

УДК 582.475, 543.421, 54.061

ХАРАКТЕРИСТИКА РЕДОКС-СОСТОЯНИЯ ЛИГНОУГЛЕВОДНОЙ МАТРИЦЫ ДРЕВЕСИНЫ НА НАЧАЛЬНЫХ ЭТАПАХ РАЗВИТИЯ НА ПРИМЕРЕ СОСНЫ ОБЫКНОВЕННОЙ

© *М.А. Гусакова¹, К.Г. Боголицын^{1,2}, А.А. Красикова^{1*}, Н.В. Селиванова¹, С.С. Хвиюзов¹*

¹ *Федеральный исследовательский центр комплексного изучения Арктики им. академика Н.П. Лаверова УрО РАН, наб. Северной Двины, 23, Архангельск, 163069 (Россия), e-mail: ann.krasikova@gmail.com*

² *Северный (Арктический) федеральный университет им. М.В. Ломоносова, наб. Северной Двины, 17, Архангельск, 163002 (Россия)*

Проведенные исследования формирования биомассы сосны обыкновенной на начальных этапах развития позволили подтвердить определяющую роль редокс-превращений монолигнолов в процессе лигнификации растительной матрицы. С применением методов производной и дифференциальной УФ-спектроскопии изучено изменение состава фенольной фракции (сопряженных и несопряженных фенольных структур) фенол-хиноидной окислительно-восстановительной системы клеточной стенки. Показано, что процессы накопления низкомолекулярных фенольных соединений – предшественников лигнина в начальный период онтогенеза происходят преимущественно в «хвое» растений. Экспериментально подтверждено, что в момент выноса семян на площадку закаливания происходит адаптация растения к существующему температурному режиму, характеризующаяся снижением содержания низкомолекулярных фенольных соединений, препятствующих развитию окислительных процессов при воздействии условий окружающей среды. При действии низких температур в зимний период растение оказывается под воздействием окислительного стресса, в условиях которого происходит активация ферментативной (активность пероксидазы) системы защиты растения. Показано изменение содержания кониферилового спирта как маркера процесса лигнификации. Продемонстрирована корреляция изменения пероксидазной активности с общим содержанием фенольных соединений и конифериловым спиртом. Методом ИК-спектроскопии показано изменение соотношения углеводной и лигнинной составляющих на начальных этапах развития семян сосны обыкновенной.

Ключевые слова: редокс-процессы, клеточная стенка, сосна обыкновенная, фенольные соединения, ферментативная активность.

Введение

Гусакова Мария Аркадьевна – кандидат технических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории химии растительных биополимеров, e-mail: mariya_gusakova@mail.ru

Боголицын Константин Григорьевич – доктор химических наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории химии растительных биополимеров, e-mail: k.bogolitsin@narfu.ru

Красикова Анна Алексеевна – кандидат химических наук, научный сотрудник лаборатории химии растительных биополимеров, e-mail: ann.krasikova@gmail.com

Селиванова Наталия Владимировна – кандидат химических наук, старший научный сотрудник лаборатории химии растительных биополимеров, e-mail: snatalia-arh@yandex.ru

Хвиюзов Сергей Сергеевич – кандидат химических наук, старший научный сотрудник лаборатории химии растительных биополимеров, e-mail: khviuzov.s@yandex.ru

Согласно современным представлениям, основу древесного вещества составляют полисахаридные (целлюлоза, гемицеллюлозы и пектиновые вещества), а также ароматические (лигнин) компоненты [1]. Образование макромолекул лигнина в растении (лигнификация) представляет собой систему сложных биохимических и химических процессов. Механизм их реализации до конца не изучен и является частью общих биологических процессов дифференциации и функционирования растительных клеток, а также ответной реакцией клеток на различные биологические и абиотические стрессы [2].

Согласно установленной последовательности биосинтеза лигнина [1], мономеры лигнина (кони-

* Автор, с которым следует вести переписку.

ферильный спирт, синаповый спирт, *n*-кумаровый спирт) синтезируются в цитоплазме и высвобождаются в клеточную стенку как монолигнолы или монолигнол-глюкозиды. Дальнейшее образование полимерных молекул лигнина из мономерных предшественников протекает через стадию дегидрогенизационной полимеризации *n*-гидроксикоричных спиртов [1] с участием лакказы и пероксидазы с появлением резонансно стабилизированных феноксильных радикалов и их сочетания с получением димерных структур (дилигнолов) [3], олиголигнолов, а в конечном итоге – полилигнолов (лигнина) [4]. В процессе полимеризации монолигнолы, секретлируемые одревесневающими клетками, окисляются активными окислительными системами, локализованными в клеточной стенке в свободном или связанном состоянии, такими как лакказа/O₂ и/или пероксидаза/H₂O₂, с последующей радикализацией, приводящей к образованию лигнина [5].

Ферменты, включающие в себя различные типы пероксидаз, оксидаз и лакказы, участвуют в полимеризации монолигнолов как *in vivo*, так и *in vitro* [6] и занимают особое место в механизме биосинтеза лигнина, однако точная их роль – все еще спорный вопрос. Различная роль лакказы и пероксидазы в механизмах действия отмечена в целом ряде исследований. Так, авторы [7] пришли к выводу, что лакказы катализируют димеризацию монолигнолов на ранней стадии лигнификации с образованием олиголигнолов, а пероксидазы, в свою очередь, катализируют полимеризацию олиголигнолов. Основной продукт активности пероксидаз – феноксильные радикалы, вступающие в реакции димеризации и олигомеризации с образованием лигнина [8].

