.

Крім того, ми виявили вищий вміст лігніну у суходільних рослин порівняно з повітряно-водними незалежно від стадії розвитку. Оскільки водний дефіцит прискорює синтез лігніну [5, 11], можемо припустити, що у представників суходільного екотипу його підвищений синтез, очевидно, є проявом адаптації до нестачі вологи у ґрунті. Біологічну роль цього феномену можна пояснити ефективною регуляцією транспорту води у клітинних оболонках суходільних рослин, оскільки високий вміст лігніну сповільнює надходження води до клітин.

У рослин обох екотипів відзначено зниження активності неспецифічної пероксидази у фазі цвітіння-плодоношення порівняно з фазою бутонізації. За даними літератури активність ферменту також змінюється в процесі росту і розвитку рослини [7, 8]. Встановлено, що висока у вегетативній фазі активність пероксидази у клітинних стінках стебла пшениці знижується з переходом у генеративну фазу та є найнижчою в період плодоношення, що, очевидно, зумовлює зменшення інтенсивності нагромадження лігніну наприкінці онтоге-

незу рослини [9, 10, 16]. Відомо, що існує позитивна кореляція між активністю іоннозв'язаних форм пероксидаз та інтенсивністю лігніфікації [18, 20], чим і пояснюються аналогічні зміни у синтезі лігніну й активності неспецифічної пероксидази, які ми спостерігали.

Висновки

Вперше проведено комплексне дослідження накопичення лігніну та активності неспецифічної пероксидази у листках рослин *S. latifolium* в онтогенезі у природному середовищі за умов різного водозабезпечення. Отримані результати обох екотипів засвідчили, що вміст лігніну та активність ферменту в листках *S. latifolium* зменшуються під час росту і розвитку. Також представники сухо-дільного екотипу характеризуються вищими показниками активності неспецифічної пероксидази та вмісту лігніну порівняно з повітряно-водними рослинами, що, очевидно, є проявом адаптації до змін водного режиму.

1. Андреева В.А. Фермент пероксидаза: участие в защитном механизме растений. — М.: Наука, 1988. — 128 с.
2. Дженсен У. Ботаническая гистохимия. — М.: Мир, 1965. — 378 с.
3. Запрометов М.Н. Фенольные соединения растений: биосинтез, превращения и функции. Новые направления в физиологии растений. — М.: Наука, 1985. — 286 с.
4. Запрометов М.Н. Специализированные функции фенольных соединений в растениях // Физиол. раст. — 1993. — **40**. — С. 921—931.
5. Кордюм Е.Л., Сытник К.М., Бараненко В.В. и др. Клеточные механизмы адаптации растений к неблагоприятным воздействиям экологических факторов в естественных условиях. — Киев: Наук. думка, 2003. — 273 с.
6. Маргна В., Лаансет Л. Катаболические превращения полифенолов в растениях // Физиол. и биохим. культ. раст. — 1980. — **12**, № 3. — С. 227—237.
7. Минабаева Ф.В., Гордон Л.Х. Продукция супероксида и активность внеклеточной пероксидазы в растительных тканях при стрессе // Физиол. раст. — 2003. — **50**, № 3. — С. 459—464.
8. Овруцька І.І. Уявлення про лігніфікацію клітинних стінок // Укр. ботан. журн. — 2007. — **62**, № 5. — С. 463—469.
9. Паду Э. Свойства пероксидазы и фенилаланин-аммиак-лиазы при образовании и лигнификации клеточных стенок стебля пшеницы // Физиол. раст. — 1995. — **42**, № 3. — С. 408—415.
10. Паду Э., Тийдт Т. Растворимая и связанная пероксидаза и биосинтез лигнина в онтогенезе пшеницы // Тез. докл. V Всесоюз. симп. по фенольным соед. — Таллин, 1987. — С. 114—115.
11. Тарчевский И.А., Марченко Г.Н. Биосинтез и структура целлюлозы. — М.: Наука, 1985. — 280 с.
12. Тохвер А.К., Пальм Э.В. Интенсивность функционирования шикиматного пути и накопление фенольных соединений в листьях ячменя разного возраста // Физиол. раст. — 1991. — **38**, вып. 3. — С. 485—491.
13. Hatfield R., Vermerris W. Lignin formation in plant. The dilemma of linkage specificity // Plant Physiol. — 2001. — **126**. — P. 1350—1357.
14. Holm K., Andreasen P.H., Eckloff R.M.G. et al. Three differentially expressed basic peroxidases from wound-lignifying *Asparagus officinalis* // Journ. of Exp. Botany. — 2003. — **54**. — N 391. — P. 2275—2284.
15. Jouanin L., Goujon T., De Nadai V. et al. Lignification in transgenic poplars with extremely reduced caffeic acid O-methyltransferase activity // Plant Physiol. — 2000. — **123**. — P. 1363—1373.

