

О.М. НЕДУХА

Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України, Київ
E-mail: o.nedukha@hotmail.com

ЦИТОХІМІЧНИЙ ТА БІОХІМІЧНИЙ АНАЛІЗ ЛОКАЛІЗАЦІЇ ТА ВМІСТУ ЦЕЛЮЛОЗИ У ЛИСТКАХ *SIUM* *LATIFOLIUM* ЗА УМОВ ВОДНОГО ДЕФІЦИТУ



Методом лазерно-конфокальної мікроскопії досліджено розподіл целюлози в клітинах епідермісу та мезофілу листків *Sium latifolium* у фазі бутонізації та плодоношення. За допомогою програмного забезпечення PASCAL встановлено, що відносний вміст целюлози у клітинних оболонках залежить від тканини листка, фази онтогенезу рослини та умов її зростання. Біохімічними методами виявлено, що помірний водний дефіцит знижує вміст аморфної форми целюлози та збільшує вміст кристалічної форми целюлози в процесі росту рослини.

© О.М. НЕДУХА, 2009

ISSN 0564–3783. Цитология и генетика. 2009. № 2

Вступ. Целюлоза – основний полісахарид клітинних оболонок, який надає їм міцності і регулює пластичність. Целюлоза складається із одиниць β -(1–4)-глюкопіранози, з'єднаних глюкозидними зв'язками між першим та четвертим атомами вуглецю під кутом 180° . Відомо, що 36 паралельних молекул целюлози формують елементарну фібрилу шириною 2–4 нм і довжиною до 5000 нм. У фібрилах целюлози виявляються кристалічні та аморфні зони. Елементарні фібрили з'єднуються у мікрофібрили шириною 10–30 нм та довжиною від 100 до 40 000 нм [1]. Відомо, що целюлоза змінює структуру під час росту та диференціації клітини. Загальний вміст целюлози у первинній оболонці коливається від 20 до 30 %, у вторинній оболонці – 40–90 % сухої маси [2]. Вміст целюлози в оболонках також залежить від виду та органу: у стеблах *Avena sativa* він становив 60,6 % (сухої маси), у стеблах *Triticum aestivum* – 75,7 %, у листках та стеблах *Trifolium repens* – 23,6 %, у стеблах *Hordeum vulgare* – 71,7 %, у стеблах *Arabidopsis thaliana* – від 10 до 36 %, у насінні різних видів рослин – від 14,7 до 80,2 % [3, 4].

Відомо, що целюлоза рослинних клітин може бути у двох формах – кристалічній та/або аморфній. Вміст аморфної целюлози залежить від виду рослини: у листках *Populus candensis* він коливався від 10 до 15 %, у листках злаку *Phragmites australis* – до 95 % [5, 6], тоді як у оболонках диференційованих клітин волокон *Gossypium herbaceum* виявлено лише сліди аморфної целюлози. Оболонки містили в основному кристалічну форму целюлози [2, 5].

Дія водного дефіциту призводить до зменшення розмірів листків та клітин [7, 8]. Причинами інгібування росту клітин можуть бути зміни тривалості клітинного циклу, величини тургору та осмотичного потенціалу клітин, пригнічення синтезу полісахаридів клітинних оболонок, у тому числі і целюлози. Дані щодо змін вмісту полісахаридів оболонок при дії водного дефіциту фрагментарні. Більшість робіт присвячені вивченню лігніфікації клітинних оболонок та дослідженню їх структури [9–11]. Які ж зміни відбуваються у вмісті целюлози в клітинах тієї чи іншої тканини, як впливає природний водний дефіцит на співвідношення аморфної до кристалічної целюлози у надземних органах рослин в природних умовах досліджено недостатньо. Тому нашим

завданням було дослідження целюлози в клітинних оболонках листків двох екотипів *Sium latifolium* L. у фазі бутонізації та початку плодоношення.

Матеріали і методи. Об'єктом дослідження були листки повітряно-водних рослин *Sium latifolium* L., які зростали у воді (на глибині 20–40 см) вздовж річки Псьол (м. Велика Багачка Полтавської обл.) та на суходолі – на відстані кількох метрів від берега, у затінку. Для досліджень листки веху широколистоного збирали у фазі бутонізації (перша декада червня) і початку плодоношення (третьа декада липня).

Для цитохімічних досліджень клітин вирізали полоски із серединної частини листкових пластинок шириною до 4 мм, довжиною до 10–12 мм (від краю листочка до середньої жилки) трьох рослин повітряно-водної та трьох рослин суходільної форм веху. Фіксували перші дольки (листочки) складних листків у рослин обох екотипів. Локалізацію та відносний вміст целюлози у клітинних оболонках визначали за методом Херза [12]. Зразки фіксували у розчині 1,25 % параформальдегіду на 0,01 М фосфатному буфері (рН 7,4) впродовж 1 год при +25 °С (у польових умовах), потім переносили у термос-холодильник при +5 °С. Наступні процедури проводили в лабораторії. Префіксовані та промиті у буфері зразки інкубували у 0,001%-ному розчині калькофлуору впродовж 15–20 хв, промивали буфером та досліджували у лазерному скануючому конфокальному мікроскопі LSM 5 PASCAL («Carl Zeiss», Німеччина). Комплекс калькофлуор – целюлоза мав зелену флуоресценцію при довжині хвилі збудження 494 нм та довжині хвилі емісії 516 нм. Дані розподілу комплексу калькофлуор – целюлоза в оболонках, а також вимірів інтенсивності його флуоресценції отримано за допомогою програмного забезпечення PASCAL. Згідно з цією програмою інтенсивність флуоресценції корелює з вмістом целюлози, яка зв'язалась із флуорохромом (калькофлуором). Автофлуоресценцію хлорофілу виявляли використовуючи канал лазерного мікроскопа із довжиною хвилі збудження 440 нм та довжиною хвилі емісії 660 нм. Для цитохімічних досліджень брали по 100 клітин мезофілу та 50–60 клітин епідермісу із кожного листка. В експериментах використано 12 листків із трьох рослин сухо-

дільного та 12 листків із трьох повітряно-водних рослин. Одержані дані обробляли статистично за програмою БІО-8. Повторність дослідів триразова.

