

УДК 581.19:577.13

ИЗМЕНЕНИЕ ФЕНОЛКАРБОНОВЫХ КИСЛОТ В ХОДЕ СОЗРЕВАНИЯ И ЛИГНИФИКАЦИИ КЛЕТОК КСИЛЕМЫ СОСНЫ ОБЫКНОВЕННОЙ

© 2012 г. Г. Ф. Антонова, Т. Н. Вараксина, Т. В. Железниченко, В. В. Стасова

Институт леса им. В.Н. Сукачева СО РАН,

660036 Красноярск, Академгородок

E-mail: institute_forest@ksc.krasn.ru

Поступила в редакцию 09.12.10 г.

Окончательный вариант получен 11.12.11 г.

Содержание и состав фракций спирторастворимых фенолкарбонных кислот (ФК) изучали в связи с созреванием клеток ранней и поздней ксилемы и ее лигнификацией в ходе образования годичного прироста древесины в стволах сосны обыкновенной. Фенольные соединения (ФС) извлекали 80%-ным этанолом из клеток последовательных стадий созревания ранней и поздней ксилемы. Из ФС выделяли фракции свободных и связанных ФК, а из состава последних простые и сложные эфиры. Содержание веществ фракций рассчитывали на сух. массу и на клетку. Ранние трахеиды на всех стадиях утолщения вторичной стенки содержали меньше ФС и больше свободных ФК, чем поздние трахеиды. В ходе созревания ранних трахеид пул свободных кислот в расчете на клетку постепенно увеличивался, а связанных снижался. С созреванием трахеид поздней ксилемы пул свободных ФК повышался, тогда как связанных сначала повышался, а затем уменьшался. На всех стадиях созревания клеток обоих типов ксилемы в составе связанных ФК всегда доминировали простые эфиры. При этом клетки всех этапов созревания поздней ксилемы содержали больше простых эфиров, тогда как в клетках ранней было больше сложных эфиров. На последовательных стадиях лигнификации ранней ксилемы суммарное содержание свободных оксикоричных кислот снижалось в результате сокращения пула п-кумаровой, феруловой и синаповой кислот, а пул эфиров этих кислот повышался. В ходе лигнификации поздней ксилемы пул свободной п-кумаровой, феруловой и особенно синаповой кислоты повышался. Одновременно увеличивалось содержание сложных эфиров феруловой кислоты и простых эфиров синаповой.

Ключевые слова: *Pinus sylvestris* L., ранняя и поздняя ксилема, вторичное утолщение и лигнификация, фенолкарбонные кислоты.

Годичный прирост хвойных состоит из двух слоев ксилемы — ранней и поздней, клетки которых — трахеиды — отличаются морфологическими параметрами, хотя развиваются по одному сценарию. После образования в камбиальной зоне клетки увеличиваются в размере в результате растяжения, а затем начинается вторичное утолщение их стенок. Вслед за отложением веществ вторичной стенки идет процесс накопления лигнина, основными структурными единицами которого являются производные оксикоричных кислот: п-кумаровой, феруловой, синаповой.

Оксикоричные кислоты (ОК), которые входят в состав фенолкарбонных кислот (ФК) растений, участвуют также в росте клеток и создании структуры клеточных стенок, соединяя сложными и простыми эфирными связями между собой нецеллюлозные полисахариды (Fry, 1986, 1993; Waldron et al., 1997; Burr, Fry, 2009), а сами гемицеллюлозы с лигнином (Iiyama et al., 1990; Wallace, Fry, 1994; Antonova, Chapligina, 2007). Димеризованные ОК, такие как диферуловая кислота, могут попеременно

связывать пектины или пектины с другими нецеллюлозными полисахаридами (Fry, 1983; Waldron et al., 1997).

Значение ОК в растениях не ограничивается их участием в лигнификации (Запрометов, 1993, 1996). Физиологические функции кислот и их эфиров в растениях весьма разнообразны. Производные ФК, опосредуя действие таких ростовых веществ, как цитокинин, контролируют деление и расширение клеток (Teutonico et al., 1991). Благодаря природным антиоксидантным свойствам эфиры ОК, в частности, хлорогеновая кислота, могут защищать липиды от перекисного окисления *in vivo* (Rice-Evans et al., 1997). Предполагают, что п-кумаровая кислота оптимизирует введение синапового спирта в растущий лигниновый полимер (Hatfield et al., 2008). Существуют данные, что ОК обладают антимутагенными свойствами (Ferguson et al., 2003). Считается также, что ФК и их производные влияют на апоптоз клеток (Tamagnon et al., 1998; Дубравина и др., 2005). ФК в свободной форме потенциально токсичны для клеток и по-

этому их количество, как правило, в клетках ограничено. В растениях они представлены главным образом в виде конъюгатов с сахарами или органическими кислотами.

Тесно связанные с компонентами клеточных стенок ФК выделяются из ткани только растворами щелочи или кислоты, разрушающими эти связи, и такой метод их выделения используется в большинстве работ посвященных изучению ФК в растениях, например, двудольных (Lozovaya et al., 1999). Несвязанные с компонентами стенок бензойные и оксикоричные кислоты и их производные извлекаются такими органическими растворителями как спирты или их водные растворы.

Уровень спирторастворимых фенольных соединений (ФС) зависит от степени дифференциации тканей, как это было показано на каллусных культурах чайного растения (Загоскина и др., 1994) и при развитии зерен ржи (Weidner et al., 2000). Общих ФС и ФК в ходе развития зерен ржи в расчете на сухой вес больше в начале развития, чем на конечных стадиях созревания (Weidner et al., 2000). Авторы показали также, что инициация водного стресса ведет к понижению суммы свободных и связанных форм оксикоричных кислот. Как было установлено для хвои *Pinus pinaster*, избыток влаги тоже влияет на содержание свободных и связанных форм ФК (Alonso et al., 1993).

Водный стресс как внешний, так и внутренний, возникающий в дереве в результате сочетания определенных погодных условий, ведет к формированию в годичном приросте хвойных слоя поздней ксилемы (Zahner, 1963; Антонова, 1999). Изучая образование ранних и поздних трахеид в стволах лиственницы сибирской, мы нашли, что фракционный состав ФК, а именно содержание свободных и связанных ФК и их состав зависит как от стадии дифференциации клеток, так и от того, какой слой ксилемы, ранней или поздней, формируется в данный период вегетации (Чаплыгина, 2007). Развитие двух типов трахеид лиственницы характеризовалось также разной интенсивностью отложения лигнина в ходе дифференциации клеток (Antonova et al., 2007) и разным содержанием и соотношением аскорбиновой и дегидроаскорбиновой кислот (Антонова и др., 2005). От соотношения этих кислот, которое определяет окислительно-восстановительный потенциал тканей растений, зависит процесс сшивания полисахаридов (Zarra et al., 1999) и доступность предшественников лигнина для полимеризации (Takahama, 1993). Считают, что аскорбиновая кислота регулирует количество коричных кислот доступных действию пероксидазы, что в свою очередь контролирует скорость биосинтеза лигнина (Takahama, Oniki, 1997). Это означает, что пока аскорбат взаимодействует с перекисью водорода процессы сшивки и полимеризации в стенке тормозятся (Zarra et al.,

1999; Takahama, Oniki, 1997). При развитии трахеид лиственницы содержание и состав ФК (Чаплыгина, 2007) изменялись в соответствии с окислительно-восстановительным потенциалом (Антонова и др., 2005) и динамикой лигнификации ранних и поздних трахеид лиственницы в ходе их развития (Antonova et al., 2007).