Таким образом, клеточная стенка представляет собой многокомпонентную редокс-систему [8]. Взаимодействующие окислители и восстановители вступают в ферментативные реакции, катализируемые различными ферментами, а также подвержены многочисленным неферментативным превращениям, например, с участием активных форм кислорода (АФК). Редокс-баланс поддерживается благодаря постоянному притоку восстановителей из внутриклеточных источников [8].

Образование фенол-хиноидной окислительно-восстановительной системы фенольных структур приводит также и к термодинамической неравновесности в древесной матрице, термодинамической несовместимости лигнина и целлюлозы и, как результат, гетерогенности древесного вещества. Особенности полифункциональной природы лигнинных полимеров, наличие в макромолекуле реакционных центров с различными донорно-акцепторными свойствами, полимолекулярной ароматической структуры, системы сопряжений в макромолекулах обуславливают физико-химические свойства лигнина и изменение его редокс-состояния в процессе формирования древесного вещества. Таким образом, присутствие в лигноуглеводной древесной матрице фенольных и хинонных структур, изменение их соотношения в процессе жизнедеятельности растения приводит к изменению редокс-состояния не только лигнинной составляющей древесного вещества, но и растительной ткани как целостной системы. С этих позиций наибольший интерес представляет изучение первичных актов редокс-процессов на начальных стадиях формирования древесного вещества. При этом о редокс-состоянии лигноуглеводной матрицы можно судить как по характеру накопления и расходования в процессе биосинтеза мономерных фенолов и лигнина, так и по ферментативной активности.

В качестве объекта исследования были выбраны однолетние сеянцы сосны обыкновенной *Pinus sylvestris* L., как одной из самых распространенных древесных пород в Российской Федерации. Сосна обыкновенная – хороший модельный объект для проведения различных исследований, поскольку она является типичным представителем хвойных лесов, имеет обширный ареал произрастания и высокий адаптационный потенциал.

Таким образом, целью работы являлось исследование основных закономерностей первичных стадий формирования компонентного состава древесного вещества на примере сеянцев сосны обыкновенной и выявление роли окислительно-восстановительных процессов в биосинтезе лигноуглеводной матрицы.

Экспериментальная часть

Для анализа изменений качественного и количественного состава фракции фенольных соединений использовались образцы сеянцев сосны обыкновенной, выращенные в Устьянском лесном селекционно-семеноводческом центре (УЛССЦ) Архангельской области в 2018–2019 и 2019–2020 гг. с контролируемыми условиями среды [9]. Процесс выращивания сеянцев – посадочного материала с закрытой корневой системой [10] (ПМЗК) в теплицах делится на три основных периода: начальный период (период проращивания), период быстрого роста, период закаливания. Период закаливания начинается после выноса сеянцев

из тепличных условий на площадку закаливания. В 2019 г. применялась измененная технология выращивания: на начальном этапе роста создавался парниковый эффект (28 °С в течение 3–5 дней, с последующим снижением температуры до 22 °С), а также использовался субстрат повышенной влажности (70–75%). Ввиду изменения технологии выращивания, а также колебаний климатических параметров исследования проводились на протяжении двух лет. В УЛССЦ применяют многоротационную технологию выращивания сеянцев (три ротации за вегетационный период), для исследований использовались сеянцы сосны второй ротации (среднелетние сроки посева – первая декада июля). Отборы сеянцев для проведения анализов проводились в разные сезоны на протяжении всего первого года развития, как на стадии роста в парниках (1 декада июля – вторая декада сентября), так и после выноса на площадку закаливания (в осенне-зимний период и по завершении годичного цикла – третья декада июня). Для более детального анализа содержания и состава фракции фенольных соединений нами было принято условное деление каждого сеянца на отдельные части – корень, «стволик» и «хвоя». Исследования проводили для «стволика» и «хвои», поскольку в хвойных растениях биологические процессы наиболее активно протекают именно в хвое, где происходит синтез и основное накопление вторичных метаболитов вообще и фенольных соединений в частности, расходуемых в течение многолетних циклов на построение вегетативной массы растения [11].

Определение общего содержания фенольных соединений в сеянцах сосны проводилось спектрофотометрическим методом Фолина-Дениса [12]. Анализируемые экстракты получали растиранием 0.25 г сырья в 25 мл этилового спирта. 1.0 мл экстракта помещали в пробирку на 10 мл, добавляли дистиллированную воду до 7 мл, перемешивали и вносили 0.5 мл реактива Фолина-Дениса, через 3 мин добавляли 1.0 мл насыщенного раствора Na_2CO_3 и доводили водой до 10 мл. Через 1 ч измеряли оптическую плотность при $\lambda=730$ нм на спектрофотометре UV-1800 (Shimadzu, Япония). Стандартное отклонение полученных результатов не превышает 5%.

Единицы измерения общего содержания фенольных соединений из мг/л переведены в мкг/г $\text{C}_{\text{орг}}$ (удельное содержание на единицу массы органического углерода), что позволило исключить различия влажности. Определение содержания органического углерода проводили методом высокотемпературного каталитического окисления на анализаторе общего органического углерода TOC-LCSN (Shimadzu, Япония) в образцах, предварительно высушенных лиофильно с использованием установки-модификатора LyovarorL-200 (Buchi, Швейцария).