Визначення вмісту кристалічної та аморфної целюлози проводили методом послідовного кислотного гідролізу за методом Арасимовича та ін. [13], який заснований на поступовому екстрагуванні цукрів, пектину, геміцелюлоз, а потім – на гідролізі аморфної та кристалічної целюлози. Для однієї проби брали серединні вирізки (без центральної жилки) із 12–15 листків у шести рослин кожного екотипу веху. Для кожного аналізу використовували по шість проб з водного екотипу веху та по шість проб з рослин суходільного екотипу. Для одержання сухої маси матеріал висушували при 85 °С впродовж 12 год та 1 год – при 105 °С. Хід біохімічного аналізу був наступний. Для однієї повторності завжди брали дві паралельні проби, одна із яких після видалення цукрів, пектинів та геміцелюлоз використовувалась нами для визначення загального вмісту целюлози, друга – для визначення вмісту аморфної целюлози. Спочатку із матеріалу екстрагували цукри гарячою водою (80 °С) впродовж 60 хв, одержаний екстракт фільтрували через скляний фільтр, осад підсушували при 50 °С. Потім із осаду екстрагували пектини гарячою DН₂O на водній бані при температурі 45 °С впродовж 90 хв; екстракт знову фільтрували. Отриманий осад заливали 0,3 н НСІ (50 мл) на 90 хв при кімнатній температурі для видалення протопектину. Фільтрацію осаду повторювали, далі при 80 °С з осаду екстрагували геміцелюлози впродовж 5 год з використанням 2 % НСІ, після чого осад промивали DН₂O до нейтральної реакції.

Отриманий осад однієї (першої) проби 2 год гідролізували 72%-ною Н₂SO₄, далі нейтралізували основою, переносили в мірну колбу на 250 мл, доводили до мітки і в аліквоті визначали редуковані сахари по Бертрану за формулою

$$X = aV \cdot 100/V_n,$$

де X – вміст цукру, %; a – кількість цукрів у взятому об'ємі (V), яку знайдено за номограмою (калібрувальна крива, побудована по глюкозі), мг; V – об'єм витяжки, яку отримано із наважки, мл; V_i – проба витяжки, яка взята для визначення, мл; n – маса наважки, г. Та-

ким чином вираховували загальний вміст цукрів, величину якого множили на коефіцієнт 0,9 [13, с. 164], та отримували загальний вміст целюлози в листках.

Осад другої проби 3 год гідролізували 12%-ною HCl. В цих умовах гідролізується аморфна форма целюлози. Отриману після гідролізу рідину нейтралізували основою, переносили в мірну колбу на 250 мл, доводили до мітки і в аліквоті визначали редуковані цукри по Бертрану, аналогічно як і в першій пробі. Вміст кристалічної целюлози визначали за різницею між загальним вмістом целюлози та вмістом аморфної целюлози. Одержані дані обробляли статистично. Повторність дослідів чотириразова.

Результати досліджень та їх обговорення. Фаза бутонізації. Виміри вологості ґрунту, на якому зростали рослини повітряно-водного еко типу у веху, показали, що ця величина становила $71,8 \pm 3,4 \%$, а сонячна освітленість над верхньою епідермою листків – 1500–1600 мкмоль квантів/м²с⁻¹.

Цитохімічне дослідження локалізації целюлози у листках повітряно-водного еко типу веху показало, що целюлоза флуоресціювала зеленим кольором в оболонках адаксіального та абаксіального епідермісу, палісадної та губчасті паренхіми (рис. 1, а–в). У зовнішніх оболонках епідермісу флуоресценцію комплексу виявляли по всій поверхні клітин. В антиклінальних оболонках епідермісу та оболонках мезофілу флуоресценція целюлози також була рівномірна, але її інтенсивність істотно відрізнялась в оболонках верхньої та нижньої епідерми: у зовнішніх оболонках вона становила $180,71 \pm 19,94$ та $139,54 \pm 8,95$ відносних одиниць (пікселей), у антиклінальних оболонках та оболонках мезофілу була вдвічі нижчою (табл. 1; рис. 1, г–є, гістограми).

Біохімічний аналіз вмісту целюлози у листових пластинках повітряно-водних особин веху показав, що загальний вміст целюлози був високим (табл. 2). Целюлоза листових пластинок в своєму складі містила аморфну та кристалічну форми, вміст яких становив $79,0 \pm 3,14$ та $129,0 \pm 8,80$ мг/г⁻¹ сухої маси відповідно; відношення аморфної целюлози до кристалічної дорівнювало 0,61 (табл. 2).

Виміри вологості ґрунту, на якому зростали рослини суходільного еко типу веху, показали,

що ця величина була вдвічі нижча, ніж у рослин повітряно-водного еко типу, і становила $33,7 \pm 2,4 \%$. Сонячна освітленість над верхньою епідермою та під нижньою епідермою листків

Таблиця 1
Інтенсивність флуоресценції комплексу калькофлуор – целюлоза в клітинних оболонках листків *S. latifolium* у фазі бутонізації

Тканина/клітинна оболонка	Інтенсивність люмінесценції (відносні одиниці, пікселі) комплексу калькофлуор – целюлоза у клітинних оболонках листків веху	
	у воді	на суходолі
Верхній епідерміс		
зовнішня оболонка основних клітин епідермісу	$180,7 \pm 19,9$	$246,9 \pm 8,7^{**}$
антиклінальна оболонка	$92,6 \pm 5,2$	$102,8 \pm 8,0^*$
Палісадна паренхіма	$66,7 \pm 4,4$	$117,1 \pm 4,0^{***}$
Губчаста паренхіма	$79,5 \pm 5,2$	$142,4 \pm 8,8^{***}$
Нижній епідерміс		
зовнішня оболонка основних клітин епідермісу	$139,5 \pm 8,9$	$193,5 \pm 7,8^{***}$
антиклінальна оболонка	$87,5 \pm 6,6$	$115,2 \pm 8,5^{**}$

* $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$ (Достовірно відрізняються від значень у листках повітряно-водного еко типу веху).

