

УДК 581.19:577.13

ИЗМЕНЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ И СОСТАВА ФЕНОЛКАРБОНОВЫХ КИСЛОТ В ХОДЕ РОСТА КЛЕТОК КСИЛЕМЫ СОСНЫ ОБЫКНОВЕННОЙ

© 2011 г. Г. Ф. Антонова, 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 23.06.09 г.

Окончательный вариант 22.03.10 г.

Содержание и состав фракций спирторастворимых фенолкарбонных кислот (ФК) изучали в связи с ростом клеток ксилемы в ходе образования годичного прироста древесины в стволах сосны обыкновенной. Клетки камбиальной зоны, двух этапов роста растяжением и начала вторичного утолщения (до лигнификации) в период формирования ранней ксилемы последовательно выделялись из отрезков ствола 25-летних деревьев сосны при постоянном анатомическом и гистохимическом контроле. Содержание свободных и связанных форм, а в их составе простых и сложных эфиров ФК, извлеченных из тканей 80%-ным этанолом, рассчитывали на сухой вес и на клетку. Содержание, соотношение фракций и состав кислот значительно меняются от камбиальной зоны до начала вторичного утолщения трахеид, и характер варьирования зависит от метода расчета. В расчете на клетку количество свободных и связанных ФК, а в их составе сложных и, особенно, простых эфиров, увеличивалось на первом этапе роста растяжением, снижалось на втором и вновь возрастало в начале отложения вторичной стенки. В зависимости от стадии развития клеток пул связанных кислот превышал пул свободных в 2–5 раз. В составе свободных оксикоричных кислот доминировали синаповая и феруловая кислоты. Состав и содержание оксикоричных кислот в простых и сложных эфирах тоже зависели от этапа развития клеток. В камбии основными агликонами в простых эфирах были п-кумаровая и синаповая, на других стадиях развития — синаповая и кофейная. Сложные эфиры камбия включали главным образом п-кумаровую кислоту, а других этапах развития — синаповую и феруловую кислоты. На первых стадиях роста бензойная кислота входила в состав главным образом в сложные эфиры. Пул этих эфиров от первой фазы роста к началу утолщения стенок уменьшался. Соответственно повышался уровень свободной бензойной кислоты.

Ключевые слова: фенолкарбонные кислоты, фракции, состав, камбиальная зона, рост растяжением, вторичное утолщение, ранняя ксилема, *Pinus sylvestris*.

В росте и развитии растений важную роль играют такие продукты вторичного метаболизма, как фенолкарбонные кислоты (ФК) и, в частности, оксисинаповые и оксикоричные, а также их производные (Запрометов, 1993). В растениях оксикоричные кислоты (п-кумаровая, кофейная, феруловая, синаповая) обладают разными физиологическими функциями. Опосредуя действие таких ростовых веществ, как цитокинин, производные ФК контролируют деление и расширение клеток (Teutonico et al., 1991). Благодаря природным антиоксидантным свойствам, эфиры оксикоричных кислот, в частности, хлорогеновая кислота, могут защищать липиды от перекисного окисления *in vivo* (Rice-Evans et al., 1997). По некоторым данным оксикоричные кислоты обладают антимутагенными свойствами (Ferguson et al., 2003) и могут влиять на апоптоз клеток (Tamagnon et al., 1998; Ванюшин и др., 2004; Дубравина и др., 2005). Поскольку ФК в

свободной форме потенциально токсичны для клетки, они находятся в растениях главным образом в связанной форме и конъюгированы с сахарами или органическими кислотами.

Помимо участия в синтезе лигнина, фенилпропановые единицы которого являются производными оксикоричных кислот, ФК используются в росте клеток и создании структуры первичных клеточных стенок. Димеризованные оксикоричные кислоты, такие как диферуловая кислота, могут поперечно связывать как сами пектины, так и пектины с другими нецеллюлозными полисахаридами и протеогликанами (Fry, 1993, 2004; Waldron et al., 1997; Антонова, 1999).

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 большин-

стве работ, посвященных изучению ФК в растениях, например, в 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 таких спирторастворимых фенолов зависит от степени дифференциации тканей, как это было обнаружено в каллусных культурах чайного растения (Загоскина и др., 1994) и при развитии зерен ржи (Weidner et al., 2000). Было показано, что общих фенольных соединений, а в их составе ФК в расчете на сухой вес, больше в начале развития, чем на конечных стадиях созревания (Weidner et al., 2000).

ФК и их роль в процессе роста изучалась в основном на однодольных и двудольных растениях. Значительно меньше исследований было посвящено ФК в связи с ростом древесных растений, в том числе хвойных. Исследуя образование ранних и поздних трахеид в стволах лиственницы сибирской, мы нашли, что содержание свободных и связанных ФК, а также их состав, зависит как от стадии дифференциации клеток, так и типа (ранней или поздней) ксилемы, которая формируется в данный период вегетации (Чаплыгина, 2007). Изменение фракционного состава и содержания ФК в ходе роста трахеид лиственницы коррелировало с содержанием и соотношением аскорбиновой (АК) и дегидроаскорбиновой (ДАК) кислот (Антонова и др., 2005). В тканях растений от соотношения этих кислот, которое определяет их окислительно-восстановительный потенциал, зависит процесс сшивания полисахаридов (Zarra et al., 1999) и полимеризация монолигнолов – предшественников лигнина (Takahama, 1993, 1994). Считают, что аскорбиновая кислота регулирует количество коричных кислот доступных действию пероксидаз, присутствующих в стенке, и пока аскорбат доступен для перекиси водорода, процессы сшивки и полимеризации в стенке тормозятся (Takahama, Oniki, 1997). Например, зоне активного роста корней огурца соответствует повышенное содержание АК и определенное соотношение АК/ДАК, которое в апопласте и симпласте изменяется вдоль оси роста корня (Córdoba-Pedregosa et al., 2003; Ros-Barceló et al. 2006). На гипокотиле сосны было показано, что высокое содержание АК благоприятствует их росту, но с уменьшением ее количества вдоль оси рост гипокотилей тормозится (Sánchez et al., 1997; Zarra et al., 1999). Предполагают, что ограничение роста клеток гипокотилей происходит в результате образования диферуловых мостиков между полисахаридами клеточной стенки под действием пероксидаз, присутствующих в стенке.