При изучении процессов роста и лигнификации ранней и поздней ксилемы в стволах сосны обыкновенной было найдено, что каждая из стадий дифференциации клеток тоже характеризуется определенным уровнем аскорбиновой и дегидроаскорбиновой кислот (Антонова и др., 2009). Такие изменения в метаболизме должны влиять на содержание и фракционный состав ФК, а это в свою очередь на ростовые процессы и отложение лигнина. Мы рассматривали изменение содержания и состава фенолкарбонных кислот в ходе роста клеток ксилемы сосны обыкновенной (Антонова и др., 2011). Данная работа является продолжением этих исследований.

Целью работы явилось изучение содержания и фракционного состава спирторастворимых ФК на этапах созревания и лигнификации ранних и поздних трахеид при формировании годичного прироста древесины в стволе сосны обыкновенной.

МЕТОДИКА

Материалом исследования служили слои клеток формирующейся ксилемы, полученных из стволов интактных 20–25 летних деревьев сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.), растущих в посадках Погорельской экспериментальной базы Института, в периоды образования ранней и поздней древесины. Время отбора подбирали с таким расчетом, чтобы все клетки формирующегося слоя древесины принадлежали либо к раннему, либо позднему типу. В вегетационном сезоне такие периоды соответствовали концу июня и началу августа.

Сбор материала со стволов деревьев (по два в каждый из периодов наблюдения) сосны обыкновенной проводили методом микрорасщепления. Ствол распиливали по мотовкам, для каждой из которых оценивали состояние развития годичного слоя. С отрезков ствола последовательно удаляли кору, клетки непроводящей и проводящей флоэмы, клетки зон камбия и роста растяжением. Затем скальпелем собирали клетки на стадиях развития вторичных стенок (стадия созревания и лигнификации), постоянно контролируя стадию развития клеток с помощью гистохимических реакций (Антонова, Шебеко, 1981; Антонова и др., 2005, 2009). Начало отложения веществ вторичных стенок оценивали по появлению окаймления пор, что характерно для начала утолщения стенок трахеид (Murmanis, Sachs,

1969). Состояние зрелой ксилемы определяли по исчезновению протопласта.

В конце июня все клетки формирующегося годичного слоя, в том числе и зрелые, были представлены ранними трахеидами. Со стороны ксилемы были получены клетки зон камбия (Кам), роста растяжением (Рост), результаты анализа ФК которых показаны ранее (Антонова и др., 2011), и зоны созревания, клетки которой служили материалом для исследования. Зону разделяли на клетки с вторичным утолщением без лигнификации (D1) и последовательные слои лигнифицирующихся клеток (D2a и D2б), а также зрелые клетки ксилемы (М).

В начале августа развивающаяся ксилема содержала только камбиальную зону (Кам) и зону созревания. Клетки в зоне роста растяжением отсутствовали, а зона созревания, которую использовали в работе, содержала достаточно большое число клеток, что позволило разделить ее на слой клеток до лигнификации (D1) и последовательные слои лигнифицирующихся трахеид (D2a, D2б, D2в). Кроме того, были собраны зрелые клетки поздней ксилемы (М). Одновременно отбирали навески ткани на мацерацию и для определения влажности материала.

Мацерацию тканей проводили по методикам, использованным в работе (Антонова и др., 2005; Антонова и др., 2009). Количество клеток в мацерате подсчитывали с помощью камеры Фукса-Розенталя, а затем рассчитывали количество клеток в 1 г сухой массы.

Полученный материал по мере отбора фиксировали спиртом (конечная концентрация спирта была не более 80%), суспензию взвешивали и хранили в холодильнике до анализа. Вес полученных образцов определяли, вычитая из веса суспензии вес 96% спирта, взятого для фиксации. Суспензию ткани, взятой для анализа, фильтровали, твердые остатки растирали в ступке с жидким азотом и экстрагировали 80% водным этанолом при комнатной температуре при периодическом помешивании и сменой растворителя через 12 часов до отрицательной реакции на углеводы (Dubois et al., 1956). Растворы, полученные при фиксации и экстракции, объединяли, и общий объем измеряли.

Аликвоту экстрактов (20–50 мл) высушивали, сухие вещества обрабатывали водой и хлороформом. Водный слой после хлороформа использовали для определения фенолов, а также уоновых кислот, аскорбиновой и дегидроаскорбиновой кислот (Антонова и др., 2005, 2009) и углеводов. Такой комплексный подход дает возможность сравнивать динамику исходных метаболитов и фенольных соединений и определять функциональные связи между ними.

Общее содержание ФС определяли в водном слое с реактивом Фолин-Дениса по методу (Jennings, 1981), который позволяет определять фено-

лы в присутствии белка. Аликвоту водного раствора подкисляли соляной кислотой до pH 2.5–3 и трижды обрабатывали эфиром. Объединенные эфирные вытяжки выпаривали на воздухе досуха, остаток растворяли в 3 мл ацетона и использовали для определения свободных ФК (Jennings, 1981). Оптическую плотность измеряли при $\lambda = 760$ нм, используя кювету с толщиной слоя 1 см. Калибровка проводилась в соответствии с методикой по тирозину (0–100 мкг/мл).

Содержание ФК, входящих в состав сложных и простых эфиров, определяли в водном слое после щелочного и кислотного гидролиза соответственно. Щелочной гидролиз проводили 2н NaOH. К аликвоте водного слоя добавляли равный объем 4н гидроокиси натрия и выдерживали при комнатной температуре в течение 2 часов. Затем к раствору осторожно добавляли 18% HCl до pH 2.0–2.5. Подкисленный раствор обрабатывали трехкратно эфиром, и объем водного слоя измеряли. Эфирную вытяжку выдерживали на воздухе, и сухой остаток растворяли в 3 мл ацетона. К водному слою добавляли 18% HCl до конечной концентрации 2н, и раствор выдерживали при температуре 100°C в течение 1 часа. К раствору осторожно добавляли 4н NaOH до pH 2.0–2.5 и затем раствор трехкратно обрабатывали эфиром. Эфирные вытяжки выпаривали на воздухе. Сухой остаток растворяли в 3 мл ацетона. Содержание ФК в эфирных вытяжках после щелочного и кислотного гидролизом определяли, как указано выше.

Аликвоту ацетоновых вытяжек высушивали, сухой остаток снова растворяли в 0.1 мл ацетона и методом ТСХ анализировали состав свободных и связанных ФК, используя в качестве носителя пластинки “Silufol UV-254”. После нанесения пятен пластинки обрабатывали паром, подсушивали на воздухе и помещали в камеру со смесью бензол-уксусная кислота (9 : 1). Кислоты идентифицировали по R_f метчиков и УФ спектрам индивидуальных пятен. Кроме того, для локализации пятен ФК хроматограммы обрабатывали смесью 0.5% раствор п-нитроналина в 2н HCl, 5% NaNO₃ и 20% ацетата натрия в воде (5 : 5 : 20, по объему).