Таблиця 2
Вміст целюлози в листових пластинках *S. latifolium* у фазі бутонізації

Целюлоза	Вміст целюлози у листках веху	
	у воді	на суходолі
Загальний вміст целюлози (мг · г ⁻¹ сухої маси)	$208,3 \pm 11,82$	$226,1 \pm 9,10$
Вміст аморфної целюлози (мг · г ⁻¹ сухої маси)	$79,0 \pm 3,14$	$71,5 \pm 0,90^*$
Процент аморфної целюлози	38,0	31,4
Вміст кристалічної целюлози (мг · г ⁻¹ сухої маси)	$129,0 \pm 8,80$	$154,6 \pm 5,24^*$
Відношення аморфної целюлози/кристалічної целюлози	0,61	0,46

* $P \leq 0,05$ (Достовірно відрізняються від значень у листках повітряно-водного еко типу веху).

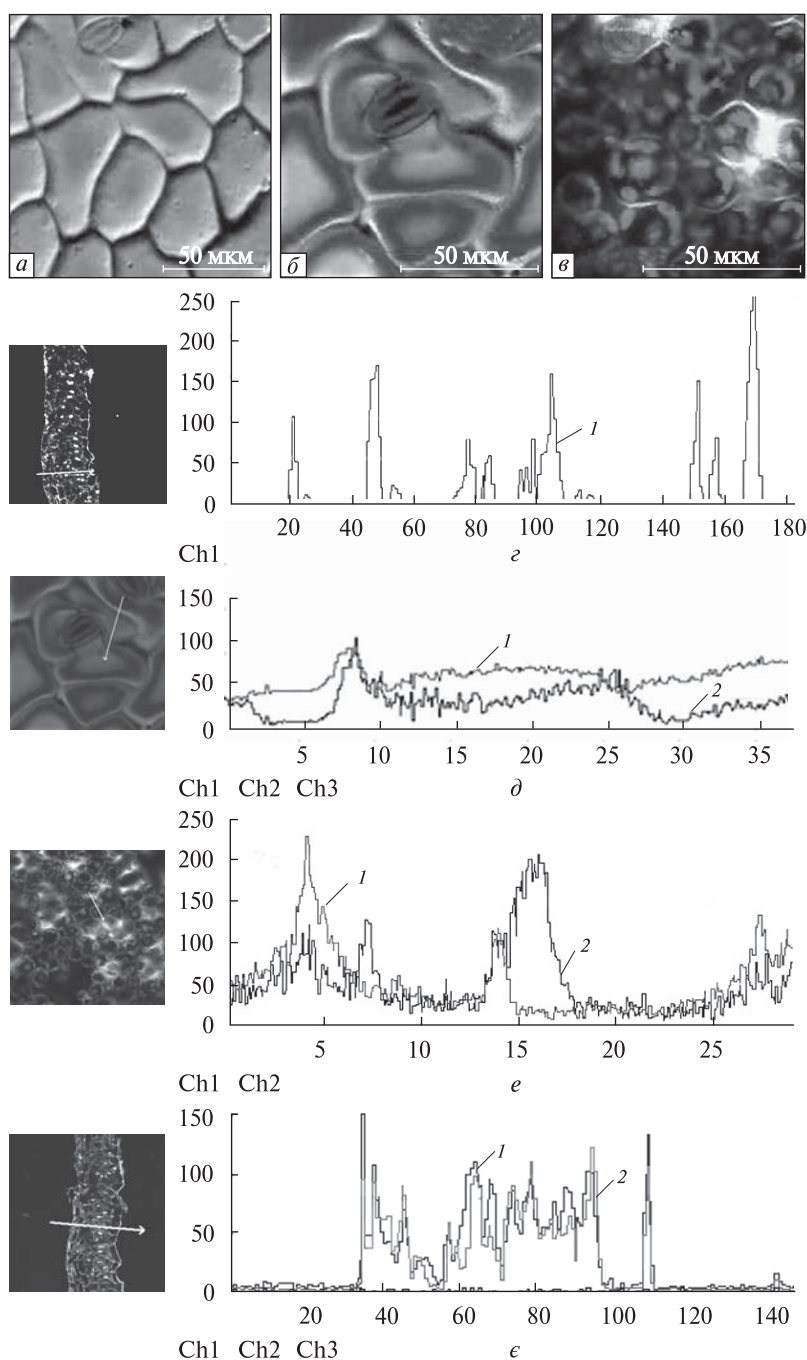


Рис. 1. Лазерно-конфокальна мікроскопія зрізів листових пластинок повітряно-водного екотипу *S. latifolium* у фазі бутонізації: *a* – адаксіальний епідерміс; *б*, *д* – абаксіальний епідерміс; *в*, *е* – палисадна паренхіма; *z*, *e* – епідерміс та мезофіл на поперечному зрізі листка. Цитохімічна реакція на целюлозу (фарбування калькофлуором). На гістограмах (*z*–*e*) показано розподіл інтенсивності флуоресценції комплексу калькофлуор – целюлоза (*1*) та автофлуоресценції хлорофілу (*2*) у клітинах. На гістограмах (зліва) білими стрілками вказані лінії, за якими було проведено сканування; по вертикалі – інтенсивність флуоресценції у відносних одиницях, пікселі; по горизонталі – просканована відстань, мкм. Масштаб – 50 мкм