Мы изучали содержание и соотношение аскорбата и дегидроаскорбата в растущих клетках ксилемы при образовании годичного слоя в стволах дере-

вьев сосны обыкновенной (Антонова и др., 2009). Было найдено, что каждая из стадий дифференциации клеток характеризуется определенным уровнем АК и ДАК. Такие изменения в метаболизме должны влиять на содержание и фракционный состав ФК, а это, в свою очередь, на ростовые процессы. Поэтому следующим этапом исследования явилось изучение содержания и состава свободных и связанных форм ФК.

В работе изучались спирторастворимые ФК, их фракционный состав и содержание оксикоричных кислот на этапах образования и роста ранних трахеид при формировании годичного прироста древесины в стволах сосны обыкновенной.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом исследования служили слои клеток развивающегося годичного слоя ксилемы, полученные в начале июня из стволов двух интактных 20–25 летних деревьев сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.), растущих в посадках Погорельской экспериментальной базы Института.

Стволы распиливали по мутовкам, удаляли кору, непроводящую и проводящую флоэму, и методом микрорасщепления с помощью скальпеля собирали слои клеток, постоянно контролируя гистохимически стадию их развития, как было сделано ранее (Антонова и др., 2009). В качестве красителей применяли крезил-виолет, позволяющий, благодаря метахромазии, визуальным образом определять принадлежность клеток к фазам дифференциации (Антонова, Шебеко, 1981), а также реактив Визнера (флороглюцин – соляная кислота) для определения начала лигнификации.

Были получены клетки камбиальной зоны (Кам), зоны роста растяжением и начала вторичного утолщения. В начале июня, когда идет образование ранней ксилемы, зона роста растяжением сохранила, как обычно в это время сезона, достаточное большое (до 10–14) число клеток, что позволило разделить ее на две подзоны. Одна из них прилежала к камбиальной зоне, т.е. клетки ксилемы находились в первой фазе роста радиального диаметра (Рост1), а вторая часть прилежала к зоне отложения веществ вторичной стенки и находились соответственно во второй фазе (Рост2). В тот же период развития в формирующемся годичном слое присутствовали клетки первого этапа вторичного утолщения, в которых отмечалось отложение вторичной стенки, но лигнификация не наблюдалась (D1). Начало роста клеток растяжением отмечали по видимому увеличению радиальных размеров клеток, начало отложения веществ вторичных стенок – по появлению окаймления пор, что характерно для начала отложения вторичной стенки трахеид (Murmanis, Sachs, 1969).

Полученный материал по мере отбора погружали в этанол (конечная концентрация спирта была не более 80%), взвешивали и хранили в холодильнике до анализа. Вес полученных образцов определяли с учетом веса 96% спирта, использованного для фиксации. Одновременно отбирали навески ткани на мацерацию и для определения влажности ткани. Мацерацию тканей проводили по методикам, примененным в работе (Москалева, 1958; Одинцов и др., 1967). Число клеток в мацерате подсчитывали с помощью камеры Фукса-Розенталя.

Анализ материала

Суспензию, полученную при фиксации материала, фильтровали, твердые остатки растирали в ступке с жидким азотом и экстрагировали 80% водным этанолом при комнатной температуре с периодическим помешиванием и сменой растворителя через 12 часов до отрицательной реакции на углеводы (Dubois et al., 1956). Фильтрат и экстракт объединяли и общий объем раствора замеряли.

Аликвоту раствора (20–50 мл, в зависимости от веса исходного материала) выпаривали до сухого состояния, сухие вещества обрабатывали водой и хлороформом. Водный слой после хлороформа использовали для определения углеводов, урсонных кислот, аскорбиновой и дегидроаскорбиновой кислот и общего содержания фенолов. Такой комплексный подход дает возможность сравнивать динамику исходных метаболитов и фенольных соединений, а также определять функциональные зависимости между ними.

Аликвоту водного раствора после добавления соляной кислоты до pH 2.5–3 трижды обрабатывали эфиром. Объединенные эфирные вытяжки выпаривали на воздухе досуха, остаток растворяли в 3 мл ацетона и в растворе определяли свободные ФК.

Водный слой после отделения эфира использовали для определения связанных форм ФК. Сложные эфиры определяли после щелочного гидролиза. Сложноэфирные связи устойчивы к воздействию кислот, но легко разрушаются щелочью даже при комнатной температуре (Enoki et al., 1983). К аликвоте водного слоя добавляли равный объем 4н гидроксида натрия. Раствор выдерживали при комнатной в температуре в течение 2 часов, после чего осторожно добавляли 18% HCl до pH 2.0–2.5. Подкисленный раствор обрабатывали трехкратно эфиром, объем водного слоя измеряли, а эфирный слой выпаривали на воздухе. Сухой остаток растворяли в 3 мл ацетона и раствор использовали для определения сложных эфиров ФК.

