



О.М. НЕДУХА

Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України
вул. Терещенківська, 2, м. Київ, 01601, Україна
o.nedukha@hotmail.com

**ВМІСТ І ФОРМИ ЦЕЛЮЛОЗИ
У ЛИСТКАХ ЕКОФОРМ *SIUM LATIFOLIUM* L.
НА СТАДІЇ ВЕГЕТАТИВНОГО РОСТУ**

Ключові слова: Sium latifolium, аморфна та кристалічна целюлоза, листки, гетерофілія

Вступ

Повітряно-водні рослини характеризуються гетерофілією, тобто в них на одній особині розвиваються листки різної форми. Це є виявом фенотипічної пластичності, завдяки якій рослини ростуть та розвиваються в разі зміни навколишнього середовища [17]. Гетерофілія описана у культурних та дикорослих суходільних [11, 13], водних [4] і повітряно-водних рослин [2]. Підводні листки відрізняються від надводних та плаваючих низькою інтенсивністю потенціального фотосинтезу, зниженою активністю РБФК/О та меншою кількістю хлоропластів на одиницю площі листка [2, 3, 14].

Під час росту та диференціювання клітини інтенсивно синтезується основний полісахарид клітинної оболонки — целюлоза. Залежно від виду та умов росту вона може бути в аморфній чи/та кристалічній формі. У процесі формування кристалів целюлози утворюються внутрішньомолекулярні та міжмолекулярні зв'язки, які стабілізують структуру кристала. Кристалічна та аморфна целюлоза поєднуються між собою водневими зв'язками, формуючи мікрофібрили, від кількості яких залежать пластичність і товщина оболонок [5, 8]. Аморфна целюлоза абсорбує воду спочатку в одному ланцюзі її молекули,



Рис. 1. Загальний вигляд листків повітряно-водної (а) та суходільної форм (б) *Sium latifolium* на стадії вегетативного росту

Fig. 1. The general view of leaves in air-aquatic (a) and terrestrial plants (б) *Sium latifolium* grown in vegetative stage

потім — між двома ланцюгами аморфної целюлози в одній мікрофібрилі [15]. Враховуючи наведені вище дані літератури, ми припускаємо, що рисами, за якими суходільні рослини *Sium latifolium* L. (веху широколистої) відрізняються від повітряно-водних рослин, є вміст целюлози та наявність її аморфної форми, що відіграє суттєву роль в апопластному транспорті води [7]. Ми наводимо результати цитохімічного вивчення целюлози, її розподілу в клітинних оболонках та біохімічного визначення цього полісахариду в листках веху широколистої на стадії вегетативного росту.

Матеріал та методи досліджень

Об'єктом дослідження були листки *S. latifolium* двох екологічних форм (повітряно-водної та суходільної), зібрані на стадії вегетативного росту (15—22 травня). Особини повітряно-водної форми зростали у воді (на глибині 20—40 см) уздовж берегів озер у смт Конча-Заспа (під Києвом). Суходільна екоформа *S. latifolium* трапляється на віддалі 5—10 м від берега. Інтенсивність освітлення, за якої збирали зразки рослин для досліджень, вимірювали приладом LI-250 (Light Meter, LI-COR, USA).

Локалізацію та розподіл целюлози у клітинних оболонках досліджували цитохімічним методом за стандартним протоколом [10]. Префіксовані та промиті буфером зразки інкубували в 0,001%-му розчині калькофлуору, промивали та вивчали у лазерному сканувальному конфокальному мікроскопі LSM 5 PASCAL за довжини хвилі збудження 494 нм, хвилі емісії — 516 нм. Кількісні вимірювання відносного вмісту целюлози у клітинних оболонках зразків здійснювали з ви-

користанням програмного забезпечення «Pascal». Автофлуоресценцію хлорофілу виявляли за довжини хвилі збудження 440 нм і хвилі емісії — 660 нм. Для цитохімічних досліджень брали серединну частину двох нижніх часток (біля основи пластинки) трьох листків п'яти рослин водної та п'яти — суходільної форм. Досліджували 50—60 клітин мезофілу і таку ж кількість клітин епідерми листка з кожного зразка. Одержані дані опрацьовували статистично. Кількісний вміст кристалічної та аморфної целюлози із сухої маси листків визначали методом послідовного кислотного гідролізу за Арасимовичем та Єрмаковим [1] на 9—12 рослинах кожної екоформи. Метод базується на поступовому екстрагуванні цукрів, геміцелюлоз, а далі — гідролізі аморфної та кристалічної целюлози.