Редокс-состояние древесной матрицы характеризуется наличием системы сопряженных и несопряженных фенольных форм (рис. 1). В молекулах сопряженных фенолов присутствует карбонильная $\text{C}=\text{O}$ -группа, которая за счет отрицательных (-)I-индуктивного и (-)M-мезомерного эффектов обладает выраженными электроноакцепторными группами, а за счет наличия сопряжения с бензольным кольцом, значительно изменяет реакционные свойства фенольной гидроксильной группы – реакционного центра молекулы [1]. На примере родственных лигнину мономерных фенолов было установлено [1], что соединения с сопряженной с бензольным кольцом карбонильной группой (ванилин, ацетованилон, ванилиновая кислота) характеризуются большим значением окислительного потенциала, т.е. менее выраженными окислительно-восстановительными свойствами по сравнению с несопряженными мономерными фенолами, к которым относятся *n*-гидроксикоричные спирты – основные мономерные предшественники лигнина.

Для анализа функциональной природы фенольных соединений в исследуемых экстрактах использованы методы производной и дифференциальной УФ-спектроскопии. Электронные спектры экстрактов концентрацией 1 г/л записаны на спектрофотометре UV-1800 (Shimadzu, Япония) в диапазоне 220–500 нм, получены УФ-спектры растворов с нейтральным pH, с pH 12 и в 0.2 М NaOH. По данным дифференциальных спектров, полученных вычитанием спектра нейтрального раствора из спектра 0.2 М NaOH, рассчитаны значения приведенной оптической плотности – отношения оптических плотностей в максимумах поглощения 300 и 360 нм к концентрации экстрактов. На дифференциальных спектрах максимум поглощения при 300 нм соответствует несопряженному, а при 360 нм – сопряженному фенольным единицам.

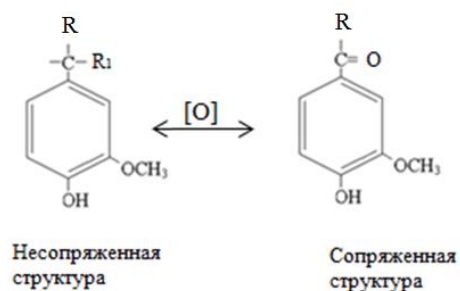


Рис. 1. Сопряженные и несопряженные фенольные структуры

Анализ родственных лигнину мономерных фенолов гваяцильного ряда в спиртовых экстрактах семян выполняли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с использованием системы LC30AD Nexera X2 со спектрофотометрическим детектированием (Shimadzu, Япония). Для разделения применяли обращенно-фазовую колонку Nukleodur Polar Tec, 150×3.0 мм, 3 мкм, (Macherey-Nagel, Германия), элюент – смесь ацетонитрила и высокоочищенной воды I типа с добавкой муравьиной кислоты 0.5%. Разделение проводили в изократическом режиме, скорость потока элюента составляла 0.4 мл/мин, содержание ацетонитрила 20%, температура термостата 40 °С; объем вводимой пробы 5 мкл. Детектирование осуществляли при длине волны 280 нм.

Для анализа активности пероксидазы использовали методику [13]. Навеску растительного материала массой 100–200 мг растирали в фарфоровой ступке с небольшим количеством 0.1 М калий-фосфатного буфера (pH 7.0) и переносили в мерную колбу объемом 10 см³. Раствор выдерживали 20 мин при температуре 25 °С, после чего фильтровали через бумажный фильтр, фильтрат использовали в качестве препарата пероксидазы. Пероксидазную активность (АПО) в хвое определяли при температуре 25 °С по скорости окисления 1.5 мМ гваякола («Sigma») 0.68 мМ пероксидом водорода в 0.1 М калий-фосфатном буфере (pH 7.0) при $\lambda=416$ нм на УФ-спектрофотометре Shimadzu UV-1800.

ИК-спектры исследуемых образцов, предварительно высушенных лиофильно, были записаны на ИК-Фурье-спектрофотометре IR Prestige 21 («Shimadzu», Япония) с приставкой нарушенного полного внутреннего отражения MIRacle с призмой ZnSe («Pike», США) относительно воздуха. Условия записи спектров: разрешение 4 см⁻¹, диапазон 4000–600 см⁻¹, число сканирований 128, функция апподизации SqrTriangle. Полученные методом НПВО значения коэффициентов пропускания были преобразованы в единицы оптической плотности обработкой полученных спектров функцией АТР-коррекции с помощью программы IR Solution.

Обсуждение результатов

Применение классических методов химического анализа к исследованию компонентного состава древесного вещества на начальных стадиях развития имеет ограничения в связи с его незначительной массой и несформировавшейся структурой, что может вызвать ошибки при определении содержания основных компонентов. Данных недостатков можно избежать, используя неразрушающий метод ИК-спектроскопии, важнейшим преимуществом которого является возможность проведения комплексного анализа основных компонентов в твердых растительных матрицах [14].

В качестве примера на рисунке 2 представлены типичные ИК-спектры отдельных частей семян сосны обыкновенной – «хвои» и «стволиков» посева 2019–2020 гг. при завершении годового цикла. Все ИК-спектры «хвои» и «стволиков» имеют схожий вид, что свидетельствует об отсутствии качественных различий в функциональной природе их компонентов.