После отделения эфирной вытяжки к водному слою добавляли 18% HCl до конечной концентрации 2 н, и раствор выдерживали при температуре 100°C в течение 1 часа. К гидролизату осторожно добавляли 4 н NaOH до pH 2.0–2.5 и затем три раза

обрабатывали эфиром. Эфирные вытяжки выпаривали на воздухе. Сухой остаток растворяли в 3 мл ацетона и в аликвоте определяли содержание простых эфиров ФК.

Содержание свободных и сложных форм ФК определяли с реактивом Фолин-Дениса по способу, позволяющему определять фенолы в присутствии белка (Jennings, 1981). Оптическую плотность измеряли при $\lambda = 760$ нм, используя кювету с толщиной слоя 1 см. Калибровка проводилась по тирозину (0–100 мкг/мл).

Определение состава ФК

Аликвоту ацетоновых вытяжек высушивали, сухой остаток растворяли в 0.1 мл ацетона. Состав свободных и связанных ФК анализировали методом ТСХ, используя в качестве носителя пластинки “Silufol UV-254”. После нанесения пятен (объем пятен от 0.01–0.02 мл) пластинки обрабатывали паром, подсушивали на воздухе и помещали в камеру со смесью бензол–уксусная кислота (9 : 1). Кислоты идентифицировали по Rf метчиков и УФ-спектрам индивидуальных пятен. Коричную и бензойную кислоты после удаления с подложки экстрагировали 3 мл этанола. Затем хроматограммы опрыскивали смесью 0.5% раствора п-нитроанилина в 2 н HCl, 5% NaNO₃ и 20% ацетата натрия в воде (5 : 5 : 20, по объему). Пятна кислот соскребали и экстрагировали 3 мл этанола. Поглощение раствора определяли при длине волны, наиболее характерной для каждой кислоты. Содержание кислоты рассчитывали по уравнению, найденному по калибровочной кривой, построенной для соответствующего метчика после хроматографирования его в указанных выше условиях.

Все операции, начиная с обработки спиртовых экстрактов, проводили в двукратной повторности, аналитическое определение веществ – не менее чем в трехкратной повторности. Все результаты анализов рассчитывали на сухую массу ткани и на клетку. Статистическую обработку результатов проводили по методу параметрического сравнения средних. На рисунках в барах показана относительная величина погрешности.

Определение состава кислот проводили в 5–7 кратной повторности при постоянном соблюдении объемов растворов. На рисунках содержание выражено как мол/мл.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Содержание спирторастворимых фенольных соединений (ФС) на этапах развития трахеид в формирующемся слое ксилемы в начале июня, рассчитанное на сухой вес и на клетку, представлено на рис. 1. Как показывают данные, изменение содержания ФС по этапам развития зависит от метода расчета данных. Так минимальное содержание ФС

отмечается на втором этапе роста растяжением при расчете на сухую навеску и в камбиальной зоне при расчете на клетку. С переходом ксилемных производных камбия к росту растяжением содержание ФК в клетках возрастает более чем в три раза, но уже во второй фазе роста значительно снижается. С началом образования вторичной клеточной стенки их количество снова увеличивается.

Уровень свободных ФК тоже связан со стадией развития клеток, и его изменение подобно изменению ФС (рис. 2). Но в зоне камбия содержание свободных ФК при обоих методах расчета было наименьшим по сравнению с другими этапами развития клеток, а в D1 их уровень оказался наиболее высоким. В фазу роста содержание свободных форм ФК снижается от первой стадии ко второй.

Содержание простых и сложных эфиров ФК тоже изменяется по этапам развития (рис. 3). При этом простых эфиров ФК в клетках было в два-пять (от Кам к D1) раз больше, чем сложных. В то же время общие тенденции варьирования ФК с двумя типами связи сохраняются. После зоны камбия количество эфиров ФК с кислотолабильными и, в меньшей степени, щелочелабильными связями в первой фазе роста растяжением увеличивается, а во второй – уменьшается. В начале утолщения вторичной стенки перед лигнификацией содержание простых эфиров кислот резко повышается.

Индивидуальный состав свободных и связанных ФК тоже изменяется по стадиям роста ранних трахеид (рис. 4). Из свободных оксикоричных кислот п-кумаровая кислота обнаруживалась только в Кам, тогда как кофейная, феруловая и синаповая кислоты помимо Кам присутствовали на всех этапах развития клеток (рис. 4а). В начале роста их содержание увеличивалось, но далее изменялось дифференцированно. Уровень кофейной кислоты, которая является предшественником феруловой, был примерно постоянным в ходе роста и повышался в D1. Пул феруловой увеличивался после Кам вдвое, повышался в Рост2 и незначительно в D1. Пул синаповой на первой ступени роста возрастал по сравнению с Кам в 2.5 раза, практически не менялся на втором этапе и почти в два раза повышался перед лигнификацией. Очевидно, что активность гидроксилаз и метил-трансфераз, участвующих в гидроксилировании и метилировании оксикоричных кислот (Witten, Sideroff, 1995), тоже дифференцированно меняется в процессе роста клеток и в начале отложения их вторичных стенок.

На хроматограммах было отмечено также пятно кислоты, располагавшееся рядом с феруловой, дающее голубое свечение в УФ свете и красно-коричневое окрашивание с п-нитроанилином. УФ спектр кислоты был аналогичен спектру феруловой, что позволило отнести его к цис-форме этой кислоты. Ее присутствие было отмечено в Кам и в D1, однако полная идентификация не была проведена.

