



УДК 576.31:582.536

УЧАСТЬ МОНОЛІГНІВ У ПРИРОДНІЙ АДАПТАЦІЇ TRAPA NATANS L. ДО ВОДНОГО СЕРЕДОВИЩА

ОЛЕНА М. НЕДУХА

Анотація. Цитохімічним методом вивчена локалізація та розподіл монолігнів (сирингілу та гваяцилу) у клітинних оболонках епідермісу, фотосинтезуючої паренхіми та судин провідних пучків плаваючих та підводних листків *Trapa natans* L. (водяного горіха) у фазі вегетативного росту. Встановлені відмінності у розподілі та вмісті складових лігніну у клітинних оболонках досліджуваних тканин вказують на диференціальний синтез сирингілу та гваяцилу, який обумовлений диференціацією клітин, водним середовищем та виходом листків із води на повітря. Показана позитивна кореляція між вмістом сирингілу у клітинних оболонках, співвідношенням сирингіл/гваяцил та місцем зростання листків (у воді чи над водою).

Ключові слова: *Trapa natans*, лігнін, сирингіл, гваяцил, плаваючі та підводні листки

Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України, вул. Терещенківська, 2, Київ, 01601, Україна; onedukha@hotmail.com

Вступ

Лігнін – розгалужений полімер ароматичних спиртів, який разом із геміцелюлозами та пектином діє як клейстерний матрикс для мікрофібрил целюлози. Лігнін забезпечує механічну міцність тканин та органів, непроникність води та водних розчинів через клітинні оболонки судин провідних пучків, що робить трахеїди здатними транспортувати воду та водні розчини на великі відстані. Крім того, лігнін захищає протопласт клітини від вторгнення патогенів. Лігнін є похідним амінокислоти феніланіну, і представляє собою комплекс монолігнолів (фенілпропаноїдів), які утворюються із р-гідроксифенілових (hydroxyphenyl, H), гваяцилових (guaiaacyl, G) та сирингілових (syringyl, S) складових (FREUDENBERG & NEISH 1968; ADLER 1977), що включаються у полімеризацію лігніну і різняться ступенем метоксилювання (LEISOLA *et al.* 2012). Склад, вміст та молекулярна маса лігніну залежать від виду, положення стебел чи листків на пагоні, та від положення клітини у тканині. З'єднання між мезомерними радикальними мономерами відбувається двома типами

зв'язків: аріл-алкіл- β -O-4 ефірних та С-С-зв'язків (JOSELEAU & RUEL 1997). Точний механізм, який контролює утворення монолігнів у біополімері (лігніні) рослин невідомий (КУККОЛА *et al.* 2003).

Сирингіловий монолігнін в основному входить до складу лігніну квіткових рослин та трав'янистих спорових рослин (із родини селазинелові), тоді як гідроксифеніловий (H) та гваяциловий (G) монолігніни входять до складу лігніну багатьох судинних рослин (WENG *et al.* 2010). У голонасінних лігнін деревини збагачений G та H одиницями. У покритонасінних склад лігніну міняється в залежності від виду, тканини та клітини. Так у клітинах фібрил і паренхіми стебла лігнін в основному містить сирингіловий монолігнін, тоді як клітинні оболонки трахеальних елементів та ксилеми – гваяциловий монолігнін (WENG *et al.* 2008, 2010). Лігнін дводольних рослин частіше складається із G та S складових, і дуже мало містить H фенілпропаноїдів. У більшості однодольних у лігніні є G та S одиниці, вміст яких майже однаковий, вони також можуть містити й H одиниці (VAUSNER *et al.* 1998). Питання щодо наявності, співвідношення та ролі фенілпропаноїдів у клітинних оболонках

листіків гідрофітів лишається відкритим. Метою роботи було дослідження вмісту і розподілу складових лігніну у клітинних оболонках плаваючих і підводних листків водяного горіха.