Результати досліджень та їх обговорення

Повітряно-водна форма *Sium latifolium*. Вологість ґрунту, на якому збирали досліджувані рослини, становила $75,2 \pm 4,1\%$; щільність потоку квантів сонячного світла над підводними листками (у воді) — $80\text{—}90$ мкмоль квантів $\cdot \text{м}^{-2}\text{с}^{-1}$, на поверхні листків, черешок яких був у воді, а пластинка — над водою, — $300\text{—}320$, на поверхні надводних листків — $350\text{—}400$ мкмоль квантів $\cdot \text{м}^{-2}\text{с}^{-1}$; середня температура повітря — $28^\circ (\pm 1^\circ) \text{C}$, температура води навколо підводних листків — 17°C .

Sium latifolium є гетерофілом (рис. 1, а): занурені у воду листки першого порядку тричіпірчаторозсічені (кріпоподібні) з ниткоподібними частками, повітряні (надводні) листки — пірчасто-розсічені (листки третього порядку), частки їх 4—6-парні, навскіс яйцеподібні або ланцетні, дрібногостропильчасті; проміжні листки (листки другого порядку) також двічіпірчаторозсічені, з черешком, зануреним у воду, і листовою пластинкою, що здіймається над водою. Підводні листові пластинки склалися із 7—8 парних часток та однієї непарної; середній розмір довгої осі листової пластинки — 10—12, короткої — 7—9 см. Листки другого порядку за формою подібні до таких моркви, складаються із 7—8 парних та однієї непарної листової часточки; середній розмір листової

Таблиця 1. Інтенсивність люмінесценції комплексу калькофлуор-целюлоза в клітинних оболонках листків повітряно-водної форми *S. latifolium* на стадії вегетативного росту

Тканина / тип клітинної оболонки	Інтенсивність люмінесценції листків (умовні одиниці)		
	підводних	напівзанурених ^а	надводних
Верхня епідерма			
зовнішня оболонка	$86,3 \pm 5,1$	$84,1 \pm 2,7$	$148,3 \pm 10,6^*$
антиклінальна оболонка	$62,1 \pm 4,3$	$67,5 \pm 1,8$	$107,1 \pm 9,0^*$
Нижня епідерма			
зовнішня оболонка	$82,0 \pm 1,0$	$120,0 \pm 11,9^*$	$129,0 \pm 10,7^*$
антиклінальна оболонка	$48,0 \pm 3,2$	$47,7 \pm 5,0$	$84,0 \pm 7,0^*$
Палісадна паренхіма	$142,8 \pm 10,0$	$108,8 \pm 10,8^*$	$90,8 \pm 4,0^*$
Губчаста паренхіма	$100,8 \pm 13,1$	$60,1 \pm 2,7^*$	$58,4 \pm 3,1^*$

Примітки: ^а — у напівзанурених листків занурений у воду черешок та надводна листові пластинка; * — $P \leq 0,05$ (достовірно відрізняються від показників для клітинних оболонок підводних листків).

вих пластинок більший, ніж у підводних листків: 16—18 см за довгою віссю та 10—11 см — за короткою. Середній розмір надводних листків за довгою віссю також становив 16—18 см, за короткою — від 10 до 14 см, розмір листових дольок за довгою віссю змінювався від 5 до 7, за короткою — від 2 до 2,6 см.

Лазерно-конфокальна мікроскопія листків веху показала, що у клітинах епідерми та мезофілу целюлоза клітинних оболонок флуоресціювала яскравозеленим кольором незалежно від типу листка (рис. 2, *a—d, ж, з*, див. кольорову вклейку). Інтенсивність флуоресценції істотно відрізнялася в зовнішніх та антиклінальних оболонках верхньої та нижньої епідерми: в антиклінальних оболонках кожного типу листків вона була у 1,5—2,3 раза нижчою. У клітинних оболонках губчастої паренхіми листків флуоресценція також була в 1,4—1,8 раза нижчою, ніж у таких палисадної паренхіми. Інтенсивність люмінесценції целюлози в клітинних оболонках верхньої та нижньої епідерми надводних листків була значно вищою, мезофілу тих самих листків — нижчою порівняно з підводними листками (табл. 1).