Все операции, начиная с обработки спиртовых экстрактов, проводили в двукратной повторности, аналитическое определение веществ — не менее, чем в 3-х кратной повторности. Результаты анализов рассчитывали на сухой вес ткани и на клетку. Статистическую обработку результатов проводили по методу параметрического сравнения средних. На рисунках в барах показана относительная величина погрешности.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Данные показывают, что клетки последовательных этапов созревания и лигнификации ранней и

поздней ксилемы отличаются по фракционному и индивидуальному составу ФК, что обусловлено не только степенью развития трахеид, но и типом ксилемы в формирующемся годичном приросте сосны обыкновенной.

Содержание общих водорастворимых ФС в составе веществ, извлеченных 80%-ным спиртом из развивающихся клеток ранней и поздней ксилемы показано в расчете на сухую массу (рис. 1а) и на клетку (рис. 1б). При обоих методах расчета в ранней ксилеме содержание ФС уменьшалось от начала созревания к зрелым клеткам. В поздней, наблюдалось их повышение на первой стадии лигнификации (D1), а затем снижение в сторону зрелых клеток. При расчете на клетку разница в содержании ФС на стадиях лигнификации между ранней и поздней ксилемой усиливается (рис. 1б). Такое положение объясняется тем, что на стадиях созревания ранних и поздних трахеид за единицу времени в их стенках аккумулируются разное количество веществ, и в стенках поздних клеток откладывается больше компонентов, чем в стенках ранних (Антонова, Шебеко, 1985; Антонова, 1999), что влияет на расчет по сухому веществу. Нужно учесть, что по мере созревания количество клеток в 1 г сухого вещества уменьшается.

В зависимости от этапа лигнификации и типа трахеид содержание свободных и связанных ФК в составе спирторастворимых ФС варьировало. Индивидуальная изменчивость пула свободных ФК в ходе развития ранних и поздних трахеид показана на рис. 2. В ранней ксилеме содержание (на сухую массу) свободных ФК падало с началом лигнификации и практически не изменялось в ходе созревания клеток (рис. 2а). В поздних клетках содержание этих кислот в D1 сначала также снижалось, но по мере лигнификации возрастало. Расчет на клетку показал уменьшение пула свободных ФК в начале отложения лигнина в ранней и поздней ксилеме и его увеличение к зрелым клеткам (рис. 2б). На первом этапе созревания ранние трахеиды превосходили поздние по количеству свободных ФК в 3 раза, а на последнем этапе в 1.9 раза. Вдоль зоны созревания ранних трахеид относительное содержание свободных ФК в составе ФС варьировало от 21 до 32% с минимумом в начале лигнификации (D2a). В ходе лигнификации поздней ксилемы содержание свободных ФК в ФС изменялось от 6.4 до 12% при минимуме 3.7% в D1.

Как отмечалось выше, свободные ФК потенциально токсичны для клеток и повышенное их содержание может привести к апоптозу (Tagnon et al., 1998; Дубравина и др., 2005). Известно, что толщина стенок ранних трахеид хвойных, и сосны в частности, меньше, чем поздних. Как было нами ранее установлено, толщина клеточных стенок зависит от продолжительности развития трахеид в зоне созревания, и длительность созревания ран-

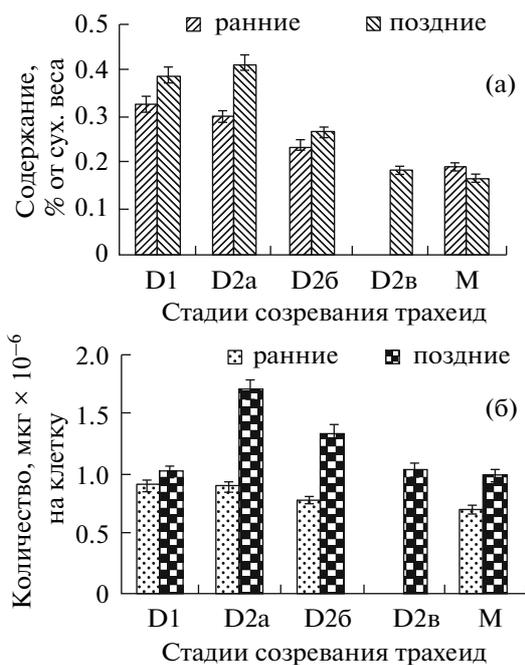


Рис. 1. Содержание спирторастворимых фенольных соединений в клетках последовательных стадий созревания ранней и поздней ксилемы сосны обыкновенной: D1 – до лигнификации, D2a, D26, D2в – в ходе лигнификации, M – зрелая ксилема: (а) – от сухого веса, (б) – на клетку.

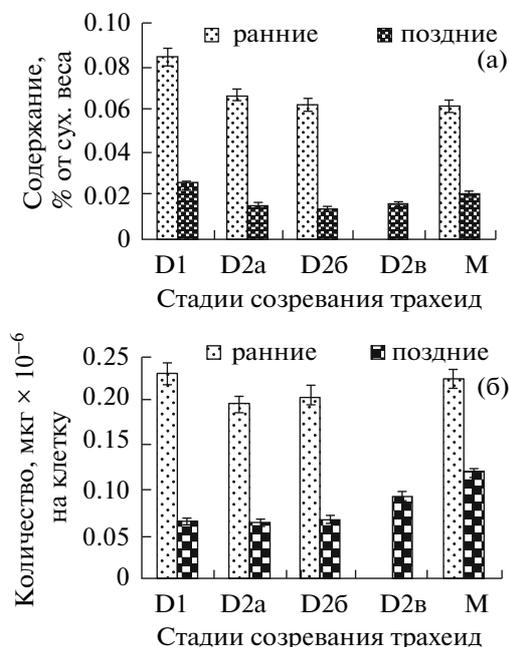


Рис. 2. Содержание свободных фенолкарбоновых кислот в клетках последовательных стадий созревания ранней и поздней ксилемы сосны обыкновенной: (а) – от сухого веса, (б) – на клетку. Обозначения как на рис. 1.

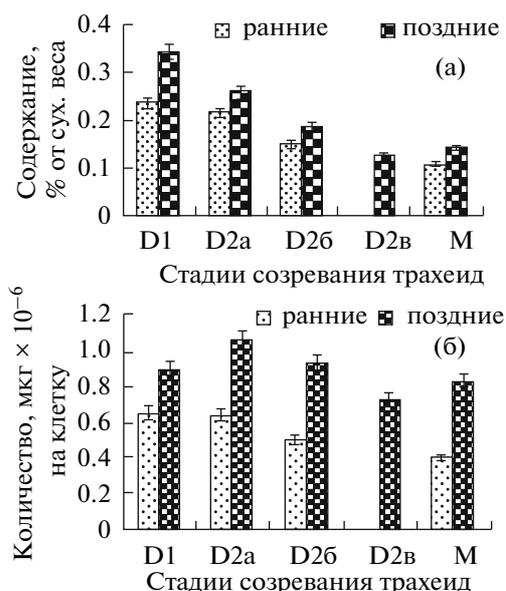


Рис. 3. Содержание спирторастворимых связанных фенолкарбоновых кислот в клетках последовательных стадий созревания ранней и поздней ксилемы сосны обыкновенной: (а) — от сухого веса, (б) — на клетку. Обозначения как на рис. 1.