16. Jung S. Variation in antioxidant metabolism of young and mature leaves of *Arabidopsis thaliana* subjected to drought // Plant Science. — 2004. — **166**. — P. 459–466.
17. Lee B-R., Kim K-Y., Jung W-J. et al. Peroxidases and lignification in relation to the intensity of water-deficit stress in white clover (*Trifolium repens* L.) // Journ. of Exp. Botany. — 2007. — **58**. — N 6. — P. 1271–1279.
18. Mosel G., Schindler T., Bergfeld R. et al. Structure and distribution of lignin in primary and secondary cell walls of maize coleoptiles analyzed by chemical and immunological probes // Planta. — 1997. — **201**. — P. 146–159.
19. Nakano Y., Asada K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidases in spinach chloroplasts // Plant Cell Physiol. — 1981. — **22**, N 3. — P. 867–880.
20. Ogawa K., Kanematsu S., Asada K. Generation of superoxide anion and localization of CuZn-superoxide dismutase in the vascular tissue of spinach hypocotyls: Their Association with Lignification // Plant Cell Physiol. — 1997. — **38**, N 10. — P. 1118–1126.
21. Sato Y., Demura T., Yamawaki K. et al. Isolation and characterization of a novel peroxidase gene ZPO-C whose expression and function are closely associated with lignification during tracheary element differentiation // Plant Cell Physiol. — 2006. — **47**, N 4. — P. 439–503.
22. Tadeo F.R., Primo-Millo E. Peroxidase activity changes and lignin deposition during the senescence process in Citrus stigmas and styles // Plant Sci. — 1990. — **68**, N 1. — P. 47–56.

Рекомендує до друку
І.В. Косаківська

Надійшла 04.02.2010

И.И. Овруцкая

Институт ботаники им. Н.Г. Холодного НАН Украины, Киев

ОБРАЗОВАНИЕ ЛИГНИНА И АКТИВНОСТЬ НЕСПЕЦИФИЧЕСКОЙ ПЕРОКСИДАЗЫ В ЛИСТЯХ РАСТЕНИЙ *SIUM LATIFOLIUM* L. В РАЗНЫХ УСЛОВИЯХ ВОДНОГО РЕЖИМА

Определяли содержание лигнина и активность неспецифической пероксидазы в листовых пластинках воздушно-водных растений *Sium latifolium* L., которые росли в воде и на суше. Материал для исследования собирали на фазах бутонизации (июнь) и цветения-плодоношения (август). Установлено, что количество лигнина — показатель достаточно лабильный — зависит от условий водного режима и изменяется в процессе онтогенеза при переходе от бутонизации к цветению-плодоношению. Выявлена корреляция в изменении активности неспецифической пероксидазы и содержания лигнина в листьях воздушно-водных и сухоходольных растений *S. latifolium* в зависимости от фазы онтогенеза.

К л ю ч е в ы е с л о в а: лигнин, пероксидаза, листья, водный режим, *Sium latifolium*.

I.I. Ovrutskaya

M.G. Kholodny Institute of Botany, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

LIGNIN FORMATION AND ACTIVITY OF THE NONSPECIFIC PEROXIDASE IN LEAVES OF *SIUM LATIFOLIUM* L. GROWING UNDER VARIOUS CONDITIONS OF WATER SUPPLY

The influence of natural moderate water deficiency on the lignin synthesis in leaves of air-water *Sium latifolium* L. has investigated. Material for research was collected at the phases of budding (June) and blooming-fruiting (August). The decrease of lignin content was revealed at the phase of blooming-fruiting in the plants of both ecotypes. It is obvious that hydrolysis of this polymer at the late phases of plant development does not depend on the water status but could be explained by the ageing of cells. The obtained results indicate that lignin of cell walls is a labile polymer which synthesis is directly bound to the plant water status. It is shown that the change of nonspecific peroxidase activity and lignin content in air-water and terrestrial *S. latifolium* leaves correlate with the stage of plant ontogenesis.

Key words: lignin, peroxidase, leaves, water mode, *Sium latifolium*.