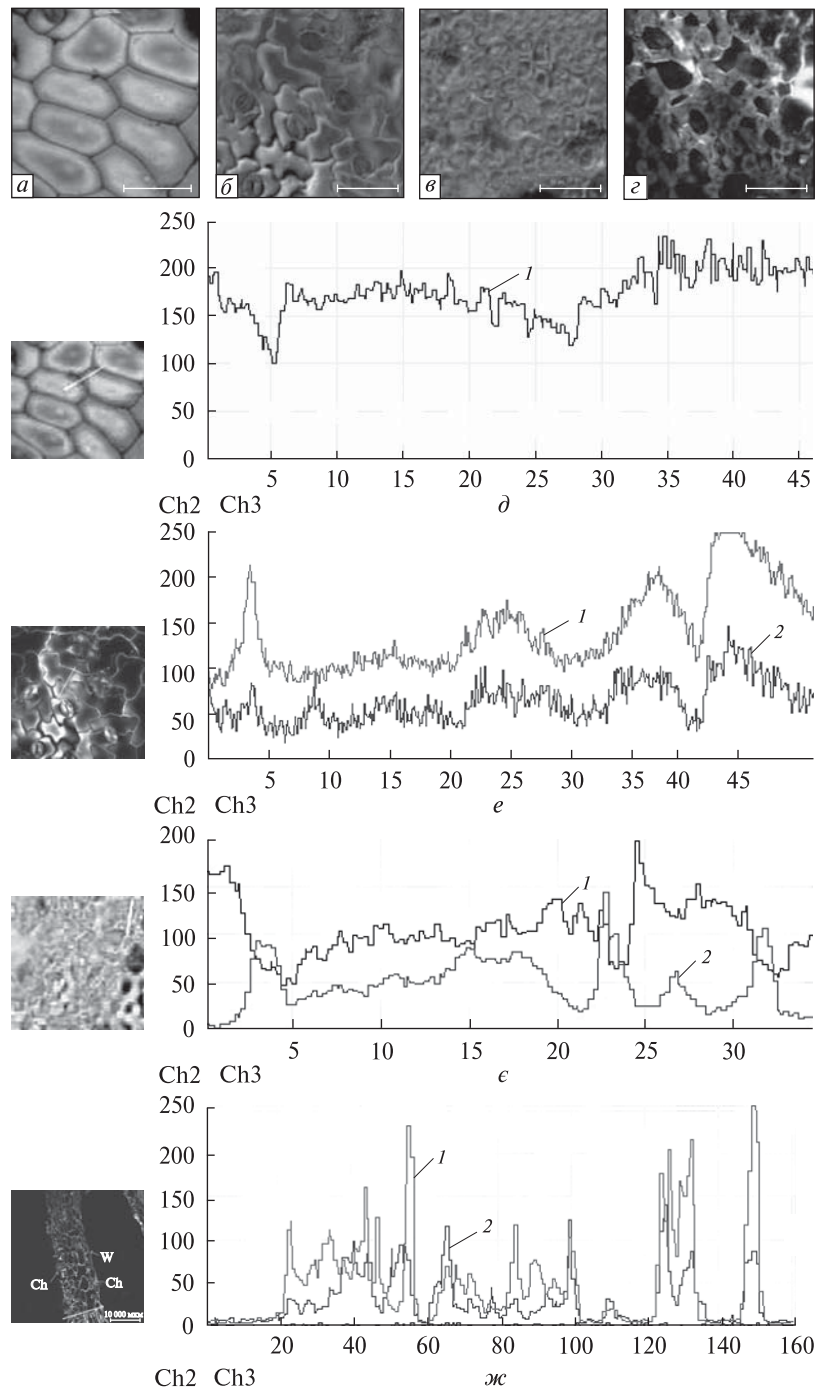


Рис. 2. Лазерно-конфокальна мікроскопія зрізів листкових пластинок суходільного екотипу *S. latifolium* у фазі бутонізації: *a, d* – адаксіальний епідерміс; *б, e* – абаксіальний епідерміс; *в, e* – палисадна паренхіма, *z* – губчаста паренхіма; *ж* – епідерміс та мезофіл на поперечному зрізі листка. Цитохімічна реакція на целюлозу (фарбування калькофлуором). На гістограмах (*д–ж*) показано розподіл інтенсивності флуоресценції комплексу калькофлуор – целюлоза (1) та автофлуоресценції хлорофілу (2) у клітинах. На гістограмах (зліва) білими стрілками вказані лінії, за якими було проведено сканування; по вертикалі – інтенсивність флуоресценції у відносних одиницях, пікселі; по горизонталі – просканована відстань, мкм. Масштаб – 50 мкм

Таблиця 3
Інтенсивність флуоресценції комплексу калькофлуор – целюлоза в клітинних оболонках листків *S. latifolium* у фазі плодоношення

Тканина/клітинна оболонка	Інтенсивність люмінесценції (відносні одиниці, пікселі) комплексу калькофлуор – целюлоза у клітинних оболонках листків веху	
	у воді	на суходолі
Верхній епідерміс зовнішня оболонка ос-новних клітин епідермісу	219,9 ± 5,4	243,0 ± 9,8**
антиклінальна оболонка	106,0 ± 5,1	127,8 ± 6,4*
Палісадна паренхіма	84,3 ± 3,9	100,8 ± 4,5**
Губчаста паренхіма	92,6 ± 4,0	121,3 ± 4,2***
Нижній епідерміс зовнішня оболонка ос-новних клітин епідермісу	206,0 ± 5,1	203,4 ± 6,2
антиклінальна оболонка	92,5 ± 6,1	99,7 ± 5,8

* P ≤ 0,05; ** P ≤ 0,01; *** P ≤ 0,001 (Достовірно відрізняються від значень у листках повітряно-водного екотипу веху).