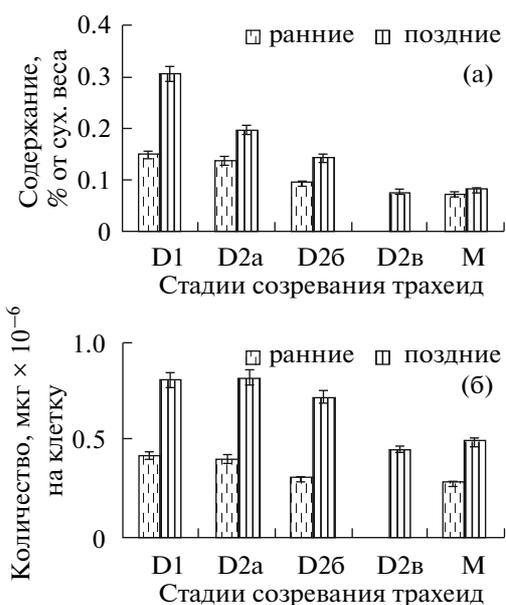


Рис. 4. Содержание простых эфиров фенолкарбоновых кислот в клетках последовательных стадий созревания ранней и поздней ксилемы сосны обыкновенной: (а) — от сухого веса и (б) — на клетку. Обозначение как на рис. 1.

них трахеид сосны значительно меньше, чем поздних (Antonova, Stasova, 1997). На фоне снижения содержания аскорбата в конце дифференциации ранних трахеид (Антонова и др., 2009) повышенное содержание свободных ФК может быть причиной более быстрого созревания ранних трахеид

(т.е. сокращения продолжительности развития) и перехода их в зону зрелой ксилемы.

На всех стадиях созревания ранней и поздней ксилемы в ФС доминировали связанные формы ФК. При этом ранние трахеиды содержали меньше конъюгированных кислот, чем поздние. Пул связанных ФК в ранней ксилеме как при расчете на сухую массу (рис. 3а), так и на клетку (рис. 3б) постепенно снижался к зрелым клеткам. В соответствии с этим относительное содержание связанных кислот в составе ФС ранней ксилемы от стадии D1 к зрелым клеткам последовательно уменьшалось с 72.4 до 57.34%. В ходе созревания поздней ксилемы тоже наблюдалось снижение пула связанных ФК, но только при расчете на сухую массу. В расчете на клетку, напротив, их количество увеличивалось от D1 к D2а и затем последовательно уменьшалось по мере созревания трахеид. На этапе D1 созревающие клетки поздней ксилемы содержали 88% конъюгированных ФК. С началом лигнификации их содержание в составе ФС снижалось до 61%, а затем постепенно повышалось до 85%.

Таким образом, в ходе созревания ранних и поздних трахеид пулы свободных и связанных ФК изменяются противоположно. По-видимому, они разделены пространственно, и, очевидно, пополнение одного пула идет за счет другого.

В составе конъюгированных ФК присутствовали эфиры с простыми (кислотолабильными) и сложными (щелочелабильными) связями. От начала к концу вторичного утолщения клеток ранней ксилемы пул простых эфиров постепенно уменьшался (рис. 4а, 4б). В поздней ксилеме наиболее низкое содержание простых эфиров при расчете на сухую массу наблюдалось на первом этапе лигнификации (рис. 4а), тогда как при расчете “на клетку” — на последнем этапе (рис. 4б). В зависимости от этапа развития клетки ранней ксилемы содержали простых эфиров в 1.7–2.3 раза меньше, чем клетки поздней.

В ходе созревания клеток ранней ксилемы пул сложных эфиров уменьшался (рис. 5а и 5б). Особенно резкое снижение отмечалось в расчете на клетку. Клетки поздней ксилемы в D2а содержали сложных эфиров (при расчете на клетку) на 20% больше, чем на этапе D1, затем их количество снижалось, увеличиваясь только в зрелой ксилеме. В начале вторичного утолщения (D1) клетки ранней ксилемы содержали сложных эфиров в 3 раза больше, чем клетки поздней, тогда как в конце созревания, напротив, в поздней ксилеме сложных эфиров было в 1.2 раза больше, чем в ранней.

В зависимости от этапа дифференциации и типа формирующейся древесины соотношение эфиров менялось. В ранней древесине соотношение простые/сложные варьировало от D1 к M от 1.7 до 3.5, в поздней — от 10.6 до 5.0. Это означает, что в

ходе созревания ранних трахеид содержание простых эфиров ФК относительно увеличивалось, а в ходе созревания поздних — уменьшалось.

Изменчивость связанных ФК указывает, во-первых, на различие в ферментах и/или изоэнзимах, отвечающих за создание или расщепление разных форм связей, на последовательных этапах развития вторичных стенок трахеид. Во-вторых, очевидно, что существует разница в метаболизме ФК при созревании клеток ранней и поздней ксилемы. В связи с этим, следует, вероятно, ожидать разный сценарий процесса биосинтеза лигнина в ранней и поздней ксилеме.

На хроматограммах фракции свободных ФК, выделенных из клеток ранней ксилемы, отмечалось до 8–10, поздней — до 12 пятен кислот. Были идентифицированы: коричневая (особенно на ранних стадиях созревания ранних трахеид), бензойная, а из оксибензойных — протокатеховая, п-оксибензойная и ванилиновая, которые могут появиться из КоА эфиров хинной, п-кумаровой и феруловой кислот соответственно при помощи механизма β-окисления (Запрометов, 1988, 1993; Осипов, Александрова, 1986). Протокатеховая, количественно не была определена, однако, если учесть, что все объемы в процессе анализа, в том числе и объемы пятен, наносимых на хроматограммы, выдерживались для всех образцов, визуально ее было значительно больше в клетках ранней, чем в поздней ксилемы, где она отмечалась только в следовых количествах. п-Оксибензойная и ванилиновая кислоты появлялись в основном на последних этапах созревания.

По локализации на хроматограммах, данным УФ-спектроскопии и реакции с п-нитроанилином во фракции свободных ФК поздней ксилемы присутствовала хлорогеновая кислота. В свободных ФК ранней ксилемы эта кислота отсутствовала.

Из оксикоричных кислот (ОК) в клетках ранней ксилемы в свободных ФК присутствовали в определяемых количествах п-кумаровая, кофейная, феруловая и синаповая (рис. 6а), а в поздних клетках — п-кумаровая, феруловая и синаповая (рис. 6б). Лигнификация ранней ксилемы сопровождалась очень незначительным изменением содержания (в μмоль на г сух массы) кофейной кислоты, тогда как содержание п-кумаровой, феруловой и синаповой кислот уменьшалось в ходе лигнификации (рис. 6а). Уровень феруловой кислоты на всех этапах созревания выше, чем других кислот. Снижение п-кумаровой при низком уровне кофейной и высоком уровне феруловой свидетельствует об активной метаболизации кофейной. В свою очередь достаточно высокий уровень синаповой на всех стадиях лигнификации указывает также на активность метаболизации феруловой.

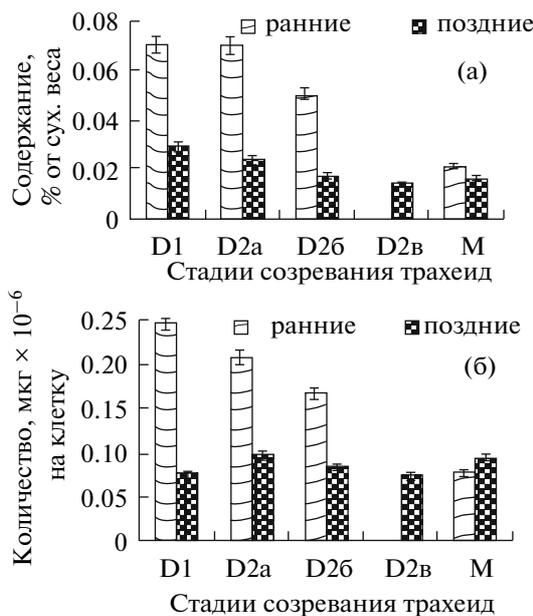


Рис. 5. Содержание сложных эфиров фенолкарбонных кислот в клетках последовательных стадий созревания ранней и поздней ксилемы сосны обыкновенной: (а) — от сухого веса, (б) — на клетку. Обозначение как на рис. 1.