Матеріали і методи досліджень

Об'єктом дослідження були плаваючі та підводні листки *Trapa natans* L., які закінчили ріст розтягом та росли на однаковій глибині (до 1 метра). Листки рослин збирали у червні на березі Русанівського каналу (лівий берег Дніпра в Києві). Для аналізу брали придонні (підводні) та периферійні плаваючі листки, що формували розетку. Для досліджень вирізали серединну частину пластинки розміром $\approx 10 \times 15$ мм (на віддалі 4-5 мм від краю) у плаваючих листків; у розсічених підводних листків брали відрізки 10-15 мм довжиною по середині голковидної частки (в основі листка). Для виявлення складових лігніну (сирингілу та гваяцилу) застосовували цитохімічний метод фарбування живих тканин 0,25% розчином 2-аміноетилефіру дифеніл карбонової кислоти (DPBA, diphenilboric acid-2 feniethyl ester, Sigma) згідно стандартного протоколу (Wuyts et al. 2006). Пофарбовані відрізки листкових пластинок ретельно промивали фосфатним буфером (pH 7,2), дофіксували 1% ПФА на ідентичному буфері й вивчали за допомогою лазерного скануючого мікроскопа (LSM 5 Pascal, Carl Zeiss, Germany).

Виявлення сирингілу проводили з використанням лазерного каналу, при збудженні світла 340-380 нм та пропусканні – 430 нм; виявлення гваяцилу – при збудженні 450-490 нм та пропусканні 520 нм, відповідно. Для дослідження автолюмінесценції хлорофілів використовували лазер з довжини хвилі збудження 520 нм і хвилі емісії – 662 нм. Комплекс DPBA + сирингіл флуоресціював синім кольором, комплекс DPBA + гваяцил – зеленим, автолюмінесценція хлорофілу – червоним кольором, відповідно.

За допомогою програми "Pascal" проводили визначення відносного вмісту сирингілу та гваяцилу в клітинних оболонках листків. Для статистичної обробки даних брали три рослини, з кожної рослини брали по три плаваючих і три придонних листки;

у кожному листку досліджували по 30-40 клітин епідермісу, стільки ж клітин мезофілу, та по 7-15 клітин судин із провідного пучка. Біологічна повторність трьохкратна.

Результати та їх обговорення

Плаваючі листки. Цитохімічний аналіз локалізації сирингілу та гваяцилу у тканинах плаваючих листків водяного горіха показав, що досліджувані монолігніли виявлялись у периклінальних оболонках верхньої та нижньої епідерми, в оболонках палісадної та губчастої паренхіми, а також в оболонках судин провідних пучків (Рис. 1 А, Б). Комплекс сирингіл + DPBA флуоресціював синім кольором, що добре видно в периклінальних оболонках обох епідерм, тоді як комплекс гваяцил + DPBA – флуоресціював яскраво зеленим кольором, що можна бачити в оболонках мезофілу. Необхідно відмітити, що досліджувані монолігніли в антиклінальних оболонках верхньої епідерми більшості клітин були відсутні або ж містили лише слідові кількості, це стосується і гваяцилу в антиклінальних оболонках нижньої епідерми. Використання програми "Pascal" для кількісного виміру вмісту монолігнінів показало, що відносний вміст сирингілу та гваяцилу відрізнявся в оболонках досліджуваних тканин (Табл. 1): найвищі значення були у периклінальних оболонках верхньої епідерми та у судинах. По величині відношення сирингілу до гваяцилу (S/G) клітини розміщуються в наступному порядку: периклінальні оболонки адаксіального епідермісу > периклінальні оболонки абаксіального епідермісу > паренхіма > судини.

Встановлено, що максимальна інтенсивність флуоресценції сирингілу в епідермі та провідних пучках становила 250000 пікселів (Рис. 2 А; синя, верхня частина діаграми), максимальна інтенсивність флуоресценції гваяцилу становила 300000 пікселів (Рис. 2 А; зелена, нижня частина діаграми), максимальна інтенсивність автофлуоресценції хлорофілів в клітинах мезофілу становила 400000 пікселів (червона, середня частина діаграми, Рис. 2 А).