Для количественной характеристики относительного содержания основных компонентов – лигнина и полисахаридов в исследуемых разновозрастных образцах рассчитаны величины относительной оптической плотности. На основании литературных данных [14, 15] для характеристики относительного содержания углеводной составляющей нами была использована полоса 1060 см⁻¹, ароматической составляющей – 1512 см⁻¹, в качестве внутреннего стандарта выбрана полоса 2920 см⁻¹.

На рисунке 3 в качестве примера приведена динамика изменения величин относительной оптической плотности лигнинной K₁₅₁₂ и углеводной K₁₀₆₀ составляющих для образцов «стволиков» семян сосны в процессе формирования первого годового кольца.

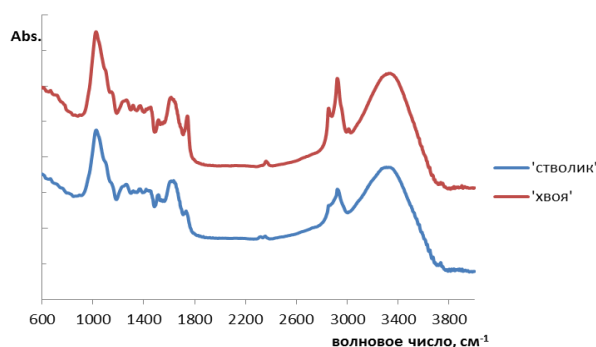


Рис. 2. ИК-спектры частей семян сосны обыкновенной («хвоя» и «стволик») по завершении годового цикла (годовой цикл 2019–2020 гг.)

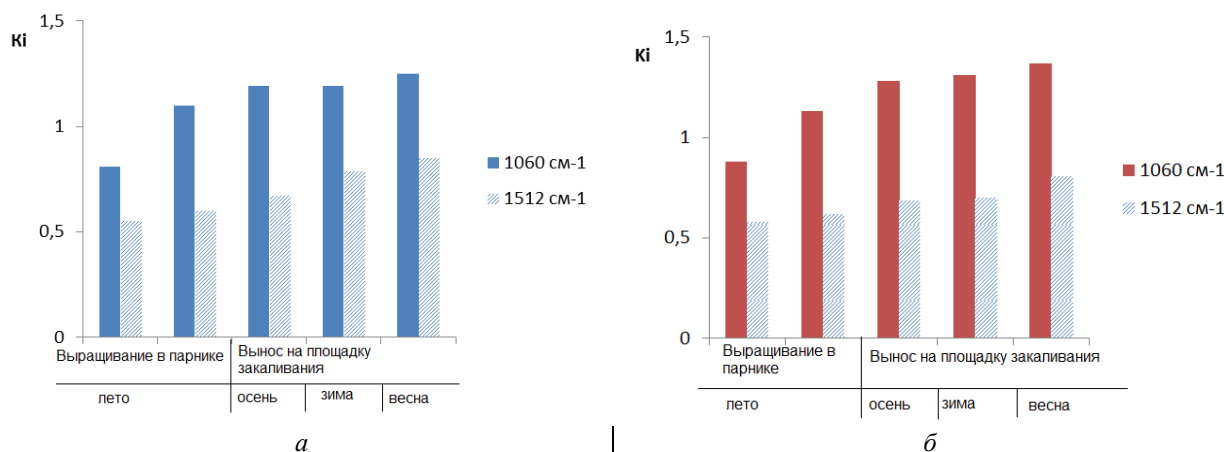


Рис. 3. Изменение величин относительной оптической плотности углеводной и лигнинной составляющих в годичном цикле для образцов «стволиков» сеянцев (*а* – 2018–2019 гг.; *б* – 2019–2020 гг.)

Для всех исследуемых образцов сеянцев сосны обыкновенной отмечены схожие тенденции – с ростом сеянца в образцах «хвои» и «стволиков» наблюдается увеличение содержания как углеводной, так и лигнинной составляющих. При этом более ярко выраженное изменение интенсивности полосы, соответствующей углеводной составляющей (рис. 3), свидетельствует об ее опережающем синтезе.

Несмотря на схожесть тенденций изменения содержания основных компонентов в растительной ткани в обоих годичных циклах, наблюдаются их количественные различия. Так, образцы «хвои» и «стволиков» сеянцев посева 2019–2020 гг. характеризуются относительно большим содержанием углеводной составляющей (величина K_{1060}) ввиду создания парникового эффекта при выращивании в теплице на начальной стадии развития. Для образцов «хвои» исследуемых выборок наибольшие изменения величин K_{1512} наблюдаются для начальной стадии развития. Незначительные изменения величин K_{1512} в стволовой части, наблюдаемые на начальных стадиях годичного цикла, демонстрируют, что процессы накопления низкомолекулярных фенольных соединений – предшественников лигнина, в начальный период онтогенеза происходят преимущественно в «хвое» растений. В динамике изменения величин K_{1512} наибольшие изменения для стволовой части наблюдаются при завершении вегетации. При пониженных температурах растение оказывается под воздействием окислительного стресса, в условиях которого происходит усиление генерации активных форм кислорода и активация свободно-радикального механизма окисления. В данный период, вероятно, за счет транспорта глюкозы из «хвои» интенсифицируются процессы образования низкомолекулярных фенольных соединений, протекающих по шикимовому пути. При этом низкомолекулярные фенольные соединения участвуют в инактивации свободных радикалов, адаптируя растения к существующему температурному режиму.