В клетках поздней ксилемы кофейная кислота в свободной форме не была обнаружена. Однако, как указано выше, присутствовала хлорогеновая кислота, которая является сложным эфиром кофейной и хинной кислот. Поскольку протокатеховая кислота обнаруживалась только в следовых количествах, расход кофейной на β-окисление был, по-видимому, минимальным. Отсутствие кофейной могло происходить из-за низкого уровня п-кумаровой, пул которой, постепенно увеличивался к зрелым клеткам (рис. 6б), и, возможно, из-за торможения ее гидроксирования на последних этапах созревания клеток. Ранее было показано, что для реакции гидроксирования необходима аскорбиновая кислота, которая является донором электронов (Vsughan, Butt, 1969). Причиной торможения преобразования п-кумаровой кислоты в кофейную в клетках поздней ксилемы могло быть существенно меньшее содержание аскорбиновой кислоты по сравнению с клетками ранней ксилемы (Антонова и др., 2009). В этих условиях переход к кофейной кислоте мог бы осуществляться через п-кумарат-КоА эфиры (Voerjan et al., 2003) или через хлорогеновую кислоту, которая является предпочтительным субстратом для п-кумарат 3-гидроксилазы (Schoch et al., 2001) и которая, как указано выше, присутствовала в свободной форме в клетках поздней ксилемы. В ранней ксилеме свободная хлорогеновая кислота отсутствовала, но отмечалось повышенное содержание протокатеховой кислоты, которая, как упоминалось выше, мо-

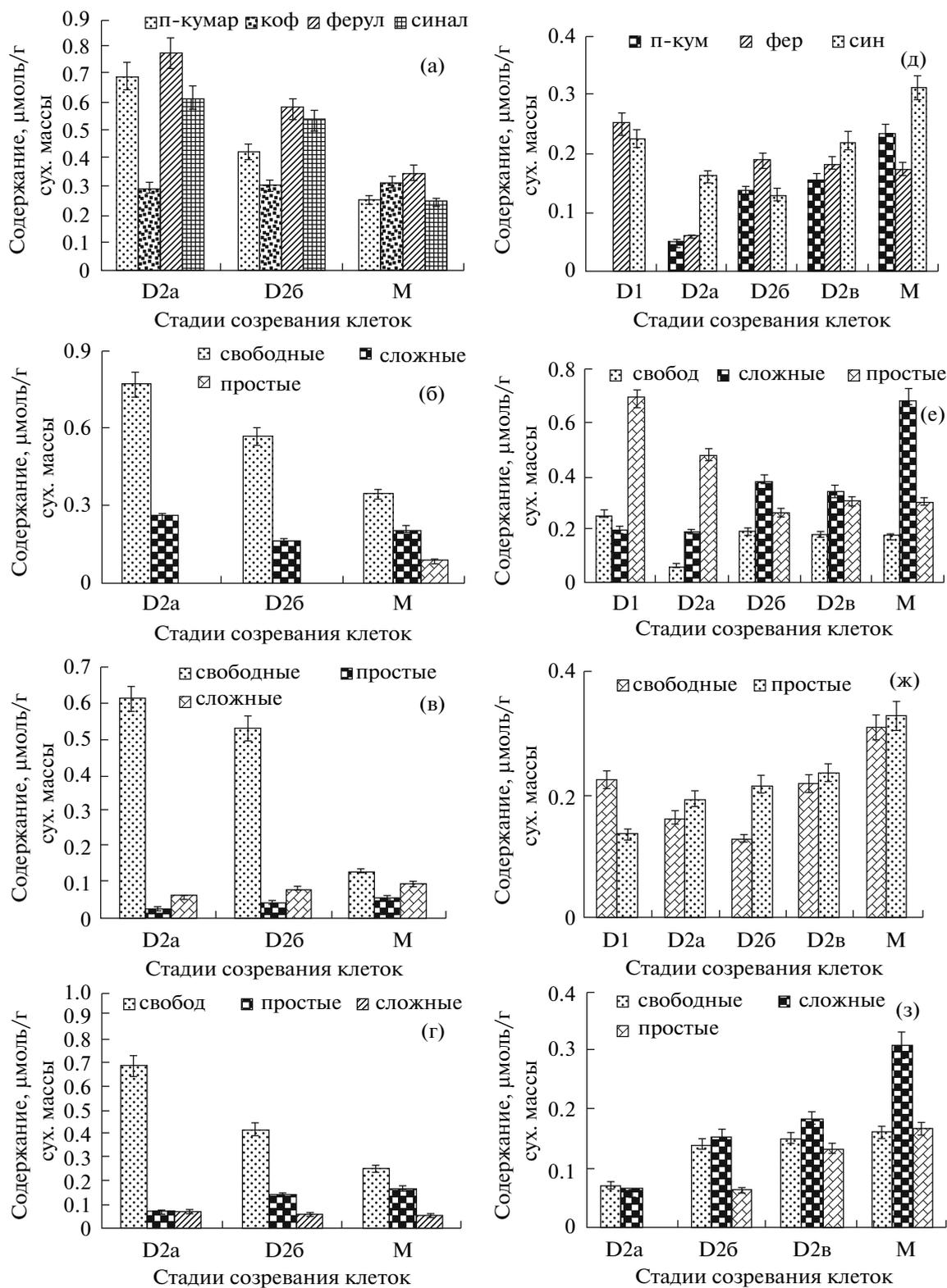


Рис. 6. Содержание ($\mu\text{моль/г}$ сух. массы) п-кумаровой (п-кум), кофейной (коф), феруловой (фер), синаповой (син) и коричной кислот в свободной форме (а, д, з) и в виде простых и сложных эфиров в клетках последовательных стадий созревания ранней (а, б, в, г) и поздней (д, е, ж, з) ксилемы сосны обыкновенной. Обозначение этапов – на рис. 1.

жет появиться в результате β -окисления хинной. Очевидно, что хинная кислота, которая является одним из метаболитов шикиматного пути образования фенилпропаноидов в хвойных (Осипов, Александрова, 1986), используется в клетках в зависимости от условий их развития.

Появление свободной феруловой кислоты в клетках поздней ксилемы может быть результатом альтернативного пути ее образования через п-кумарил-КоА к кофеат-КоА и далее под действием кофеат-КоА О-метилтрансферазы (ККоА-ОМТ) к ферулат-КоА (Whetten, Sederoff, 1995; Voerjan et al., 2003). Показано, например, что в проростках *Pinus pinaster* засуха инициирует увеличение ККоА-ОМТ, но не кумарил-О метил трансферазы (КОМТ) (Costa et al., 1998). Засушливые условия отрицательно влияют на количество и активность КОМТ в листьях кукурузы, подвергнутой засухе (Vincent et al., 2005).