За даними біохімічного аналізу трьох типів листків повітряно-водних особин веху загальний вміст целюлози є невисоким (табл. 2), вона виявлена в аморфній та кристалічній формах. Незалежно від типу листка вміст аморфної целюлози був досить високим — від 61 до 67 % загальної концентрації цього полісахариду; вміст кристалічної целюлози був майже вдвічі нижчим (табл. 2). Відношення аморфної целюлози до кристалічної у підводних листках становило 2,06; у листках, пластинка яких вийшла з води, — 1,7, у надводних листках — 1,93 (табл. 2).

Суходільна форма S. latifolium. Вологість ґрунту під рослинами суходільної форми веху майже вдвічі нижча, ніж під рослинами повітряно-водної форми, — $39,5 \pm 3,1$ %; щільність потоку квантів сонячного світла над верхньою поверхнею листків становила 450—500 мкмоль квантів · м⁻²с⁻¹; середня температура повітря — 28 ° (± 1 °) С.

Таблиця 2. Вміст целюлози у листових пластинках повітряно-водної форми *S. latifolium* на стадії вегетативного росту

Целюлоза	Вміст целюлози у різних листках веху		
	підводних	напівзанурених ^a	надводних
Загальний вміст целюлози, мг · г ⁻¹ сухої маси, %	95,4 ± 1,8 (100 %)	101,7 ± 5,1 (100 %)	79,7 ± 3,1* (100 %)
Вміст аморфної целюлози, мг · г ⁻¹ сухої маси, %	63,9 ± 8,8 (66,9 %)	63,0 ± 6,7 (61,8 %)	52,3 ± 6,5 (65,6 %)
Вміст кристалічної целюлози, мг · г ⁻¹ сухої маси, %	31,0 ± 2,1 (33,1 %)	37,0 ± 4,4 (38,2 %)	27,1 ± 2,0 (34,4 %)
Відношення вмісту аморфної целюлози до такого кристалічної	2,06	1,70	1,93

Примітки: ^a — у напівзанурених листків занурений у воду черешок та надводна листовка пластинка; * — $P \leq 0,05$ (достовірно відрізняються від показників для клітинних оболонок підводних листків).

Рослини суходільної форми веху на стадії вегетативного росту також характеризувалися гетерофілією. За формою листки були двох типів: простими з цілісною пластинкою та непарно пірчаторозсіченою пластинкою (рис. 1, б). Цілісні листові пластинки мали серцеподібну або яйцеподібну форму, середній розмір за довгою віссю — $2,2 \pm 0,5$ см, за короткою — $2,0 \pm 0,2$ см; краї широко пилкоподібні, кожна особина мала три цілісні листочки і два — пірчаторозсічені, які склалися з цілісних видовжено овальних часточок (листочків). Листки сформовані з чотирьох—п'яти пар і однієї непарної дольки, середній розмір яких за довгою віссю становив $10 \pm 1,2$, за короткою — $2,9 \pm 0,5$ см. Парні листові часточки розміщені супротивно; мають пилкоподібні краї.

Цитохімічне дослідження локалізації целюлози у двох типах листків *S. latifolium* суходільної форми показало, що у клітинних оболонках усіх тканин целюлоза флуоресцювала зеленим кольором (рис. 2, е, є). Рівні інтенсивності флуоресценції

Таблиця 3. Інтенсивність люмінесценції комплексу калькофлуор-целюлоза в клітинних оболонках листків суходільної форми *S. latifolium* на стадії вегетативного росту

Тканина / тип клітинної оболонки	Інтенсивність люмінесценції листків (умовні одиниці)	
	з цілісною пластинкою	з пірчаторозсіченою пластинкою
Верхня епідерма		
зовнішня оболонка	$135,7 \pm 10,1$	$130,3 \pm 5,0$
антиклінальна оболонка	$87,2 \pm 4,3$	$80,1 \pm 5,4$
Нижня епідерма		
зовнішня оболонка	$245,0 \pm 9,0$	$133,0 \pm 11,8^*$
антиклінальна оболонка	$105,9 \pm 8,2$	$50,0 \pm 6,8^*$
Палісадна паренхіма	$115,8 \pm 10,0$	$66,8 \pm 8,0^*$
Губчаста паренхіма	$49,8 \pm 4,1$	$56,8 \pm 5,7$

Примітка: * — $P \leq 0,05$ (достовірно відрізняються від показників для клітинних оболонок листків із цілісною пластинкою).