На ранних стадиях формирования древесного вещества предшественники лигнина представляют собой низкомолекулярные фенольные соединения (ФС) – мономерные фенолы, фенольные (оксibenзойные) кислоты, фенилпропаноиды [1, 16, 17]. Они являются биогенетически ранними веществами фенольного метаболизма, которые могут как накапливаться в растительных тканях, так и вовлекаться в процессы биосинтеза [18]. При этом первичные клеточные стенки растений на ранних стадиях развития небогаты фенолами [11]. По мере роста и формирования растений на начальных этапах развития (в парниковых условиях) до момента выноса на площадку закалывания отмечается увеличение общего содержания фенольных соединений как в «хвое», так и в «стволиках» сеянцев (рис. 4). Основные различия для сеянцев двух лет посева наблюдаются, главным образом, в количественном содержании фенольных соединений. Отмечено, что накопление мономерных фенолов в «хвое» после выноса на площадку закалывания происходит более интенсивно.

По завершении процесса вегетации растение переходит в состояние покоя, однако данный период характеризуется определенной физиологической активностью: происходит прирост стволика по диаметру, поглощаются элементы минерального питания, органы растения одревесневают вследствие продолжающейся лигнификации тканей. Низкие температуры приводят к активации как углеводного, так и фенольного метаболизма растений, что способствует накоплению всех групп фенольных соединений [19]. Адаптация расте-

ния к температурному режиму происходит за счет инактивации свободных радикалов, протекающей с участием низкомолекулярных фенольных соединений. Усиление синтеза фенольных соединений в результате понижения температуры окружающей среды является неспецифической реакцией, направленной на предотвращение окислительного повреждения, прежде всего в фотосинтетическом аппарате [19, 20].

Тенденции изменения содержания фенольных соединений в «стволиках» в обоих годовых циклах имеют схожий вид, с достижением минимума при выносе на площадку закаливания, что отмечается для многих видов растений в условиях низких температур. После адаптации к условиям окружающей среды содержание фенольных соединений в «стволиках» снова повышается в зимний период.

Максимальное увеличение содержания фенольных соединений в «хвое» (почти в 2 раза) к моменту выноса на площадку закаливания отмечено для сеянцев посева 2019–2020 гг. (рис. 4б), что обусловлено более благоприятными условиями роста сеянцев в первый месяц развития. Очевидно, что парниковые условия, применяемые в 2019 г., создают запас фенольных соединений в «хвое», которые сохраняются в достаточном количестве после их участия в полимеризационных процессах и адаптации растения к существующему температурному режиму.

С целью изучения редокс-состояния древесной ткани в процессе онтогенеза, проведена количественная оценка изменения относительного содержания несопряженных и сопряженных фенольных соединений (рис. 5). Показано, что тенденции изменения содержания несопряженных и сопряженных фенольных структур как в различных частях сеянцев (в «хвое» и «стволиках»), так и для исследованных годовых циклов схожи: увеличение содержания в летний период при выращивании в парниках, последующее снижение по завершении вегетационного периода, увеличение доли сопряженных фенолов в зимний период и по завершении формирования годичного слоя. При этом отмечено относительное преобладание несопряженных структур в фенольной фракции на протяжении всего годового цикла.

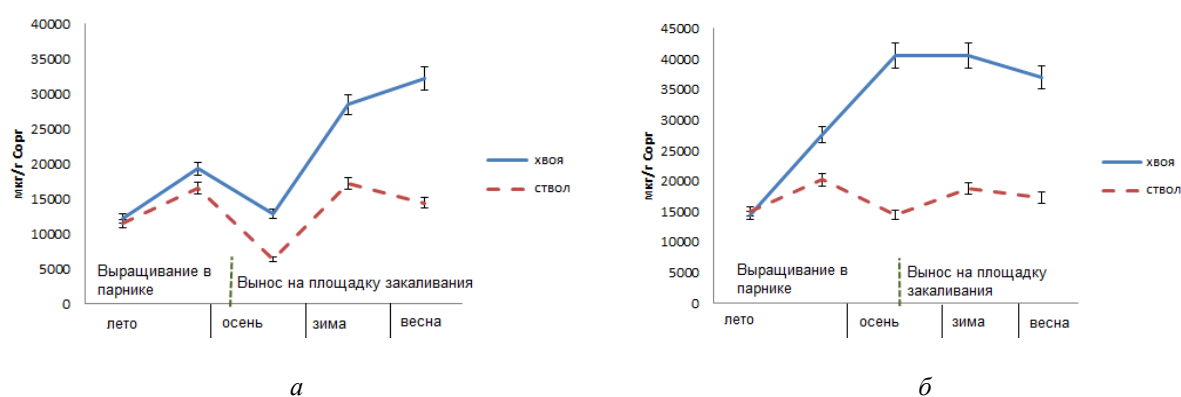


Рис. 4. Динамика изменения общего содержания фенольных соединений в экстрактах частей сеянцев сосны обыкновенной в годовых циклах (а – 2018–2019 гг.; б – 2019–2020 гг.)