Перед лигнификацией (D1) поздней ксилемы п-кумаровая кислота в свободной форме, как отмечено выше, отсутствовала, но с ее началом уровень кислоты постепенно повышался к зрелым клеткам (рис. 6д). Напротив, уровень феруловой и синаповой кислот был очень высоким. С началом лигнификации содержание феруловой резко снижалось, затем увеличивалось и до конца созревания клеток оставалось на одном уровне. Уровень синаповой сначала снижался незначительно, но к концу лигнификации существенно возрастал, и зрелые клетки содержали в 1.5 раза больше свободной синаповой кислоты, чем феруловой. Это указывает на активное гидроксирование феруловой с последующим ее метилированием. Было показано, что ККоА-ОМТ играет роль как в метилировании кофеат-КоА, так и гидроксированного производного ферулат-КоА (Ye et al., 1994). Поэтому снижение пула свободной феруловой кислоты в ходе развития вторичной стенки и лигнификации, очевидно, вызвано не только ее расходом на синтез гваяцильных монолигнолов, но и на синтез синаповой. Результаты свидетельствуют о разобщении в системе преобразования ОК при формировании поздней ксилемы, формирующейся в условиях внутреннего водного стресса.

Различие в динамике свободных ОК при созревании ранних и поздних трахеид вновь указывает на различие в метаболизме кислот и разном их участии в биосинтезе лигнина двух типов ксилемы. Эти данные поддерживают предположение о существовании двух альтернативных путей преобразования фенилпропановых структур, использование которых в растениях зависит от растений и типа клеток (Whetten, Sederoff, 1995) и, очевидно, от эндогенных условий их развития (например, обеспеченности влагой) в самом растении.

Лигнифицирующиеся клетки ранней ксилемы содержали п-кумаровую, феруловую и синаповую

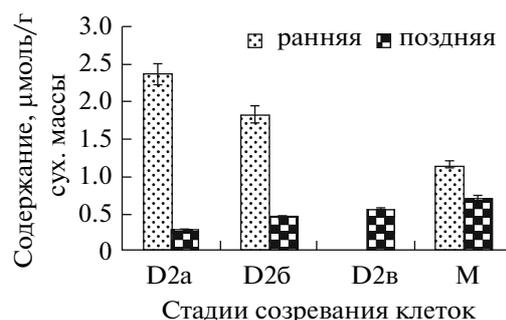


Рис. 7. Суммарное содержание свободных оксикоричных кислот в клетках последовательных стадий созревания ранней (а) и поздней (б) ксилемы сосны обыкновенной. Обозначение этапов на рис. 1.

кислоты также в виде простых и сложных эфиров ОК. На рисунках 6б–6г показана их изменчивость в ходе лигнификации в сравнении с содержанием свободных кислот. Простые эфиры феруловой кислоты наблюдались только в зрелых клетках ранней ксилемы (рис. 6б). В начале лигнификации уровень свободной формы феруловой превышал уровень ее сложных эфиров в 3 раза. Он незначительно изменялся в ходе процесса, тогда как уровень свободной феруловой постоянно снижался и в зрелых клетках превышал уровень сложных в 1.5 раза. Снижение уровня свободных синаповой и п-кумаровой кислот сопровождалось повышением уровня сложных эфиров п-кумаровой кислоты и простых эфиров синаповой (рис. 6в и 6г соответственно).

В клетках поздней ксилемы простые эфиры ОК включали феруловую и синаповую кислоты. В ходе созревания клеток содержание простых эфиров феруловой кислоты уменьшалось (рис. 6е), тогда как синаповой, напротив, увеличивалось (рис. 6ж). В состав сложных эфиров поздних трахеид входили в основном феруловая и синаповая кислоты, но последнюю не всегда удавалось определить количественно. Сложные эфиры феруловой кислоты последовательно увеличивались к зрелой ксилеме (рис. 6е).

На рис. 6з приведены данные по содержанию коричной кислоты, которая является предшественницей ОК, и ее эфиров в ходе лигнификации поздней ксилемы. Низкий уровень свободной коричной кислоты в самом начале отложения лигнина и постепенное его увеличение к зрелым клеткам указывает на активное вовлечение кислоты в синтез ОК и снижение этой активности по мере лигнификации.

Если оценивать этапы лигнификации по сумме всех свободных ОК (п-кумаровой, феруловой, синаповой) кислот, то можно отметить, что их содержание в ранней ксилеме постепенно снижалось, тогда как в поздней ксилеме, напротив, повыша-

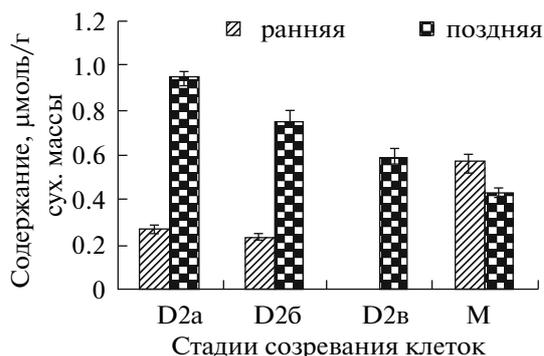


Рис. 8. Содержание (µмоль/г сух. массы) свободной бензойной в клетках последовательных стадий созревания ранней и поздней ксилемы сосны обыкновенной. Обозначение этапов на рис. 1.

лось (рис. 7). Лигнификация ранней ксилемы сопровождалась снижением суммарного содержания свободных ОК в 2 раза, а поздней, напротив, увеличением в 2.5 раза. Это свидетельствует о разной динамике процесса лигнификации этих слоев ксилемы годичного прироста сосны обыкновенной и подтверждается данными по отложению лигнина. По мере созревания ранней ксилемы лигнификация усиливается, а поздней, напротив, наиболее активно идет в начале процесса (Antonova et al., 2009).

В развивающихся клетках ранней и поздней ксилемы определяли также содержание свободной бензойной кислоты (спиртовые экстракты исходного материала) (рис. 8). Интерес к ней связан с ее отрицательным влиянием на потенциал мембран (Glass, Dunlop, 1974), благодаря чему может измениться транспорт метаболитов, в том числе монолигнолов. В начале лигнификации (D2a) ранней ксилемы свободной бензойной кислоты при расчете на сухую массу было в 3.5 раза меньше, чем на той же стадии созревания клеток поздней ксилемы. В сочетании с содержанием аскорбиновой кислоты, которая ограничивает доступность предшественников лигнина окислительным реакциям, и содержание которой на этой стадии значительно выше в клетках ранней ксилемы, чем в поздней (Антонова и др., 2009), можно объяснить торможение биосинтеза лигнина на ранних стадиях и усиление лигнификации к концу созревания ранних клеток. В поздней ксилеме, напротив, высокое содержание свободной бензойной кислоты и низкое содержание аскорбиновой кислоты в D2a (Антонова и др., 2009) способствовало активному биосинтезу лигнина в самом начале процесса и снижение активности к зрелым клеткам параллельно с увеличением содержания аскорбиновой кислоты.

В конце созревания ранних трахеид наблюдалось значительное увеличение содержания свободной бензойной кислоты, что может иницииро-

вать выход из вакуоли гидролаз и последующее разрушение протопласта. С этим процессом связывают окончание созревания трахеид и выход их в зону зрелых клеток (Wodzicki, Brown, 1973). Установлено, что количество веществ, аккумулированных во вторичных стенках, зависит от длительности созревания, а продолжительность развития ранних трахеид в зоне меньше, чем поздних (Antonova, Stasova, 1993; Антонова, 1999). В соответствии с этим толщина стенок ранних трахеид значительно меньше, чем толщина поздних. Эти наблюдения соответствуют более низкому содержанию свободной бензойной кислоты в конце созревания поздних клеток по сравнению с их содержанием в клетках ранней (рис. 8).