Підводні листки. Цитохімічне дослідження складових лігніну у клітинних оболонках підводних листків водяного

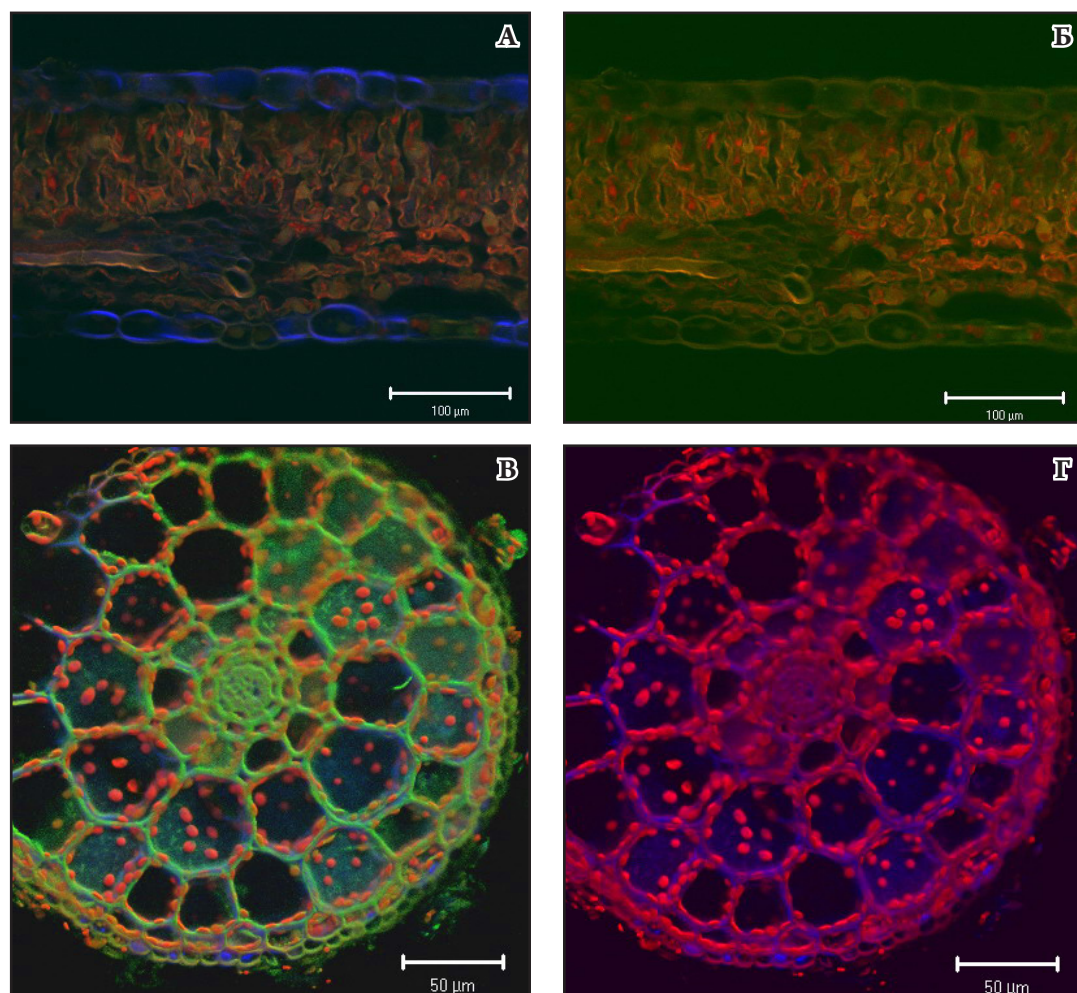


Рис. 1. Зрізи плаваючих (А, Б) та підводних листків (В, Г) *Trapa natans* після інкубації у розчині 2-аміноетилефіру дифеніл карбонової кислоти (DPBA). Комплекс DPBA + сирингіл у клітинних оболонках флуоресцює синім кольором (А, В); комплекс DPBA + гваяцил флуоресцює зеленим кольором (А, Б, В); автофлуоресценція хлорофілу має червоний колір.

Fig. 1. The sections of *Trapa natans* swimming (A, B) and submerged (B, Г) leaves after incubation with diphenilboric acid-2 feniethyl ester, DPBA. Complex of DPBA + syringyl in cell walls is fluoresced by blue color (A, B); complex of DPBA + quaiacyl is fluoresced by green color (A, B, B); chlorophyll auto fluorescence is red.