була низькою і становила 290 ± 10 мкмоль квантів/м²с⁻¹.

Цитохімічне дослідження локалізації целюлози у листках *S. latifolium* показало, що целюлоза флуоресціювала зеленим кольором у клітинних оболонках всіх тканин (рис. 2, а–є). У зовнішніх оболонках епідермісу флуоресценція комплексу виявлялась по всій поверхні клітин. В антиклінальних оболонках епідермісу та оболонках мезофілу флуоресценція целюлози була рівномірною, але інтенсивність флуоресценції целюлози відрізнялась. Рівень інтенсивності флуоресценції комплексу калькофлуор – целюлоза представлені в табл. 1 та на рис. 2, д–ж (гістограми). Інтенсивність флуоресценції відрізнялась у оболонках верхньої та нижньої епідерми: у зовнішніх оболонках вона становила 246,95 ± 8,76 та 193,57 ± 7,80 відносних одиниць, у антиклінальних оболонках була вдвічі нижчою (табл. 1). В оболонках мезофілу інтенсивність флуоресценції целюлози також була удвічі нижча, ніж у зовнішніх оболонках епідермальних клітин.

Біохімічний аналіз показав, що загальний вміст целюлози у листках суходільного екоти-

пу веху достовірно не відрізнявся від значень целюлози у листках повітряно-водного екотипу (табл. 2), але співвідношення аморфної до кристалічної целюлози знизилось майже у півтора рази. Вміст аморфної форми целюлози становив 71,5 ± 0,90, кристалічної – 154,6 ± 5,24 мг/г⁻¹ сухої маси відповідно; відношення аморфної целюлози до кристалічної становило 0,46 (табл. 2).

Фаза плодоношення. Вологість ґрунту, на якому росли особини повітряно-водного екотипу, достовірно не змінилась у порівнянні з фазою бутонізації. Освітленість була досить високою і становила в середньому 1700 мкмоль квантів/м²с⁻¹ над верхньою поверхнею листків.

Лазерно-конфокальна мікроскопія листків веху повітряно-водного екотипу показала, що целюлоза клітинних оболонок адаксіального, абаксіального епідермісу та мезофілу (рис. 3, а–в) флуоресціювала зеленим кольором. Рівні інтенсивності флуоресценції комплексу калькофлуор – целюлоза представлені в табл. 3 та на рис. 3, г, д. Виявлено підвищення інтенсивності флуоресценції целюлози у зовнішніх оболонках клітин верхньої та нижньої епідерми, а також в оболонках клітин мезофілу в порівнянні із інтенсивністю флуоресценції у клітинних оболонках листків повітряно-водного екотипу веху в фазі бутонізації (табл. 1 і 3).

Біохімічний аналіз показав, що загальний вміст целюлози у листках веху, який зростав у воді в фазі плодоношення, був у 1,4 раза вищим, ніж у фазі бутонізації (табл. 2 і 4). Целюлоза листових пластинок також містила аморфну та кристалічну форми, вміст яких становив 56,72 ± 2,71 та 178,0 ± 6,45 мг/г⁻¹ сухої маси відповідно. Відношення аморфної целюлози до кристалічної дорівнювало 0,32 (табл. 4); це значення було удвічі меншим, ніж у фазі бутонізації.

За умов помірного водного дефіциту вологість ґрунту, на якому росли особини суходільної форми веху, була нижча у ґрунті суходільних рослин в фазі бутонізації; вона становила 26,7 ± 1,6 %. Сонячна освітленість над верхньою епідермою листків дорівнювала 300 ± 10 мкмоль квантів/м²с⁻¹.

Цитохімічне дослідження локалізації целюлози у листках суходільних особин веху пока-

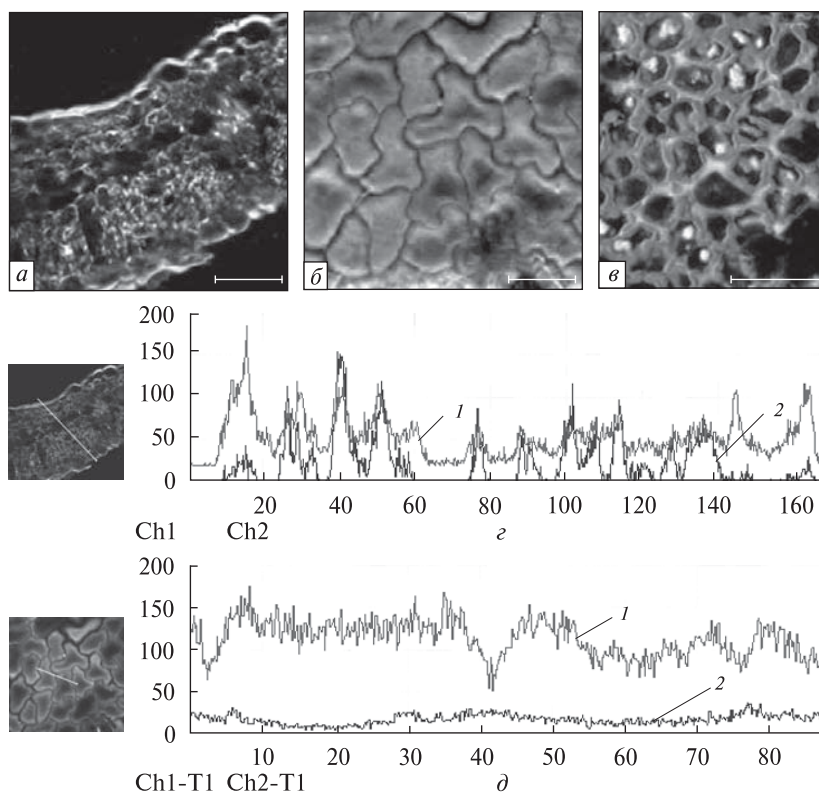


Рис. 3. Лазерно-конфокальна мікроскопія зрізів листкових пластинок повітряно-водного екотипу *S. latifolium* у фазі плодоношення: *a, z* – поперечні зрізи листка; *б, д* – адаксіальний епідерміс; *в* – палисадний мезофіл. Цитохімічна реакція на целюлозу (фарбування калькофлуором). На гістограмах (*z, д*) показано розподіл інтенсивності флуоресценції комплексу калькофлуор – целюлоза (*1*) та автофлуоресценції хлорофілу (*2*) у клітинах. На гістограмах (зліва) білими стрілками вказані лінії, за якими було проведено сканування; по вертикалі – інтенсивність флуоресценції у відносних одиницях, пікселі; по горизонталі – просканована відстань, мкм. Масштаб – 50 мкм