Таким образом, клетки последовательных этапов созревания и лигнификации ранней и поздней ксилемы, формирующейся в период вегетации в стволах сосны, значительно различаются по содержанию ФС, составу фракций ФК и ОК. На всех стадиях развития вторичной стенки клетки ранней ксилемы содержали ФС и связанных ФК, доминирующих в составе ФС, меньше, чем клетки поздней ксилемы. Соответственно, клетки тех же стадий созревания ранней ксилемы содержали больше свободных ФК. При этом наивысший уровень свободных ФК отмечали перед лигнификацией, а общих ФС и связанных ФК в начале этого процесса как в период созревания ранних, так и поздних трахеид. В связанных ФК всегда преобладали простые эфиры, количество которых в клетках поздней ксилемы было больше, чем в клетках ранней. Клетки ранней ксилемы на этапах созревания содержали соответственно больше сложных эфиров. Последовательные этапы лигнификации ранней и поздней ксилемы различались по составу и количеству индивидуальных оксикоричных кислот (п-кумаровой, кофейной, феруловой и синаповой кислот).

Данные указывают, что при формировании двух слоев годичного слоя ксилемы сосны следует ожидать различия как в биосинтезе лигнина, так и структуре самого лигнина.

Работа поддержана Российским Фондом Фундаментальных Исследований, грант № 06-04-49501.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Антонова Г.Ф. Рост клеток хвойных. Новосибирск: Наука, 1999. 232 с.
- Антонова Г.Ф., Железниченко Т.В., Стасова В.В. Изменение содержания и состава фенолкарбоновых кислот в ходе роста клеток ксилемы сосны обыкновенной // Онтогенез. 2011. Т. 42. № 2. С. 1–9.
- Антонова Г.Ф., Стасова В.В., Вараксина Т.Н. Аскорбиновая кислота и развитие клеток ксилемы и флоэмы в стволе сосны обыкновенной // Физиология растений. 2009. Т. 56. № 2. С. 210–219.

- Антонова Г.Ф., Чаплыгина И.А., Вараксина Т.Н., Стасова В.В. Аскорбиновая кислота и развитие ксилемы в стволах деревьев лиственницы сибирской // Физиология растений. 2005. Т. 52. С. 97–107.
- Антонова Г.Ф., Шебеко В.В. Использование крезолового прочного фиолетового при изучении образования древесины // Химия древесины. 1981. № 4. С. 102–105.
- Антонова Г.Ф., Шебеко В.В. Формирование ксилемы хвойных. 3. Динамика развития трахеид в зонах дифференциации // Лесоведение. 1985. № 5. С. 71–74.
- Дубравина Г.А., Зайцева С.М., Загоскина Н.В. Изменения в образовании и локализации фенольных соединений при дифференциации тканей тиса ягодного и тиса канадского в условиях *in vitro* // Физиология растений. 2005. Т. 52. № 5. С. 755–762.
- Загоскина Н.В., Федосеева В.Г., Фролова Л.В., Азаренкова Н.Д., Запрометов М.Н. Культура ткани чайного растения: дифференциация, уровень ploидности, образование фенольных соединений // Физиология растений. 1994. Т. 41. № 5. С. 762–767.
- Запрометов М.Н. Фенольные соединения растений и их биогенез // Итоги науки и техники. Биологическая серия. М.: ВИНТИ, 1988. Т. 27. 188 с.
- Запрометов М.Н. Фенольные соединения: распространение, метаболизм и функции в растениях. М.: Наука, 1993. 272 с.
- Запрометов М.Н. Фенольные соединения и их роль в жизни растения // LVI Тимирязевские чтения. М.: Наука, 1996. 45 с.
- Осинов В.И. Гидроароматические кислоты в жизнедеятельности хвойных. Новосибирск: Наука, Сиб. отд-ние, 1979. 111. 38 с.
- Осинов В.И., Александрова Л.П. Биосинтез оксibenзойных кислот в проростках *Pinus sylvestris* L. // Изв. СО АН СССР, Сер. Биол. наук. 1986. Вып. 1. С. 83–86.
- Чаплыгина И.А. Особенности формирования ранних и поздних трахеид при образовании древесины лиственницы сибирской: Автореферат дис. ... кан. биол. Красноярск: ИЛ СО РАН, 2007. 17 с.
- Alonso M., Vara S., Vega J.G. Phenolic acids as biochemical indicator for parameters of stress in *Pinus pinaster* nurseries // Investigacion Agraria, Sistemas y Recursos Forestales. 1993. V. 2. № 2. P. 185–196.
- Antonova G.F., Varaksina T.N., Stasova V.V., Zhelezniichenko T.V. The peculiarities of lignin deposition during development of early- and latewood in *Scots pine* // Материалы докладов VII Международного Симпозиума по фенольным соединениям: Фундаментальные и прикладные аспекты. Москва, 19–23 октября, 2009. М., 2009. С. 292–293.
- Antonova G.F., Chaplygina I.A. The cell wall structure formation of earlywood and latewood in larch (*Larix sibirica* Ldb.) // Proceedings/Actes of International Symposium of IUFRO Working Group S2.02.07 “Integrated research activities for supply of improved larch to tree planting: tree improvement, floral biology and nursery production”. September 16–21, Canada, Quebec. 2007. P. 77–81.
- Antonova G.F., Varaksina T.N., Stasova V.V. The differences in the lignification of earlywood and latewood in larch (*Larix sibirica* Ldb.) // Eur. J. For. Res. 2007. V. 10. № 2. P. 149–161.
- Boerjan W., Ralph J., Baucher M. Lignin biosynthesis // Annu. Rev. Plant Biol. 2003. V. 54. P. 519–546.
- Antonova G.F., Stasova V.V. Effects of environmental factors on wood formation in Scots pine stems // Trees. 1993. V. 7. № 5. P. 214–219.
- Antonova G.F., Stasova V.V. Effects of environmental factors on wood formation in larch (*Larix sibirica* Ldb.) stems // Trees. 1997. V. 10. № 1. P. 24–30.
- Burr S.J., Fry S.C. Extracellular cross-linking of maize arabinoxylans by oxidation of feruloyl esters to form oligoferuloyl esters and ether-like bonds // The Plant J.: for cell and molecular biology. 2009. V. 58. № 4. P. 554–567.
- Costa P., Bahrman N., Frigerio J.M., Kremer A., Plomion C. Water-deficit-responsive proteins in maritime pine // Plant Mol Biol. 1998. V. 38. № 4. P. 587–96.
- Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A., Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances // Anal. Chem. 1956. V. 28. P. 350–355.
- Ferguson L.R., Lim I.F., Pearson A.E., Ralph J., Harris P.J. Bacterial antimutagenesis by hydrocinnamic acids from plant cell walls // Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis. 2003. V. 542. № 1–2. P. 49–58.
- Fry S.C. Feruloylated pectins from the primary cell wall: their structure and possible functions // Planta. 1983. V. 157. P. 111–123.
- Fry S.C. Cross-linking of matrix polymers in the growing cell walls of angiosperms // Annu. Rev. Plant Physiol. 1986. V. 37. P. 165–186.
- Fry S.C. Plant cell expansion: loosening the ties // Current Biology. 1993. V. 3. № 6. P. 355–357.
- Glass A.D.M., Dunlop J. Influence of phenolic acids on ion uptake. 4. Depolarization of membrane potential // Plant Physiol. 1974. V. 54. P. 855–858.
- Iiyama K., Lam T.B.T., Stone B.A. Phenolic acid bridges between polysaccharides and lignin in wheat Internodes // Phytochemistry. 1990. V. 29. P. 733–737.
- Jennings A.C. The Determination of dihydroxyphenolic compounds in extracts of plant tissues // Analyt. Biochem. 1981. V. 118. P. 396–398.
- Hatfield R., Ralph J., Grabber J.H. A potential role for synapyl p-coumarate as a radical transfer mechanism in grass lignin formation // Planta. 2008. V. 228. № 6. P. 919–28.
- Lozovaya V.V., Gorshkova T.A., Yablokova E.V., Rummyantseva N.I., Valieva A., Ulanov A., Luwe M. Antioxidants in the apoplast and symplast of beech (*Fagus sylvatica* L.) leaves, seasonal variations and response to changing ozone concentrations in air // Plant Cell Environ. 1996. V. 19. P. 321–328.
- Murmanis L., Sachs J.B. Seasonal development of secondary xylem in *Pinus strobus* L. // Wood Sci. Technol. 1969. V. 3. P. 177–193.
- Rice-Evans C.A., Miller N.J., Paganga G. Antioxidant properties of phenolic compounds // Trends Plant Sci. 1997. V. 2. P. 152–159.
- Schoch G., Goepfert S., Morant M., Hehn F., Meyer D. et al. CYP08A3 from *Arabidopsis thaliana* is a 3-hydroxylase of phenolic esters, a missing link in the phenylpro-