горіха показало, що клітини епідермісу всіх шарів фотосинтезуючої паренхіми та судин провідних пучків містили сирингіл та гваяцил, які флуоресціювали відповідно синім та зеленим кольором (Рис. 1 В, Г). Встановлено, що вміст гваяцилу у досліджуваних клітинах був вищим, ніж сирингілу (Табл. 1). По величині відношення S/G клітини розміщуються в наступному порядку: периклінальні оболонки епідермісу > фотосинтезуюча паренхіма > судини >

антиклінальні оболонки епідермісу.

Встановлено, що максимальна інтенсивність флуоресценції сирингілу в епідермі та провідних пучках становила 200000 пікселів (Рис. 2 Б: синя, верхня частина діаграми), максимальна інтенсивність флуоресценції гваяцилу становила 150000 пікселів (Рис. 2 Б: зелена, нижня частина діаграми), максимальна інтенсивність автофлуоресценції хлорофілів у клітинах мезофілу становила 400000 пікселів (червона,

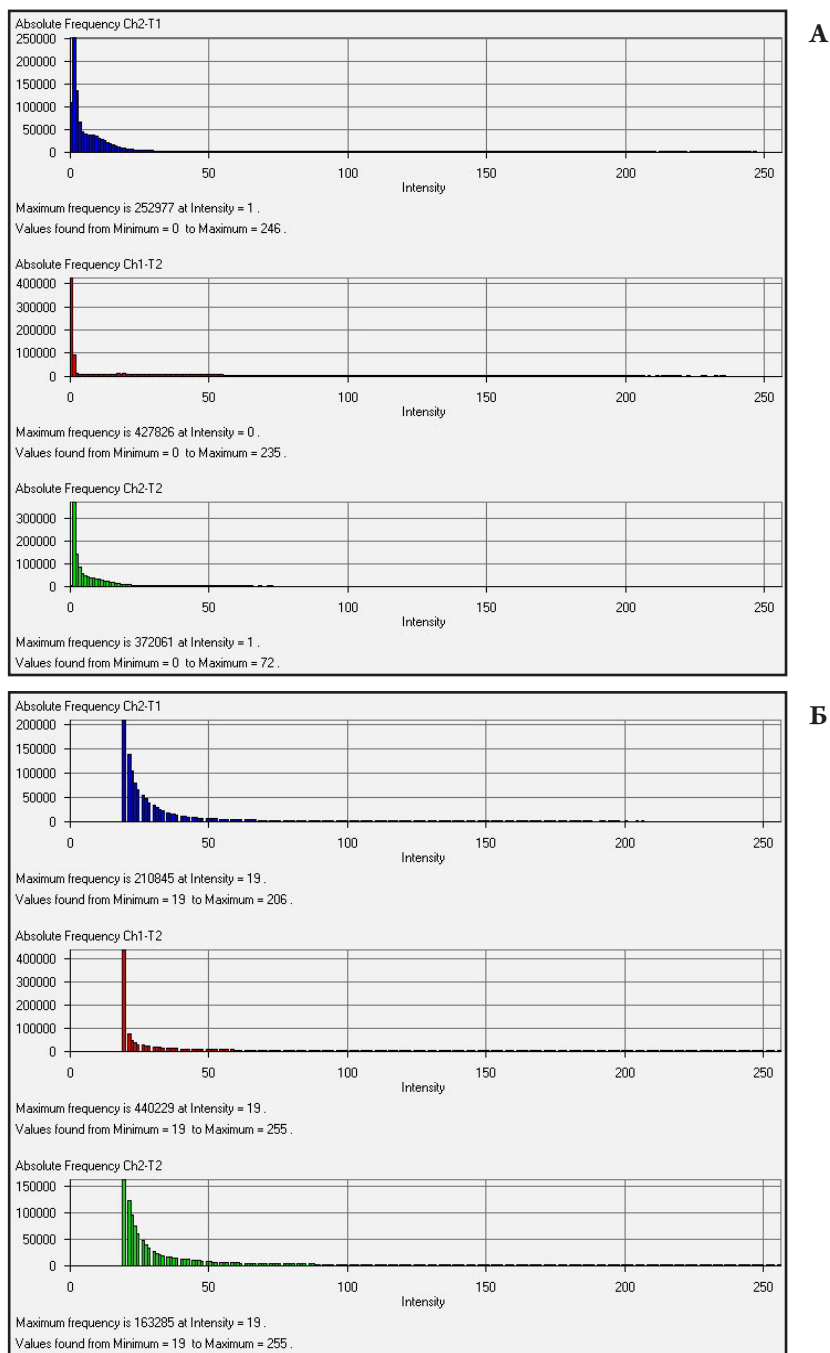


Рис. 2. Діаграми максимальної частоти (у пікселях) флуоресценції сирингілу (верхня синя частина діаграми), гваяцилу (нижня зелена частина діаграми) та автофлуоресценції хлорофілу (середня червона частина діаграми) в оболонках епідерми та мезофілу плаваючого листка (**А**) та в епідермі й клітинах фотосинтезуючої паренхіми підводного листка (**Б**), відповідно.

Fig. 2. The diagrams of maximal frequency (in pixels) for syringyl fluorescence (blue upper part), for quaiacyl fluorescence (green lower upper part) and for autofluorescence of chlorophyll (red middle part) are presented for swimming leaf on and on **A** and for submerged leaf on **Б**, correspondingly.

Табл. 1. Інтенсивність флуоресценції сирингілу та гваяцилу в листках *Trapa natans*.**Table 1.** The intensity of syringyl and quaiacyl fluorescence in *Trapa natans* leaves.

Листок/тканина/оболонка	Інтенсивність флуоресценції складової лігніну, відн. од.		Відношення сирингіл/гваяцил
	сирингілу	гваяцилу	
Плаваючий листок			
Епідерма, верхня:			
- периклінальна об-ка	225±21	230±17	0,98
- антиклінальна об-ка	0	0	0
Палісада	40±1,9	73±4,7	0,54
Губчастий мезофіл	30±2,1	69±3,5	0,43
Епідерма, нижня:			