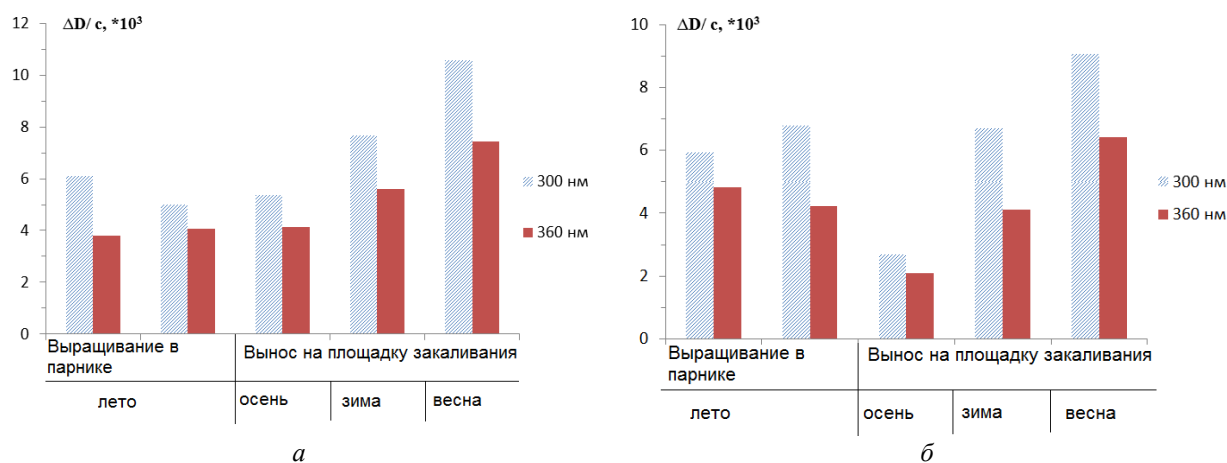


Рис. 5. Изменение интенсивности спектральных полос в дифференциальных спектрах экстрактов частей сеянцев сосны обыкновенной в годовом цикле 2018–2019 гг. (а – «хвоя»; б – «ствол»)

Увеличение доли сопряженных фенольных форм в зимний период свидетельствует о наличии окислительных процессов при низкотемпературном воздействии, что в первую очередь отражается на «хвое» растений [11]. Для стволовой части в годичном цикле наблюдается увеличение содержания сопряженных фенолов при вынесении на площадку закаливания и значительное снижение – в осенне-зимний период по завершении вегетационного периода. Наблюдаемое снижение обусловлено расходом наиболее реакционноспособных несопряженных фенольных форм стволовой части в полимеризационных процессах.

Полученные нами методами УФ-спектроскопии данные свидетельствуют о сложном многокомпонентном составе фенольной фракции. Известно [1, 21, 22], что *n*-гидроксикоричные спирты являются основными участниками процесса лигнификации, в связи с чем в качестве определяемых соединений была выбрана группа родственных хвойным лигнинам фенолов гваяцильного ряда. С применением метода высокоэффективной жидкостной хроматографии показано, что из мономерных фенольных соединений в исследуемых экстрактах семян преобладают кониферилловый и ванилиновый спирты (табл.). Динамика изменения содержания конифериллового спирта как предшественника гваяцильных структур лигнина древесины хвойных пород в экстрактах в годичном цикле представлена на рисунке 6.

Полученные данные показывают, что образование конифериллового спирта протекает в «хвое» растений, а в стволовой части преобладают полимеризационные процессы с его участием, приводящие к образованию олигомерных лигнинных форм. Отмечено, что с выносом на закаливание содержание конифериллового спирта снижается как в «хвое», так и в «стволиках».

Создание парникового эффекта при выращивании семян в теплице на начальной стадии развития в 2019–2020 гг., способствует большей интенсивности образования фенольных соединений вообще (рис. 4б), и конифериллового спирта в частности (рис. 6б). С ростом семени при приближении к завершению годичного цикла фиксируется увеличение содержания конифериллового спирта. В целом, стоит отметить, что тенденции изменения общего содержания фенольных соединений (рис. 4) и конифериллового спирта как одного из характерных представителей (рис. 6) имеют схожий вид.

Процесс лигнификации в высших растениях протекает при участии ферментного комплекса на основе пероксидазы и лакказы, причем преимущественная роль принадлежит пероксидазе [1]. Пероксидаза – ключевой фермент окислительно-восстановительных процессов, быстро реагирующий изменением своей активности на любые воздействия, оказываемые на растительный организм [23]. Пероксидазы составляют около половины оксидоредуктаз клеточных стенок. При непосредственном участии пероксидазы в хвое в процессе фотосинтеза происходит образование углеводов, а транспорт последних в зону камбия определяет интенсивность синтеза полимеров клеточной стенки. Активность пероксидаз направлена преимущественно на фенольные соединения. Пероксидазы имеют низкую специфичность к субстратам, благодаря чему каждой из пероксидаз доступен широкий круг фенолов. Этот факт позволяет использовать активность пероксидазы как общий параметр активности всех изоформ растительных пероксидаз и провести оценку влияния данного параметра на ход процесса лигнификации [24].

При сопоставлении полученных зависимостей отмечена корреляция данных по изменению пероксидазной активности (рис. 7) в надземной части семян с таковыми по накоплению в них фенольных соединений (рис. 4). Образцы «хвои» семян обоих лет посева характеризуются максимальным значением параметра пероксидазной активности в начале годичного цикла с разницей лишь в количественном содержании фермента. В процессе роста семени активность пероксидазы снижается с достижением минимума к моменту выноса семени на закаливание (защитная реакция растения в ответ на изменение внешних условий).