- panoid pathway // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276. P. 566–574.
- Shann J.R., Blum U. The utilization of exogenously supplied ferulic acid in lignin biosynthesis // *Phytochemistry*. 1987. V. 26. P. 2977–2982.
- Takahama U. Regulation of peroxidase-dependent oxidation of phenolics by ascorbic acid: different effects of ascorbic acid on the oxidation of coniferyl alcohol by apoplastic soluble and cell wall-bound peroxidase from epicotyls of *Vigna angularis* // *Plant Cell Physiol.* 1993. V. 34. P. 809–817.
- Takahama U., Oniki T. A Peroxidase-phenolics-ascorbate system can scavenge hydrogen peroxide in plant cells // *Physiol. Plant.* 1997. V. 101. P. 845–852.
- Tamagnon L., Mtrida A., Stacey N., Plaskitt K., Parr A., Chang C.-F., Lynn D., Dow J.M., Roberts K., Martin C. Inhibition of phenolic acid metabolism results in precocious cell death and altered cell morphology in leaves of transgenic tobacco plants // *Plant Cell.* 1998. V. 10. P. 1801–1816.
- Teutonico R.A., Dudley M.W., Orr J.D., Lynn D.G., Binns A.N. Activity and accumulation of cell division-promoting phenolics in tobacco tissue cultures // *Plant Physiol.* 1991. V. 97. P. 288–297.
- Vincent D., Lapierre C., Pollet B., Cornic G., Negroni L., Zivy M. Water deficits affect caffeate o-methyltransferase, lignification, and related enzymes in maize leaves. A proteomic investigation // *Plant Physiology*. 2005. V. 137. P. 949–960.
- Vsughan R.F.T., Butt V.S. The hydroxylation of *p*-coumaric acid by an enzyme from leaves of spinach beet (*Beta vulgaris* L.) // *Biochem J.* 1969. V. 113. P. 109–115.
- Waldron K.W., Ng A., Parker M.L., Parr A.J. Ferulic acid dehydrodimers in the cell walls of *Beta vulgaris* and their possible role in texture // *J. Sci. Food Agric.* 1997. V. 74. P. 221–228.
- Wallace G., Fry S.C. Phenolic compounds of the plant cell wall // *Int. Rev. Cytol.* 1994. V. 151. P. 229–267.
- Whetten R., Sederoff R. Lignin biosynthesis // *The Plant Cell.* 1995. V. 7. P. 1001–1013.
- Weidner S., Amorowicz R., Karama M., Fraczek E. Changes in endogenous phenolic acids during development of *Secale cereale* caryopses and after dehydration treatment of unripe rye grains // *Plant Physiol. Biochem.* 2000. V. 38. № 7–8. P. 595–602.
- Wodzicki T.J., Brown C.L. Organization and breakdown of the protoplast during maturation of pine tracheids // *Amer. J. Bot.* V. 60. № 7. P. 631–640.
- Ye Z.-N., Kneusel R.E., Matern U., Varner J.E. An alternative mutilation pathway in lignin biosyntheses in *Zinnia* // *Plant Cell.* 1994. V. 6. P. 1427–1439.
- Zahner R. Internal moisture stress and wood formation in conifers // *For. Prod. J.* 1963. V. 13. P. 240–247.
- Zarra I., Sánchez M., E. Quejheiro E., Peña M.J., Revilla G. The cell wall stiffening mechanism in *Pinus pinaster* Aiton: regulation by apoplastic levels of ascorbate and hydrogen peroxide // *J. Sci. Food Agric.* 1999. V. 79. P. 416–420.

Changes in Phenolic Acids during Maturation and Lignification of Scots Pine Xylem

G. F. Antonova, T. N. Varaksina, T. V. Zheleznichenko, and V. V. Stasova

Sukachev Institute of the Forest, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, 660036 Russia

e-mail: institute_forest@ksc.krasn.ru

Abstract—The content and fractional composition of alcohol soluble phenolic acids (PhA) in cells with different degree maturation and lignification in the course of early and late timber formation in the pine (*Pinus sylvestris*) during vegetation were studied. Phenolic compounds (PhC), extracted by 80% ethanol, were divided into free and bound fractions of PhA. In turn, the esters and ethers were isolated from bound PhA. The contents of all substances were calculated per dry weight and per cell. Considerable differences have been found to exist in both the contents and the composition of the fractions PhA on successive stages of tracheid maturation of early and late xylem. Early timber tracheids at all secondary wall thickening steps contained PhC less and free PhA more than late timber tracheids. Throughout early timber tracheid maturation, the pool of free PhA per cell declined at the beginning of lignification and then increased gradually while that of bound PhA decreased. The maturation of late timber tracheids were accompanied by the rise of free PhA pool and the diminution of bound PhA pool. In the composition of bound PhA, the ethers were always dominant, and the amount of that in early timber cells was less than in late timber cells. The cells of early xylem at all steps of maturation contained more of ester. The sum total of free hydroxycinnamic acids, precursors of monolignols, gradually decreased during early xylem lignification as the result of the reduction of the pools of *p*-coumaric, caffeic, ferulic and synapic acids, while that of their ester risen. In the course of late xylem lignification, the pools of free *p*-coumaric, ferulic and, especially, synapic acids increased. Simultaneously, the amount of ferulic acid ester and synapic acid ether increased too. According to the data, lignin biosynthesis in early xylem and late xylem occurs with different dynamics and the structure of lignins of two xylem types might be different too.

Keywords: *Pinus sylvestris* L., early and late xylem, secondary thickening and lignification, phenol-carbonic acids.