зало яскраво-зелену флуоресценцію целюлози в оболонках адаксіального та абаксіального епідермісу, палисадної та губчастої паренхіми (рис. 4, *a–в*). Рівень інтенсивності флуоресценції целюлози представлений в табл. 3 та на рис. 4, *z–e* (гістограми). Інтенсивність флуоресценції целюлози була більша у оболонках адаксіального епідермісу та клітинах мезофілу в порівнянні з даними інтенсивності флуоресценції у клітинних оболонках листків повітряно-водного екотипу в цій же фазі. Ці величини достовірно не відрізнялись від інтенсивності флуоресценції у клітинах листків цього екотипу в фазі бутонізації.

Біохімічний аналіз листків суходільних особин веху показав, що загальний вміст целюлози у листкових пластинках становив $249,61 \pm 7,43$ мг/г⁻¹ сухої маси, що достовірно не відрізнялось від вмісту целюлози у листках рос-

лин повітряно-водного екотипу в цій фазі (табл. 4). Вміст аморфної та кристалічної форм целюлози змінився у порівнянні із таким у листках повітряно-водних рослин у цій же фазі і становив $34,75 \pm 2,47$ та $214,9 \pm 4,84$ мг/г⁻¹ сухої маси відповідно; відношення аморфної целюлози до кристалічної становило 0,16 (табл. 4).

Таким чином, цитохімічні та біохімічні дослідження складу та розподілу целюлози у клітинах листків веху широколистої показали, що целюлоза є чутливим біополімером клітинної оболонки, вміст та склад якої у листках *S. latifolium* змінювався в процесі розвитку рослин (від фази бутонізації до початку плодоношення).

Цитохімічний аналіз показав, що у клітинах епідерми та мезофілу листків *S. latifolium* спостерігався певний розподіл целюлози незалежно від фази росту чи екотипу веху: досто-

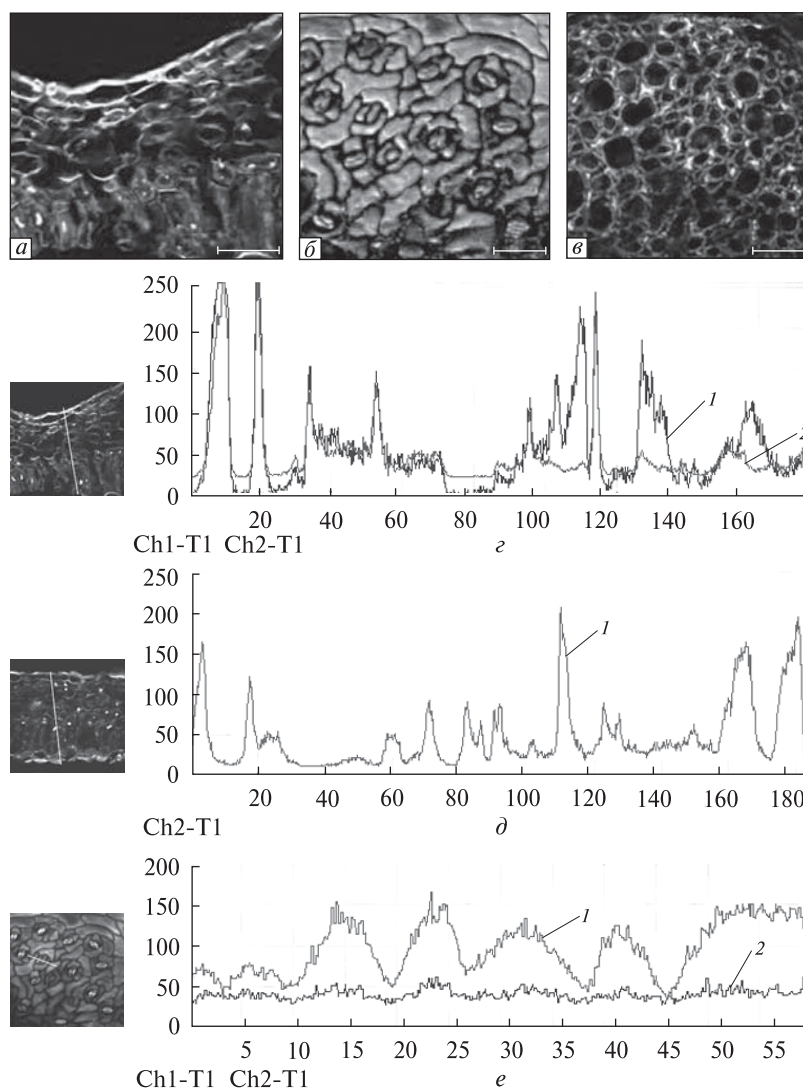


Рис. 4. Лазерно-конфокальна мікроскопія зрізів листкових пластинок суходільного екотипу *S. latifolium* у фазі плодоношення: *a, c, d* – поперечні зрізи листка; *b, e* – абаксальний епідерміс; *c* – палисадна паренхіма. Цитохімічна реакція на целюлозу (фарбування калькофлуором). На гістограмах (*c–e*) показано розподіл інтенсивності флуоресценції комплексу калькофлуор – целюлоза (1) та автофлуоресценції хлорофілу (2) у клітинах. На гістограмах (зліва) білими стрілками вказані лінії, за якими було проведено сканування; по вертикалі – інтенсивність флуоресценції у відносних одиницях, пікселі; по горизонталі – просканована відстань, мкм. Масштаб – 50 мкм