Содержание мономерных предшественников лигнина в «хвое» и «стволиках» на ранних этапах развития семян сосны обыкновенной (годичные циклы 2018–2019 гг. и 2019–2020 гг.), мкг/гC_{орг}

Сезон	Ванилиновый спирт		Ванилин		Ванилиновая кислота		Ацетованилон		Кониферилловый спирт	
	2018–2019 гг.	2019–2020 гг.	2018–2019 гг.	2019–2020 гг.	2018–2019 гг.	2019–2020 гг.	2018–2019 гг.	2019–2020 гг.	2018–2019 гг.	2019–2020 гг.
лето	37.1/8.2	42.1/22.3	0.5/2.2	7.1/4.1	30.2/20.4	65.3/21.6	3.2/1.5	8.3/20.9	77.1/67.2	144.2/88.5
осень	49.7/39.9	90.3/30.8	0.5/0.8	9.7/1.1	27.1/29.1	66.8/24.0	0.8/25.8	21.8/17.1	149.1/89.3	179.5/53.6
зима	39.2/26.8	54.3/30.2	1.5/0.9	2.5/1.3	30.4/25.1	52.1/36.7	7.6/2.4	24.5/19.2	136.1/88.3	162.8/57.4
весна	77.8/37.7	65.6/49.9	0.5/0.5	4.5/0.5	17.4/26.8	6.0/14.9	19.1/1.2	6.5/4.6	129.6/81.7	157.5/61.8

*в числителе указано содержание в «хвое», в знаменателе – в «стволике» семян.

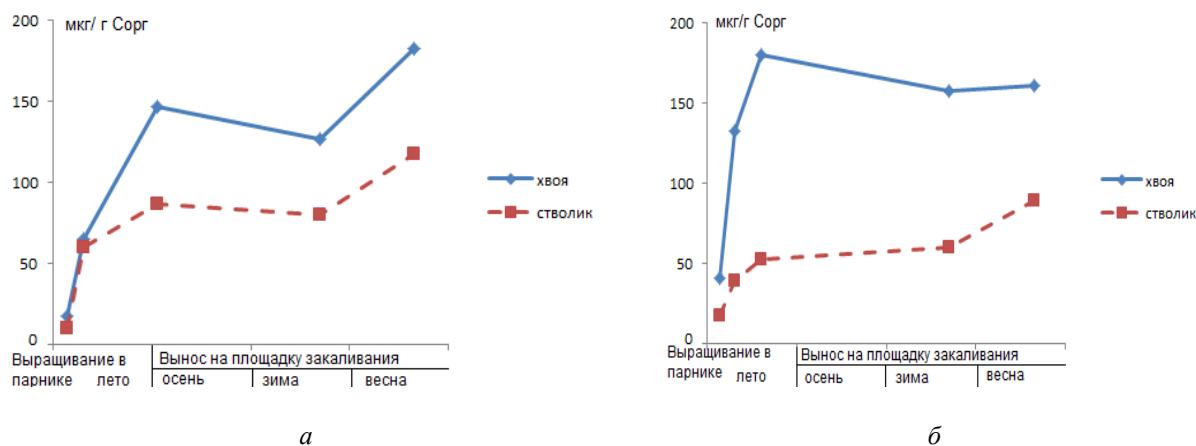


Рис. 6. Динамика изменения содержания кониферилового спирта в экстрактах частей сеянцев сосны обыкновенной в годичных циклах (*а* – 2018–2019 гг.; *б* – 2019–2020 гг.)



Рис. 7. Динамика изменения активности пероксидазы в экстрактах «хвои» сеянцев сосны обыкновенной в годичных циклах 2018–2019 гг. и 2019–2020 гг.

В годичном цикле наблюдается незначительное повышение показателя пероксидазной активности в зимний период в условиях низких температур. При повышении количества окислителя в редокс-системе клеточной стенки и увеличении показателя активности пероксидазы происходит торможение роста растений в зимний период, что очевидно является стрессовой реакцией на изменение редокс-баланса системы [8] и выражается в усилении биосинтеза лигнина. По окончании годичного цикла происходит резкое снижение ферментативной активности в связи с усилением протекающих вегетационных процессов.

Совокупность известных сведений о последовательных сезонных изменениях пероксидазной активности хвои в осенне-зимний период указывает на возможность существования в хвое при низких температурах активных адаптационных процессов, включая биосинтез отдельных компонентов [25]. Это приводит к накоплению пероксидных группировок в клетках растений, вследствие чего повышается активность пероксидазы, катализирующая реакцию разложения перекиси водорода. Наблюдаемая адаптивная перестройка окислительного аппарата в сторону активации пероксидазы препятствует нарушению дыхательного процесса, что позволяет растениям поддерживать окислительно-восстановительные процессы на относительно стабильном уровне [23].

Заключение

Выполненные экспериментальные исследования формирования биомассы растений на примере однолетних сеянцев сосны обыкновенной на начальных этапах развития выявили, что тенденции изменения компонентного состава сеянцев сопоставимы с тенденциями изменения как качественного и количественного состава фенольных соединений в годичном цикле развития, так и редокс-состояния растительной ткани, определяемого наличием фенольной фракции.