- периклінальна об-ка	53±3,2	96±7,9	0,55
- антиклінальна об-ка	20±0,9	0	0
Судини провідних пучків	100±4,7	241±17	0,41
Підводний листок			
Епідерма:			
- периклінальна об-ка	118±12	155±14	0,76
- антиклінальна об-ка	46±3,8	183±19	0,25
Перший шар фотосинтезуючої паренхіми	80±8,8	110±17	0,72
2-4 шари паренхіми	87±7,1	130±11	0,67
Судини провідних пучків	117±10	233±15	0,51

середня частина діаграми, Рис. 2 Б).

Таким чином, цитохімічне вивчення складових лігніну, їх локалізація та вміст у листках водяного горіха показало як спільні, так і відмінні ознаки. Спільними ознаками були: 1) наявність сирингілу та гваяцилу у плаваючих та підводних листках, тобто у всіх листках незалежно від умов їхнього зростання; 2) майже однакові (невисокі) значення відношення S/G у клітинах судин надводних та підводних листків водяного горіха; 3) найвищі значення S/G для двох типів листків були в периклінальних оболонках епідермісу; 4) певна полярність S/G, що характерна для кожного типу листків.

Відмінними ознаками були: 1) відсутність досліджуваних монолігнінів в антиклінальних оболонках верхньої епідерми плаваючих листків; 2) високе відношення S/G в периклінальних оболонках плаваючих листків у порівнянні із такими у підводних листках водяного горіха.

Вважають, що із збільшенням величини

відношення S/G посилюється хімічний бар'єр для захисту клітини від проникнення води та інвазії патогенів (MENDEN *et al.* 2007). Крім цього, відомо, що ця ознака (S/G) відповідає за підвищення механічної міцності клітинних оболонок (CHRISTIERNIN 2006). Враховуючи, що листки, занурені у воду, постійно знаходяться у контакті з оточуючою водною мікрофлорою та численними водоростями, а також те, що такі листки витримують постійний тиск води та дію хвиль (НЕДУХА 2011), можна припустити, що як периклінальні так і антиклінальні оболонки епідермісу підводних листків водяного горіха захищають поверхню клітин від екзогенного впливу водного оточення саме регуляцією синтезу складових лігніну. Тобто, постійне водне оточення є одним з основних екзогенних факторів підвищеного синтезу сирингілу та гваяцилу у досліджуваних гідрофітів.