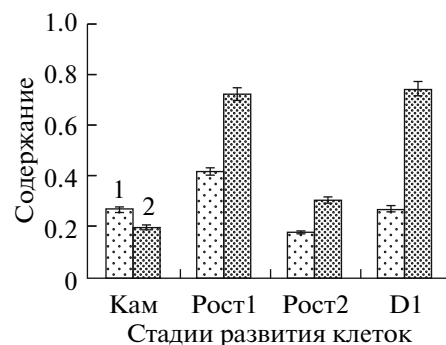


Рис. 1. Содержание ФС в клетках камбиальной зоны (Кам), двух этапов зоны роста растяжением (Рост1 и Рост2) и начального этапа развития вторичной стенки (D1) при формировании годичного прироста в стволе сосны обыкновенной в начале июня: 1 – % сух. массы; 2 – мг × 10⁻⁶ на клетку.

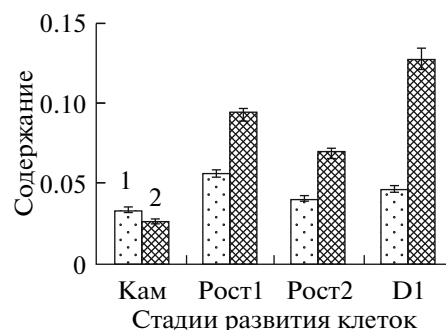


Рис. 2. Содержание свободных ФК в клетках камбиальной зоны (Кам), двух этапов зоны роста растяжением (Рост1 и Рост2) и начального этапа развития вторичной стенки (D1) при формировании годичного прироста в стволе сосны обыкновенной в начале июня: 1 – % сух. массы; 2 – мг × 10⁻⁶ на клетку.

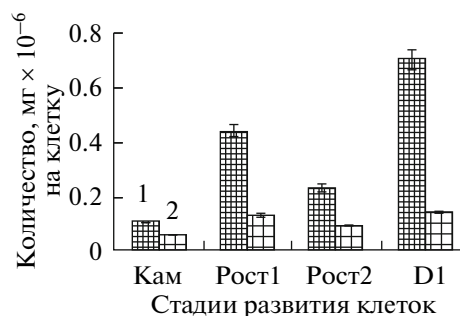


Рис. 3. Изменение количества простых (1) и сложных (2) эфиров ФК на стадиях дифференциации ранних трахеид при формировании годичного прироста в стволе сосны обыкновенной в начале июня. Обозначения стадий развития как на рис. 1.

Коричная кислота, как предшественник оксикоричных кислот, в свободной форме в Кам отсутствовала, от Рост1 до Рост2 увеличивалась в 2 раза и снижалась незначительно в D1. Из бензойных кис-

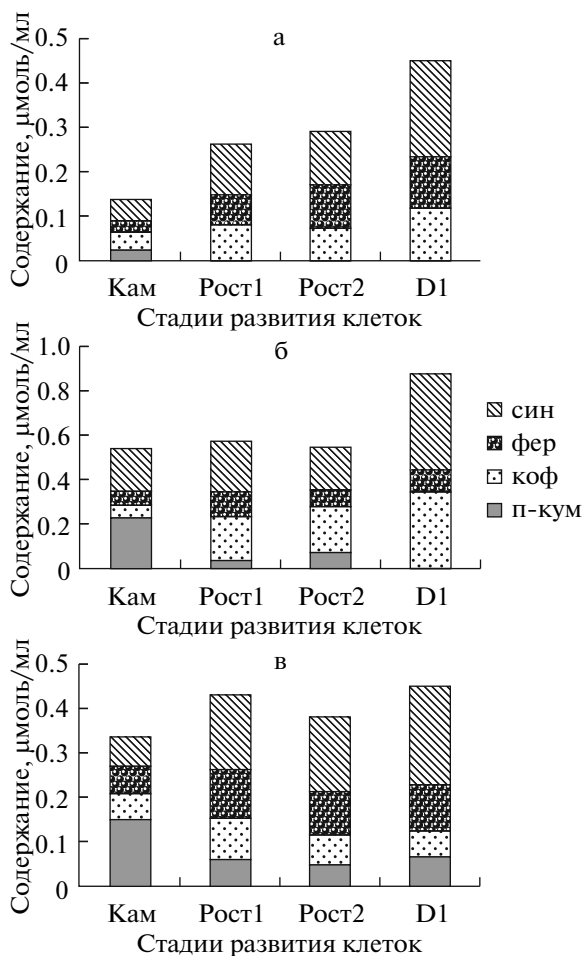


Рис. 4. Изменение содержания и состава свободных (а), простых (б) и сложных (в) эфиров оксикоричных кислот (син – синаповая, фер – феруловая, коф – кофейная, п-кум – п-кумаровая) по стадиям дифференциации ранних трахеид при формировании годичного прироста в стволе сосны обыкновенной в начале июня. Обозначения стадий развития как на рис. 1.

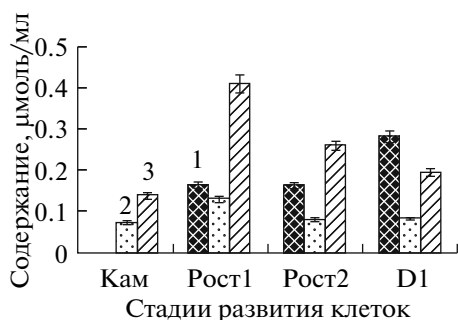


Рис. 5. Изменение содержания свободной бензойной кислоты (1) и ее гликозидов (2) и сложных эфиров (3) в клетках ксилемы по стадиям дифференциации ранних трахеид при формировании годичного прироста в стволе сосны обыкновенной в начале июня. Обозначения стадий развития как на рис. 1.