Таблиця 4. Вміст целюлози у листках суходільної форми *S. latifolium* на стадії вегетативного росту

Целюлоза	Вміст целюлози у листках веху	
	з цілісною пластинкою	з пірчаторозсіченою пластинкою
Загальний вміст целюлози, $\text{мг} \cdot \text{г}^{-1}$ сухої маси, %	$141,4 \pm 3,8$ (100 %)	$128,4 \pm 4,6^*$ (100 %)
Вміст аморфної целюлози, $\text{мг} \cdot \text{г}^{-1}$ сухої маси, %	$71,0 \pm 8,8$ (50,3 %)	$61,0 \pm 5,9$ (47,6 %)
Вміст кристалічної целюлози, $\text{мг} \cdot \text{г}^{-1}$ сухої маси, %	$69,0 \pm 3,1$ (49,7 %)	$66,0 \pm 3,5$ (52,4 %)
Відношення вмісту аморфної целюлози до кристалічної	1,02	0,92

Примітка: * — $P \leq 0,05$ (достовірно відрізняються від показників для клітинних оболонок листків із цілісною пластинкою).

целюлози представлені в табл. 3. Інтенсивність флуоресценції не відрізнялася в оболонках верхньої епідерми та клітинах губчастої паренхіми двох типів листків, тимчасом інтенсивність люмінесценції у клітинних оболонках нижньої епідерми та палісади перших листків із цілісною пластинкою була майже вдвічі вищою, ніж у відповідних оболонках молодих пірчаторозсічених листків.

За результатами біохімічного аналізу загальний вміст целюлози у двох типах листків суходільної форми веху був у 1,3—1,5 раза вищим, ніж у підводних, та у 1,6—1,8 раза вищим за такий надводних листків повітряно-водної форми (табл. 4). Листки суходільних форм веху містили аморфну та кристалічну форми целюлози. Відношення аморфної до кристалічної форми дорівнювало 1,02 та 0,92 у листках із цілісною та пірчаторозсіченою пластинкою, відповідно; ці значення були майже вдвічі нижчими, ніж такі у підводних та надводних листках повітряно-водних особин.

Таким чином, цитохімічні та біохімічні дослідження розподілу і складу целюлози у клітинах листків *S. latifolium* показали, що целюлоза є чутливим полісахаридом клітинної оболонки, її вміст і склад у період вегетативного росту змінювалися залежно від оточуючих умов екотипу.

Цитохімічний аналіз клітин епідерми та мезофілу листків повітряно-водної форми виявив певний перерозподіл целюлози залежно від водного оточення: достовірно нижчим є відносний вміст целюлози у клітинних оболонках епідерми підводних листків порівняно з таким надводних, вищий він у клітинних оболонках мезофілу підводних листків порівняно з надводними.

Порівняння цитохімічних даних щодо відносного вмісту целюлози у різних клітинних оболонках — надводних листків повітряно-водної та листків суходільної форм веху (таблиці 1, 3) свідчить про те, що у простих листках суходільних рослин він був майже вдвічі більшим у зовнішніх клітинних оболонках основних клітин нижньої епідерми, в 1,25 раза — в антиклінальних оболонках тієї ж епідерми та в оболонках палісади.