вірно вищий відносний вміст целюлози у клітинних оболонках епідермісу у порівнянні із вмістом целюлози в клітинних оболонках палисадної та губчастої паренхіми. Відомо, що зовнішні оболонки основних клітин епідерми листків виконують як транспіраційну функцію, так і захисну. Зовнішні оболонки клітин епідерми є першим захисним бар'єром листків при дії біотичних та абіотичних факторів; ці оболонки синтезують більше полісахаридів, ніж

клітинні оболонки паренхіми [1, 2, 14]. Карпіта та ін. [15], досліджуючи в процесі росту біохімічні та біофізичні параметри колеоптіля *Zea mays*, встановили, що зовнішні оболонки епідермісу у вісім разів товщі та містять удвічі більше целюлози, ніж оболонки клітин мезофілу.

Враховуючи ці дані та результати наших досліджень, можна говорити, що у клітинах листків вежу незалежно від екотипу рослини

відбувається нерівномірний синтез целюлози в епідермісі та мезофілі аналогічно тому, як це можна спостерігати у листках та стеблах культурних рослин.

Біохімічне визначення вмісту целюлози у листках водного та суходільного екотипів *S. latifolium* показало, що помірний водний дефіцит спричиняв збільшення загального вмісту целюлози на 10 % лише у фазі бутонізації, тоді як у фазі плодоношення змін загального вмісту целюлози не виявлено.

Підвищення вмісту целюлози описане при дії підвищеної температури на рослини та в процесі формування вторинної клітинної оболонки на ранніх фазах росту стебла бавовнику [2]. Відомо, що для синтезу целюлози необхідна певна кількість її попередників та активація целюлозосинтез, які кодуються родиною генів *CesA* [16], одні із яких (*CesA 1*, *CesA 3* та *CesA 6*) відповідають лише за синтез целюлози у первинній оболонці, інші (*CesA 4*, *CesA 7* та *CesA 8*) – за синтез целюлози у вторинній оболонці [16–19].

Таким чином, можна зробити припущення, що за умов водного дефіциту в листках веху збільшення вмісту целюлози у фазі бутонізації може статись внаслідок активації певних генів.

Ми виявили, що тривалий водний дефіцит викликає зниження вмісту аморфної та збільшення кристалічної форми целюлози у листках веху. Причин отриманого може бути кілька. По-перше, встановлено, що вода адсорбується саме аморфними зонами целюлози при шостому гідроксилі (6-OH⁻) одного із ланцюгів молекули аморфної целюлози [20]. Кристалічна форма целюлози не адсорбує воду. Крім того, порівняльне дослідження молекулярними методами синтезу целюлози у проростків дикого виду *Arabidopsis thaliana* та мутанту *A. thaliana* по локусу *RSW1* [21], а також вивчення синтезу целюлози у клітинних оболонок епідермісу пелюсток петунії *Petunia hybrida* дикого виду та мутанту *P. hybrida* по гену *PhEXP1* [20] показали, що мутантний алель *RSW1* відповідає за зниження синтезу целюлози та накопичення аморфної форми целюлози, а ген *PhEXP1* петунії кодує білок клітинної оболонки експансин, який, можливо, і викликає зміни біосинтезу целюлози.

Таблиця 4
Вміст целюлози в листових пластинках *S. latifolium* у фазі плодоношення

Целюлоза	Вміст целюлози у листках веху	
	у воді	на суходолі
Загальний вміст целюлози (мг · г ⁻¹ сухої маси)	235,53 ± 8,23	249,61 ± 7,43
Вміст аморфної целюлози (мг · г ⁻¹ сухої маси)	56,72 ± 2,71	34,75 ± 2,47*
Процент аморфної целюлози	23,8	13,9
Вміст кристалічної целюлози (мг · г ⁻¹ сухої маси)	178,0 ± 6,5	214,9 ± 4,84*
Відношення аморфної целюлози/кристалічної целюлози	0,32	0,16

* P ≤ 0,05 (Достовірно відрізняються від значень у листках повітряно-водного еко типу веху).

Враховуючи одержані нами дані про вплив водного дефіциту на істотні зміни співвідношення обох форм целюлози та дані літератури, можна зробити припущення, що зміни складу целюлози листків веху в умовах природного водного дефіциту обумовлені зниженням адсорбції води апопластом як наслідок змін структури целюлози при експресії відповідних генів. Ці питання лишаються відкритими і потребують подальшого дослідження.

Автор висловлює щире подяку члену-кореспонденту НАН України, професору Є.Л. Кордюм за зауваження та цінні поради при розгляді рукопису статті.

O.M. Nedukha

CYTOCHEMICAL AND BIOCHEMICAL STUDY OF CELLULOSE OF SIUM LATIFOLIUM LEAVES UNDER THE INFLUENCE OF WATER DEFICIT

The distribution of cellulose in the cells of epidermis and mesophyll of *Sium latifolium* leaves at the phases of flowering and seedling by the laser-confocal microscopic method has been investigated. The dependence of the relative content of cellulose in cell walls on the tissue type, phase of plant ontogenesis and the environment conditions has been established by using of PASCAL Program. It has been revealed that moderate water deficit leads to decrease of amorphous cellulose content and to increase of crystalline cellulose content during plant growth.