лот в свободной форме в Рост1 присутствовали п-оксибензойная (следовые количества) и бензойная. Количество последней в зоне роста было постоянным, но увеличивалось в D1 в более чем в два раза по сравнению с Рост2 (рис. 5). Между коричневой и бензойной кислотами располагались три пятна, дающие голубое свечение в УФ и ярко-малиновые или сине-фиолетовые пятна с п-нитроанилином в 2н HCl. По поведению в нейтральной и кислой средах эти соединения были условно отнесены к антоцианинам, ацилированным оксикоричными кислотами.

Состав связанных оксикоричных кислот и соотношение форм тоже менялись в ходе развития клеток (рис. 4б, в). Агликонами в простых эфирах (гликозидах) в Кам были в уменьшающемся порядке синаповая, п-кумаровая, феруловая и кофейная кислоты (рис. 4б). На первом этапе роста по сравнению с Кам пул гликозидов, содержащих п-кумаровую кислоту, падал более чем в шесть раз, повышаясь, однако, на второй ступени роста. Гликозиды кофейной кислоты, увеличиваясь после Кам, оставались на одном уровне в период роста клеток и снова повышались к D1. Пул гликозилированных производных феруловой вдвое повышался в Рост1, снижался в Рост2, увеличиваясь затем в D1. Если рассматривать пятно выше феруловой как изо-феруловую кислоту, можно отметить, что ее содержание, увеличиваясь от Кам к Рост1, снижается незначительно в Рост2 и снова повышается в D1. Но в D1 феруловой, даже с учетом изо-формы феруловой, было в два раза меньше, чем синаповой. Простые эфиры с синаповой кислотой, слегка увеличиваясь после Кам, в период роста были практически на одном уровне и резко возрастали перед лигнификацией. В Рост2 и D1 присутствовали также эфиры коричневой и ванилиновой кислоты.

В составе сложных (щелочеллабильных) эфиров в Кам основным агликоном тоже была п-кумаровая кислота. Ее пул уменьшался в процессе роста, тогда как пул эфиров, в составе которых входили кофейная и феруловая кислоты, повышался на первой стадии (рис. 4в) и падал на второй. К D1 пул кофейной кислоты практически не изменялся, в то время как для п-кумаровой и феруловой наблюдалась тенденция к увеличению. Пул эфиров с синаповой кислотой в период роста был самым значительным и особенно возрастал в D1. Кроме того, в Рост2 и D1 появлялась изо-феруловая кислота. На всех стадиях развития в составе сложных эфиров обнаруживалась коричневая кислота – предшественник п-кумаровой. Сиреневая, как результат β-окисления синаповой, наблюдалась только в камбии.

Бензойная кислота в свободной форме, как упоминалось выше, отсутствовала в Кам и в основном входила в состав сложных эфиров, уровень которых уменьшался от Рост1 к D1 (рис. 5).

ОБСУЖДЕНИЕ

Данные показывают изменение содержания и состава фракций спирторастворимых ФК по этапам дифференциации клеток ксилемы сосны.

Изменения в составе фракций ФК при развитии первичной стенки трахеид можно сопоставить с динамикой роста клеток в зоне. Как было установлено, рост первичных стенок трахеид сосны обыкновенной наиболее интенсивно происходит на первых этапах, а затем скорость роста снижается (Антонова, Шебеко, 1985; Антонова, 1999). Такая динамика соответствует варьированию общих ФС (рис. 1), свободных и связанных форм ФК в зоне (рис. 2, 3). Относительное содержание свободных ФК в составе ФС клеток камбиальной зоны и первой фазы роста составляло 12.5 и 12.8% соответственно. Это означает, что пул свободных ФК в начале развития трахеид поддерживается на определенном уровне, поскольку свободные ФК являются потенциальными ядами для клетки. Хотя во второй фазе роста абсолютное количество свободных ФК уменьшается, их содержание в составе ФС увеличивается до 22.5%, т.е. идет относительное накопление фракции свободных ФК. В то же время на фоне снижения общего количества свободных форм ФК в Рост2 (рис. 2) суммарное содержание оксикоричных кислот в них возрастает, что, по-видимому, вызвано изменением соотношения оксикоричных и бензойных кислот. Так отношение суммы оксикоричных кислот и бензойной кислоты в начале роста составляет 2.9, а во второй фазе роста уже 3.4. Очевидно, что в ходе роста растяжением трахеид в составе ФС начинает превалировать свободные ФК, а в их составе – оксикоричные кислоты.

Со снижением интенсивности роста сопряжено не только падение общего содержания свободных ФК. Одновременно падает уровень их простых и сложных эфиров (рис. 3). Изменения на втором этапе роста свободных и связанных форм, которые служат транспортными формами ФК в апопласт, указывает, с одной стороны, на использование связанных форм в процессе формирования структуры первичных стенок, с другой – на торможение синтеза их эфиров. Об этом дополнительно свидетельствует увеличение свободных оксикоричных кислот за счет феруловой и синаповой во второй фазе роста (рис. 4а).