Відомо, що листки та стебла підводних рослин характеризуються значною гнучкістю [12, 13], рівень якої залежить від вмісту та складу полісахаридів клітинних оболонок [8]. Крім того, у підводних рослин через клітинні оболонки здійснюється інтенсивний газообмін [9, 12—14]. Раніше встановлено, що товщина зовнішніх клітинних оболонок і шару кутикули у підводних листків п'яти видів повітряно-водних рослин у півтора раза тонша порівняно з оболонками епідермісу листків суходільних особин [14]. У наземних рослин зовнішні оболонки клітин епідерми, що захищають від інсоляції та біотичних факторів, у кілька разів товщі та містять удвічі більше целюлози, ніж оболонки клітин мезофілу [6]. Враховуючи ці дані та результати власних досліджень, можна відзначити, що на стадії вегетативного росту у клітинах повітряно-водної форми веху синтез целюлози в епідермісі та мезофілі є нерівномірним, залежно від підводного чи надводного статусу, тимчасом як у суходільних особин целюлоза в епідермі та мезофілі розподіляється подібно до того, як це виявлено в листках *Zea mays* [5, 6].

Порівняльний аналіз вмісту целюлози у підводних та надводних листках повітряно-водної та листках суходільної форм веху показав, що розвиток рос-

лини на суходолі на стадії вегетативного росту сприяє інтенсивнішому накопиченню целюлози у цільних та пірчатороздільних листках. Відомо, що інтенсивність синтезу целюлози залежить від вмісту її попередників (глюкози), активності целюлозосинтеза та активації генів із родини *CesA* [16]. Отже, можна припустити, що у листках суходільної форми веху збільшений вміст целюлози в період вегетативного росту зумовлюється посиленням синтезом глюкози та активацією певних генів.

Ми виявили, що перебування у воді на 12—18 % збільшує концентрацію аморфної целюлози у листках порівняно з особинами, які зростали на суходолі. Відомо, що аморфні зони целюлози абсорбують воду, сприяючи апопластному водному транспорту, тоді як кристалічні ділянки не мають такої властивості [7, 15]. Крім того, у ході досліджень дикого виду петунії та мутанта *Petunia hybrida* за геном *PhEXP1* встановлено, що мутантний алель *RSW1* відповідає за синтез аморфної целюлози [18]. Враховуючи це, можна припустити, що:

— наявність аморфної целюлози у клітинних оболонках рослин веху сприяє існуванню рослин у водному середовищі, а кристалічної целюлози — адаптації рослин до водного дефіциту;

— збільшений вміст аморфної форми целюлози у підводних листках веху, очевидно, зумовлений генетичними відмінностями.

Ці питання потребують подальшого розв'язання.

Автор висловлює щире подяку чл.-кор. НАНУ Є.Л. Кордюм за цінні поради при обговоренні результатів експериментів.

1. *Арасимович А.А., Ермаков А.И.* Определение полисахаридов и лигнина // Методы биохим. исслед. раст. / Ред. А.И. Ермаков. — Л.: ВО Агропромиздат, 1987. — С. 143—172.
2. *Некрасова Г.Ф., Рожина Д.А., Коробицина Е.Б.* Формирование фотосинтетического аппарата в период роста погруженного, плавающего и надводного листа гидрофитов // Физиол. раст. — 1998. — **45**, № 4. — С. 539—548.
3. *Некрасова Г.Ф., Рожина Д.А., Малеева М.Г., Пьянков В.И.* Фотосинтетический метаболизм и активность карбоксилирующих ферментов у надводных, плавающих и погруженных листьев гидрофитов // Физиол. раст. — 2003. — **50**, № 1. — С. 65—75.
4. *Bai-Ling Lin, Wen-Jen Yang.* Blue light and abscisic acid independently induce heterophyllous switch in *Marsilea quadrifolia* // Plant Physiol. — 1999. — **119**. — P. 429—434.
5. *Brown R.M.* The biosynthesis of cellulose // J. Macromol. Sci. Pure Appl. Chem. — 1996. — **A33**. — P. 1345—1373.
6. *Carpita N., Defernez M., Findlay K. et al.* Cell wall architecture of the elongating maize coleoptile // Plant Physiol. — 2001. — **127**. — P. 551—565.
7. *Czihak C., Muller M, Schober H. et al.* Dynamics of water adsorbed to cellulose // Physica B. — 1999. — **266**. — P. 87—91.
8. *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.
9. *Frost-Christensen H., Bolt Jorgensen L., Floto F.* Species specificity of resistance to oxygen diffusion in thin cuticular membranes from amphibious plants // Plant, Cell and Environment. — 2003. — **26**. — P. 561—569.
10. *Herth W.* Calcofluor white and congo-red inhibit microfibril assembly of *Poteriochromonas*: evidence for a gap between polymerization and microfibril formation // J. Cell Biology. — 1980. — **84**, N 4. — P. 642—658.