Крім того, ми бачимо, що наявність сирингілу та гваяцилу, а також їх відношення у клітинних оболонках епідермісу, мезофілу

та судинах провідних пучків подібне до таких, як це описано для дводольних покритонасінних (BAUCHER *et al.* 1998; WENG *et al.* 2008). Ми не виключаємо, що клітинні оболонки водяного горіха містять і третій фенілпропаноїд (*p*-гідроксифеніл), що необхідно буде дослідити іншими методами.

Використані джерела

- НЕДУХА О.М. 2011. Гетерофілія у рослин. Альтерпрес, Київ.
- ADLER E. 1977. Lignin chemistry – past, present and future. *Wood Sci. Technol.* **11**: 169–218.
- BAUCHER M., MONTIES B., VAN MONTAGU M., BOERJAN W. 1998. Biosynthesis and genetic engineering of lignin. *Crit. Rev. Plant Sci.* **17**: 125–197.
- CHRISTIERNIN M. 2006. Composition of lignin in outer cell-wall layers. Doctoral thesis: 1–53. Royal Institute of Technology Department of Fibre and Polymer Technology Division of Wood Chemistry and Pulp Technology, Stockholm.
- FREUDENBERG K., NEISH A. 1968. Constitution and biosynthesis of lignin. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New-York.
- JOSELEAU J.-P., RUEL K. 1997. Study of lignification by noninvasive techniques in growing maize internodes. An investigation by Fourier transforms Infrared, CP/MAS ¹³C NMR spectroscopy and immunocytochemical transmission electron microscopy. *Plant Physiol.* **114**: 1123–1133.
- KUKKOLA E.M., KOUTANIEMI S., GUSTAFSSON M., KARHUNEN P., RUEL K., LUNDELL T.K., SARANPÄÄ P., BRUNOW G., TEERI T.H., FAGERSTEDT K.V. 2003. Localization of dibenzodioxocin substructures in lignifying Norway spruce xylem by transmission electron microscopy–immunogold labeling. *Planta* **217**: 229–237.
- LEISOLA M., PASTINEN O., AXE D.D. 2012. Lignin-designed. *Bio-complexity.org* **3**: 1–11.
- MENDEN B., KOHLHOFF M., MOERSCHBACHER B.M. 2007. Wheat cell accumulate a syringyl-rich lignin during the hypersensitive resistance response. *Phytochem.* **68**: 513–529.
- WENG J.K., LI X., BONAWITZ N., CHAPPLE C. 2008. Emerging strategies of lignin engineering and degradation for cellulosic biofuel production. *Curr. Opin. Biotechnol.* **19**: 166–172.
- WENG J.K., AKIYAMA T., BONAWITZ N.D., LI X., RALPH J., CHAPPLE C. 2010. Convergent evolution of syringyl lignin biosynthesis via distinct pathways in the lycophyte *Selaginella* and flowering plants. *Plant Cell* **22**: 1033–1045.
- WUYTS N., LOGNAY G., SWENNEN R., DE WAELE D. 2006. Secondary metabolites in roots and implications for nematode resistance in banana (*Musca* sp.). *J. Exp. Bot.* **57**: 2825–2835.

MONOLIGNINS PARTICIPATION IN NATURE ADAPTATION OF *TRAPA NATANS* L. TO WATER ENVIRONMENT

OLENA M. NEDUKHA

Abstract. Localization and distribution of monolignins (syringyl and quaiacyl) in *Trapa natans* L. cell walls of epidermis, photosynthesizing parenchyma and vessels of swimming and submerged leaves at vegetative phase of growth have been investigated with laser confocal microscopy. The established differences in lignin ingredients allocation and their content are indicated on differential synthesis of syringyl and quaiacyl, that possible are connected with cell differentiation, water environment and leaf passing from water on water surface. Positive correlation between syringyl content in cell walls, the ratio of syringyl to quaiacyl (S/G) and environment of leaf growth are revealed.

Key words: *Trapa natans*, lignin, syringyl, quaiacyl, swimming and submerged leaves