Пул простых эфиров, доминирующих в связанных ФК, повышался от Кам к Рост1 на 75.5%, а пул сложных эфиров – на 56%. В Рост2 количество простых и сложных эфиров уменьшалось неравномерно. Пул простых снизился на 47%, а сложных – только на 26%. Это означает, что при создании структуры первичных стенок в основном используются ФК, входящие в состав простых эфиров. В свою очередь, это свидетельствует о преимущественном, в сравнении с эстеразами, постепенном

увеличении активности гидролаз во второй фазе роста.

Вторичное утолщение является следующей стадией дифференциации трахеид, а ее начало, когда лигнификация еще не началась, – важным подготовительным этапом к этому процессу. В D1 увеличивается содержание свободных и связанных форм ФК. Пул простых эфиров после Рост2 увеличивался в 1.7 раз, тогда как сложных эфиров – в 1.4 раза. Несмотря на колебание содержания фракций ФК, отношение кислотолабильных форм к щелочелабильным постепенно увеличивается от Кам к D1 с 0.55 до 0.2, свидетельствуя о преимущественном образовании простых эфиров перед лигнификацией. Очевидно, что изменения разных фракций ФК в зоне роста растяжением связаны с динамикой роста первичных стенок трахеид, а в начале вторичного утолщения – с подготовкой к процессу лигнификации. Таким образом, клетка регулирует образование гликозидов и сложных эфиров кислот и их использование.

Не рассматривая детально метаболизацию всех оксикоричных кислот, следует рассмотреть изменчивость феруловой и синаповой кислот, учитывая ингибирующее действие первой на рост, а также ее роль в связывании полисахаридов клеточной стенки (Fry, 1986; Waldron et al., 1997) и в биосинтезе гваяцилпропановых единиц лигнина хвойных.

Синаповая кислота в свободной форме была основной из этих двух кислот от Кам и до D1, что указывает на активные процессы гидроксилирования феруловой кислоты и последующего метилирования ее производного, особенно в начале вторичного утолщения. Это совпадает с более низким уровнем феруловой кислоты по сравнению с синаповой. Практически постоянный уровень синаповой в первой и второй фазах роста и повышение уровня феруловой кислоты, начиная со второго этапа роста растяжением, может быть следствием снижения активности гидроксилаз и 5-метил-трансферазы. Перед лигнификацией разница между уровнями кислот особенно усиливается, даже если учесть присутствие изо-феруловой кислоты.

Снижение пулов простых и сложных эфиров феруловой кислоты может быть результатом использования их, после расщепления гидролазами и эстеразами в апопласте, для сшивания гемицеллюлоз клеточной стенки. Как было показано ранее, в первый период роста клеток сосны уровень АК выше, чем во втором (Антонова и др., 2009), т.е. в начале превалируют процессы синтеза и восстановления АК, тогда как во второй фазе роста преобладают окислительные процессы. Это согласуется с положением, что высокое содержание АК тормозит процессы сшивки гемицеллюлоз через диферуловые мостики (Fry, 1993; Waldron et al., 1997), и соответствует повышенному содержанию гликозидов и сложных эфиров феруловой кислоты на первом

этапе роста. Снижение пула АК и отношения АК/ДАК на втором этапе совпадает с падением уровня как гликозидов, так и сложных эфиров феруловой кислоты, что в свою очередь может указывать на расходование ее для создания связей между компонентами первичных стенок.

Согласно Хореману и др. (Horemans et al., 2000) концентрация АК в апопласте по сравнению с симпластом низкая. Но нужно учесть, что пул АК может пополняться прямо в апопласте за счет восстановления монодегидроаскорбатредуктазой монодегидроаскорбиновой кислоты, продукта первой ступени окисления АК (Hossain et al., 1984). Этот фермент был обнаружен в апопласте ячменя и листьях овса (Vanacker et al., 1998). Возможность регенерации аскорбата в апопласте сообщалась (Castillo, Greppin, 1988; Luwe, 1996). Можно предположить, что клетка сама способна регулировать содержание АК на оптимальном уровне с учетом изменения метаболизма, поступления субстратов и активности ферментов на стадиях дифференциации.

Существенное повышение свободных и связанных форм ФК, а в их составе оксикоричных кислот, и главным образом синаповой, с началом вторичного утолщения ясно указывает на преимущественный синтез в симпласте потенциальных предшественников лигнина.

Хотя основными структурными единицами лигнина хвойных являются гваяцилпропановые – производные феруловой кислоты, в нем присутствуют также сирингильные структуры – производные синаповой. По нашим данным лигнин первых стадий лигнификации ранних трахеид сосны, выделенный из того же слоя трахеид, содержит больше сирингильных фенилпропановых единиц, чем лигнин зрелой ранней ксилемы (Антонова и др., 2009), в которой, напротив, больше производных феруловой кислоты. При этом скорость отложения лигнина в ранней ксилеме сосны оказалась особенно низкой на первых стадиях процесса, что может быть вызвано низкой реакционной способностью синаповой кислоты, как предшественника монолигнолов сирингильного типа. Таким образом, наблюдается постепенное изменение направленности окислительных и конденсационных процессов, связанных с особенностями строения предшественников лигнина и их биосинтеза.