11. Kerstetter R.A., Poething R.S. The specification of leaf identity during shoot development // Annu. Rev. Cell and Develop. Biology. — 1998. — **14**. — P. 373–398.
12. Minorsky P.V. Heterophylly in aquatic plants // Plant Physiol. — 2003. — **133**. — P. 1671–1672.
13. Mommer L., Visser E.J.W. Underwater photosynthesis in flooded terrestrial plants: a matter of leaf plasticity // Annals of Botany. — 2005. — **96**, N 4. — P. 1–23.
14. Mommer L., Pons T.L., Visser E.J.W. Photosynthetic consequences of phenotypic plasticity in response to submergence: *Rumex palustris* as a case study // J. Exp. Bot. — 2006. — **57**, N 2. — P. 283–290.
15. Nilsson Martin. Water-induced charge transport in microcrystalline cellulose // Acta Universitatis Upsaliensis. Uppsalla. — 2006. — **170**. — P. 1–54.
16. Richmond T., Somerville C. The cellulose synthase superfamily // Plant Physiol. — 2000. — **124**. — P. 495–498.
17. Visser E.J.W., Blom C.W., Voesenek L.A.C.J. Flooding induced adventitious rooting in *Rumex*: morphology and development in an ecological perspective // Acta Botanica Neerlandica. — 1996. — **4**. — P. 17–28.
18. Zenoni S., Reale L., Torielli G.B. et al. Down regulation of the *Petunia hybrida* α -expansin gene *PhEXPI* reduces the amount of crystalline cellulose in cell walls and leads to phenotypic changes in petal limbs // The Plant Cell. — 2004. — **16**. — P. 295–308.

Рекомендує до друку
І.В. Косаківська

Надійшла 19.06.2009

Е.М. Недуха

Інститут ботаники ім. Н.Г. Холодного НАН України, г. Київ

СОДЕРЖАНИЕ И ФОРМЫ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ В ЛИСТЬЯХ ЭКОФОРМ *SIUM LATIFOLIUM* L. НА СТАДИИ ВЕГЕТАТИВНОГО РОСТА

Исследовано общее содержание целлюлозы, а также аморфной и кристаллической ее форм в листьях воздушно-водной и суходольной экоформ гетерофильного растения *Sium latifolium* на стадии вегетативного роста. Методом лазерно-конфокальной микроскопии исследовали распределение целлюлозы в клеточных оболочках эпидермиса и мезофилла листьев. Выявлено, что относительное содержание целлюлозы в оболочках зависит от типа ткани и условий роста растения. Биохимическими методами установлено высокое содержание аморфной целлюлозы и более низкое — общее содержание целлюлозы у особей *S. latifolium*, произрастающих в воде, по сравнению с представителями суходольной экоформы.

Ключевые слова: *Sium latifolium*, аморфная и кристаллическая целлюлоза, листья, гетерофиллия.

О.М. Nedukha

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

THE CONTENT AND FORMS OF CELLULOSE IN LEAVES OF ECOMORPHS OF *SIUM LATIFOLIUM* L. AT THE VEGETATIVE GROWTH PHASE

The total content of cellulose and its amorphous and crystalline forms in leaves of air-aquatic and terrestrial ecomorphs of heterophyllous *Sium latifolium* at the vegetative growth phase were investigated. Distribution patterns of relative contents of cellulose in the cell walls of epidermis and mesophyll in leaves have been revealed by laser-confocal microscopy. Dependence of the relative content of cellulose in cell walls on the tissue type and environmental conditions was demonstrated. It is concluded that aquatic conditions for plant growth lead to higher contents of amorphous cellulose and to lower content of total cellulose in comparison with those in leaves of terrestrial form of *S. latifolium* during the vegetative growth phase.

Key words: *Sium latifolium*, amorphous cellulose, crystalline cellulose, leaves, heterophylly.