Е.М. Недуха

ЦИТОХИМИЧЕСКИЙ И БИОХИМИЧЕСКИЙ
АНАЛИЗ ЛОКАЛИЗАЦИИ И СОДЕРЖАНИЯ
ЦЕЛЛЮЛОЗЫ В ЛИСТЬЯХ *SIUM LATIFOLIUM*
В УСЛОВИЯХ ВОДНОГО ДЕФИЦИТА

Методом лазерно-конфокальной микроскопии исследовано распределение целлюлозы в клетках эпидермиса и мезофилла листьев *Sium latifolium* в фазе бутонизации и плодоношения. С помощью программного обеспечения PASCAL установлено, что относительное содержание целлюлозы в клеточных оболочках зависит от типа ткани, фазы онтогенеза и условий роста растения. Биохимическим методом выявлено, что умеренный водный дефицит снижает содержание аморфной целлюлозы и увеличивает содержание кристаллической целлюлозы.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Brown R. M. The biosynthesis of cellulose // J. Macromol. Sci. Pure Appl. Chem. — 1996. — **A33**. — P. 1345–1373.
2. Тарчевский И.А., Марченко Г.Н. Биосинтез и структура целлюлозы. — М.: Наука, 1985. — 280 с.
3. Kataoka Y., Kondo T. Quantitative analysis for the cellulose 1- α crystalline phase in developing wood cell walls // Intern. J. Biol. Macromol. — 1999. — **24**, № 1. — P. 37–41.
4. Taylor N.G., Schible W.-R., Cutler S., Sumerville C.R., Turner S.R. The *irregular xylem3* locus of *Arabidopsis* encodes a cellulose synthase required for secondary cell wall synthesis // Plant Cell. — 1999. — **11**. — P. 769–780.
5. Atalla R. The individual structures of native celluloses // Proc. of 10 Intern. Symp. on wood and pulping chemistry, TAPPI Press. — 2004. — **1**. — P. 608–614.
6. Baran M., Varadyova Z., Kracmar S., Hedbavny J. The common reed (*Phragmites australis*) as a source of roughage in *Ruminant* nutrient // Acta Veg. Brno. — 2002. — **71**. — P. 445–449.
7. Кордюм Е.Л., Сьтник К.М., Бараненко В.М., Белявская Н.А., Климчик Д.А., Недуха Е.М. Клеточные механизмы адаптации растений к неблагоприятным воздействиям экологических факторов в естественных условиях. — Киев: Наук. думка, 2003. — 275 с.
8. Nowak E.J., Martin G.E. Physiological and anatomical responses to water deficit in the CAM epiphyte *Tillandsia ionantha* (Bromeliaceae) // Intern. J. Plant Sci. — 1997. — **158**. — P. 818–826.
9. Iraki N., Bressan R., Nasegawa P., Carpita C. Alteration of the physical and chemical structure of the primary cell wall of growth-limited plant cells adapted to osmotic stress // Plant Physiol. — 1989. — **91**, № 1. — P. 39–47.
10. Sakurai N., Tanaka S., Kuraishi S. Changes in wall polysaccharides of Squash (*Cucurbita maxima* Duch.) hypocotyls under water stress condition. 1. Wall sugar composition and growth as affected by water stress // Plant Cell Physiol. — 1987. — **28**, № 6. — P. 1051–1058.
11. Sakurai N., Tanaka S., Kuraishi S. Changes in wall polysaccharides of Squash (*Cucurbita maxima* Duch.) hypocotyls under water stress condition. 2. Composition of pectin and hemicelluloses polysaccharides // Plant Cell Physiol. — 1987. — **28**, № 6. — P. 1059–1070.
12. Herth W. Calcofluor white and congo-red inhibit microfibril assembly of *Poteriochromonas*: evidence for a gap between polymerization and microfibril formation // J. Cell Biol. — 1980. — **84**, № 4. — P. 642–658.
13. Арасимович А.А., Ермаков А.И. Определение полисахаридов и лигнина // Методы биохимического исследования растений / Ред. А. И. Ермаков. — Л.: ВО Агропромиздат, 1987. — С. 143–172.
14. Лясковский М.И. Полегание злаков и пути его предотвращения // Физиология и биохимия культур растений. — 1991. — **23**, № 4. — С. 315–328.
15. Carpita N., Defernez M., Findlay K., Wells B., Shoue D., Catchpole G., Wilson R., McCann M. Cell wall architecture of the elongating maize coleoptile // Plant Physiol. — 2001. — **127**. — P. 551–565
16. Richmond T., Somerville C. The cellulose synthase superfamily // Plant Physiol. — 2000. — **124**. — P. 495–498
17. Delmer D.P. Cellulose biosynthesis: exciting times for a difficult field of study // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. — 1999. — **50**. — P. 245–276.
18. Taylor N.G., Laurie S., Turner S. Multiple cellulose synthase catalytic subunits are required for cellulose synthesis in *Arabidopsis* // Plant Cell. — 2000. — **12**. — P. 2529–2540.
19. Bray E.A. Genes commonly regulated by water-deficit stress in *Arabidopsis thaliana* // J. Exp. Bot. — 2004. — **55**. — P. 2331–2341.
20. Zenoni S., Reale L., Tornielli G.B., Lanfaloni L., Porceddu A., Ferrarini A., Moretti M., Zamboni A., Spighini A., Ferranti F., Pezzotti M. Down regulation of the *Petunia hybrida* α -expansin gene *PhEXP1* reduces the amount of crystalline cellulose in cell walls and leads to phenotypic changes in petal limbs // Plant Cell. — 2004. — **16**. — P. 295–308.
21. Arioli T., Peng L., Betzner A., Burn J., Wittke W., Herth W., Camilleri Ch., Hofte H., Plazinski J., Birch R., Cork A., Glover J., Redmond J., Williamson R. Molecular analysis of cellulose biosynthesis in *Arabidopsis* // Science. — 1998. — **279**, № 5351. — P. 717–720.

Надійшла 06.02.08