Очень большое значение перед лигнификацией может иметь высокий уровень свободной бензойной кислоты. Глас и Данлоп (Glass, Dunlop, 1974), исследуя действия ФК на мембраны, нашли, что феруловая кислота и, особенно, бензойная, деполаризуют мембраны, что влияет на их проницаемость и может благоприятствовать транспорту метаболитов. По нашим данным пул бензойной кислоты почти в два раза увеличивается при переходе клеток к вторичному утолщению. Повышение, очевидно, идет в основном за счет снижения уровня сложных

эфиров (рис. 5). Увеличение свободных бензойной и феруловой кислот в начале вторичного утолщения перед лигнификацией должно обеспечить выход эфиров оксикоричных кислот в апопласт. Кроме того, может усилиться транспорт АК, а это, в свою очередь, будет влиять на лигнификацию, так как перекись водорода будет расходоваться на окисление аскорбата. О возможном влиянии некоторых факторов на транспорт аскорбата указывалось в работе (Fry, 1998).

Появление бензойной кислоты в свободной форме в росте растяжением обусловлено в большей степени β -окислением коричной кислоты, а в начале вторичного утолщения расщеплением ее сложных эфиров. Ванилиновая кислота, отмеченная в составе гликозидов на второй ступени роста и начале утолщения стенок, тоже связана с β -окислением феруловой кислоты через ее КоА-эфиры (Запрометов, 1993), хотя может существовать и другой, неокислительный, механизм образования ванилиновой кислоты (French et al., 1976).

Увеличение уровня кофейной кислоты в свободной и связанной формах и одновременное снижение пула п-кумаровой кислоты становится понятным, если учесть повышенный уровень АК на первом этапе роста. Гидроксилирование п-оксикоричной кислоты осуществляется фенолоксидазой в присутствии аскорбиновой кислоты (Запрометов, 1993).

Таким образом, содержание ФК, соотношение их фракций и состав значительно меняются от камбиальной зоны до начала вторичного утолщения трахеид сосны и характер варьирования зависит от метода расчета (на сухой вес или на клетку). В расчете на клетку количество свободных и связанных ФК, а в их составе сложных и, особенно, простых эфиров, увеличивалось на первом этапе роста растяжением, снижалось на втором и вновь возрастало в начале отложения вторичной стенки. Пул связанных кислот в зависимости от стадии развития клеток превышал пул свободных в 2–5 раз. В составе свободных оксикоричных кислот доминировали синаповая и феруловая кислоты. В простых и сложных эфирах состав и содержание оксикоричных кислот тоже зависели от этапа развития клеток. В простых эфирах основными агликонами в камбии были синаповая и п-кумаровая, на других стадиях развития – синаповая и кофейная. Сложные эфиры камбия включали в основном п-кумаровую кислоту, а других этапов – синаповую и феруловую кислоты. На первых этапах роста бензойная кислота была связана в основном сложноэфирными связями. Пул этих эфиров уменьшался от первой фазы роста к началу утолщения стенок. Соответственно повышался уровень свободной бензойной кислоты.

Работа выполнена в рамках проекта, поддержанного Российским Фондом Фундаментальных Исследований (грант № 06-04-49501).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Антонова Г.Ф. Рост клеток хвойных. Новосибирск: Наука, 1999. 232. 19 с.
- Антонова Г.Ф., Баженов А.В., Вараксина Т.Н., Железниченко Т.В. Отложение лигнина на стадиях развития трахеид ранней и поздней древесины в стволах сосны обыкновенной // Материалы IV Всероссийской научной конференции “Новые достижения в химии и химической технологии растительного сырья”, Барнаул. 2009. Изд. Алтайского гос. ун-та. Барнаул. 2009. Кн. 1. С. 78–79.
- 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. Формирование ксилемы хвойных. 3. Динамика развития трахеид в зонах дифференциации // Лесоведение. 1985. № 5. С. 71–74.
- Антонова Г.Ф., Шебеко В.В. Использование крезилового прочного фиолетового при изучении образования древесины // Химия древесины. 1981. № 4. С. 102–105.
- Ванюшин Б.Ф., Александрушкина Н.И., Замятина В.А. Фенольные соединения в системе регуляции апоптоза, клеточной дифференцировки, роста и развития растений // Сб. тез. VI Симп. по фенольным соединениям. М., 2004. С. 17–18.
- Дубравина Г.А., Зайцева С.М., Загоскина Н.В. Изменения в образовании и локализации фенольных соединений при дифференциации тканей тиса ягдолого 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., Запроматов М.Н. Культура ткани чайного растения: дифференциация, уровень плоидности, образование фенольных соединений // Физиология растений. 1994. Т. 41. № 5. С. 762–767.
- Запроматов М.Н. Фенольные соединения: распространение, метаболизм и функции в растениях. М.: Наука, 1993. 272 с.
- Москалева В.Е. О формировании трахеид сосны // Тр. Ин-та леса АН СССР. 1958. Т. 37. С. 254–265.
- Одинцов П.П., Каткевич Р.Г., Пендере М.К., Каткевич Ю.Ю. Уроновые кислоты в молодых побегах ели // Изв. АН ЛатвССР. Сер. хим. 1967. № 3. С. 632–639.
- 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.
- Castillo F.J., Greppin H. Extracellular ascorbic acid and enzyme activities related to ascorbic acid metabolism in *Sedum album* L. leaves after ozone exposure // Environ. Exp. Bot. 1998. V. 28. P. 231–238.
- Córdoba-Pedregosa Md.C., Córdoba F., Villalba J.M., González-Reyes J.A. Zonal changes in ascorbate and hydrogen peroxide contents, peroxidase, and ascorbate-related enzyme activities in onion roots // Plant Physiol. 2003. V. 131. P. 697–706.
- 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.
- Enoki A., Yaki F., Koshijima T. Synthesis of LCC Model compounds and their chemical and enzymatic stabilities // Holzforschung. 1983. 37. P. 135–141.
- 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.
- French C.J., Vance C.P., Towers G.H.N. Conversion of p-coumaric acid to p-hydroxybenzoic acid by cell free extracts of potato tubers and *Polyporus hispidus* // Phytochemistry. 1976. V.15. № 4. P. 564–566.
- 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. Oxidative scission of plant cell wall polysaccharides by ascorbate-induced hydroxyl radicals // Biochem. J. 1998. V. 50. P. 931–937.
- Fry S.C. Oxidative coupling of tyrosine and ferulic acid Residues, intra- and extra-protoplasmic occurrence, predominance of trimers and larger products, and possible role in inter-polymeric cross-linking // Phytochemistry. 2004. Reviews.V. 3. P. 97–111.
- 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.
- Horemans N., Foyer C.H., Potters G., Asard H. Ascorbate function and associated transport systems in plants // Plant Physiol. Biochem. 2000. V. 38. P. 531–540.
- Hossain M.A., Nakano K., Asada K. Monodehydroascorbate reductase in spinach chloroplasts and its participation in regeneration of ascorbate for scavenging hydrogen peroxide // Plant Cell Physiol. 1984. V. 25. P. 385–395.
- 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.
- Kutsuki Y., Shimada M., Higuchi T. Distribution and roles of p-hydroxycinnamate CoA ligase in lignin biosynthesis // Phytochemistry/ 1982. V. 21. P. 267–271.
- Lam N.B.T., Iiyama R., Stone B.A. Distribution of free and combined phenolic acids in wheat internodes // Phytochemistry. 1990.V. 29. P. 429– 433.
- Lozovaya V.V., Gorshkova T.A., Yablokova E.V., Rumyantseva 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.

- Ros-Barceló A., Gómez-Ros L.V., Ferrer M.A., Hernández J.A. The apoplastic antioxidant enzymic system in the wood-forming tissues of trees // *Trees*. 2006. V. 20. P. 145–156.
- Sánchez M., Quejjeiro E., Revilla G., Zarra I. Changes in ascorbic acid levels in apoplastic fluid during growth of pine hypocotyls: effect on peroxidase activity associated with cell walls // *Physiol. Plant*. 1997. V. 101. P. 815–820.
- 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.
- 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. Changes induced by abscisic acid and light in the redox state of ascorbate in the apoplast of epicotyls of *Vigna angularis* // *Plant Cell Physiol*. 1994. V. 35. P. 975–978.
- Takahama U., Oniki T. A peroxidase/phenolics/ascorbate system can scavenge hydrogen peroxide in plant cells // *Physiol. Plant*. 1997. V. 101. P. 845–852.
- 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.
- Vanaker H., Harbinson J., Ruisch J., Carver W., Foyer C.H. Antioxidant defences of the apoplast // *Protoplasma*. 1998. V. 205. P. 129–140.
- 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.
- 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.
- Whetten R., Sedoroff R. Lignin biosynthesis // *Plant Cell*. 1995. V. 7. P. 1001–1013.
- Widholm J.M. Cold alkali can extract phenolic acids that are ether linked to cell wall components in dicotyledonous plants (buckwheat, soybean and flax) // *Phytochemistry*. 1999. V. 50. Issue 3. P. 395–400.
- Wodzicki T.J., Brown C.L. Organization and breakdown of the protoplast during maturation of pine tracheids // *Amer. J. Bot*. 1973. V. 60. P. 631–640.
- Zarra, Sánchez I.M., Quejjeiro 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.

The Changes in Contents and Composition of Phenolic Acids during Cell Xylem Growth in Scots Pine

G. F. Antonova, T. V. Zheleznichenko, V. V. Stasova

Sukachev Institute of Forest, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Akademgorodok, Krasnoyarsk, 660036 Russia
e-mail: institute_forest@ksc.krasn.ru

Abstract—The contents and composition of alcohol soluble phenolic acids were studied during cell xylem growth in the course of wood annual increment formation in the stems of Scots pine. The cells of cambium zone, of two stages of expansion growth and the outset of secondary thickening zone (before lignification) were successively gathered from the stem segments of 25-old pine trees in the period of earlywood xylem formation with constant anatomical and histochemical control. The contents of free and bound forms of phenolic acids, isolated by 80% ethanol from tissues, as well as of their ethers and esters were calculated both per dry weight and per cell. The content and relation of the fractions and the composition of phenolic acid have been found to change significantly from cambium zone to the outset of tracheid secondary thickening. The character of the variations depends on a calculation method. According to the calculation per cell the amount of free and bound phenolic acids and in their composition of esters and especially ethers increased at the first step of expansion growth zone, decreased at the second one and rose again in the outset of secondary wall deposition. In dependence on the stage of cell development the pool of bound phenolic acids exceeded of free acid pool in 2–5 times. Sinapic and ferulic acids dominated in the composition of free hydroxycinnamic acids. The content and composition of hydroxycinnamic acids in ethers and esters depended on cell development phase. In cambium p-coumaric and sinapic acids were principal aglycons in ethers, at other stages these were sinapic and caffeic acids. The esters in cambium zone included essentially p-coumaric acid and at the other stages — sinapic and ferulic acids. At the first phase of growth benzoic acid was connected principally by ester bonds. The pool of these esters decreased from the first phase of growth to the outset of cell wall thickening and in proportion to this the level of free benzoic acid rose.

Keywords: phenolic acids, fractions, composition, cambium zone, extension growth, secondary thickening, early wood xylem, *Pinus sylvestris*