Установлено изменение состава низкомолекулярной фенольной фракции как проявления адаптационного механизма растений к воздействию стрессовых условий. Отмечено преобладание в фенольной фракции несопряженных фенолов, обладающих наибольшей реакционной способностью в редокс-взаимодействиях. Показана корреляция изменения активности пероксидазы с общим содержанием фенольных соединений и кониферилового спирта как маркера процесса лигнинфикации.

Список литературы

1. Боголищын К.Г., Лунин В.В., Косяков Д.С., Карманов А.П., Скребец Т.Э., Попова Н.Р., Малков А.В., Горбова Н.С., Пряхин А.Н., Шкаев А.Н., Иванченко Н.Л. Физическая химия лигнина. М., 2010. 492 с.
2. Фуксман И.Л., Новицкая Л.Л., Исидоров В.А., Рошин В.И. Фенольные соединения хвойных деревьев в условиях стресса // Лесоведение. 2005. №3. С. 4–10.
3. Freudenberg K. The constitution and biosynthesis of Lignin. Molecular biology, biochemistry and biophysics. New York, 1968. Pp. 47–122.
4. Sakakibara A. Chemical structure of lignin related mainly to degradation products // Recent advances in lignin biodegradation research. 1983. Vol. 1. Pp. 12–33.
5. Tobimatsu Y., Schuetz M. Lignin polymerization: how do plants manage the chemistry so well? // Current Opinion in Biotechnology. 2019. Vol. 56. Pp. 75–81. DOI: 10.1016/j.copbio.2018.10.001.
6. Deighton N., Richardson A., Stewart D., McDougall G.J. Cell-wall associated oxidases from the lignifying xylem of angiosperms and gymnosperms: monolignol oxidation // Holzforschung. 1999. Vol. 53. Pp. 503–510. DOI: 10.1515/HF.1999.083.
7. Bao W., O'Malley D.M., Whetten R., Sederoff R.R. A laccase associated with lignification in loblolly pine xylem // Science. 1993. Vol. 260. Pp. 672–674. DOI: 10.1126/science.260.5108.672.
8. Шарова Е.И., Медведев С.С. Редокс-реакции в апопласте растущих клеток // Физиология растений. 2017. Т. 64. №1. С. 3–18. DOI: 10.7868/S0015330317010146.
9. Жигунов А.В., Соколов А.И., Харитонов В.А. Выращивание посадочного материала с закрытой корневой системой в Устьянском тепличном комплексе. Практические рекомендации. Петрозаводск, 2016. 43 с.
10. Маттис Г.Я. Теория и практика ускоренного выращивания семян в питомниках // Вестник сельскохозяйственной науки. 1978. №11. С. 109–114.
11. Козина Л.В. Метаболизм фотоассимилятов и передвижение веществ у хвойных. Владивосток, 1995. 126 с.
12. Николаева Т.Н., Лапшин П.В., Загоскина Н.В. Метод определения суммарного содержания фенольных соединений в растительных экстрактах с реактивом Фолина-Дениса и реактивом Фолина-Чокальтеу: модификация и сравнение // Химия растительного сырья. 2021. №2. С. 291–299. DOI: 10.14258/jcprgm.2021028250.
13. Боголищын К.Г., Сурсо М.В., Гусакова М.А., Зубов И.Н. Динамика сезонных и возрастных изменений параметра активности пероксидазы в хвое можжевельника обыкновенного (*Juniperus Communis* L.) // ИВУЗ. Лесной журнал. 2013. №6. С. 91–96.
14. Хвиюзов С.С., Боголищын К.Г., Гусакова М.А., Зубов И.Н. Оценка содержания лигнина в древесине методом ИК спектроскопии // Фундаментальные исследования. 2015. №9. С. 87–90.
15. Vartanian E., Barres O., Roque C. FTIR spectroscopy of woods: A new approach to study the weathering of the carving face of a sculpture // Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. 2014. Vol. 136. Pp. 1255–1259. DOI:10.1016/j.saa.2014.10.011.
16. Блансей А., Шутый Л. Фенольные соединения растительного происхождения. М., 1977. 297 с.
17. Deng Y., Lu S. Biosynthesis and regulation of phenylpropanoids in plants // Critical Reviews in Plant Sciences. 2017. Vol. 36. Pp. 257–290. DOI: 10.1080/07352689.2017.1402852.
18. Muro-Villanueva F., Mao X., Chapple C. Linking phenylpropanoid metabolism, lignin deposition, and plant growth inhibition // Current opinion in biotechnology. 2019. Vol. 56. Pp. 202–208. DOI: 10.1016/J.Copbio.2018.12.008.
19. Судачкова Н.Е. Состояние и перспективы изучения влияния стрессов на древесные растения // Лесоведение. 1998. №2. С. 3–9.
20. Neugart S., Kläring H.P., Zietz M., Schreiner M., Rohn S., Kroh L.W., Krumbein A. The effect of temperature and radiation on flavonolaglycones and flavonol glycosides of kale (*Brassica oleracea* var. *sabellica*) // Food Chemistry. 2012. Vol. 133. Pp. 1456–1465. DOI: 10.1016/j.foodchem.2012.02.034.
21. Сарканен К.В., Людвиг К.Х. Лигнины (структура, свойства, реакции). М., 1975. 632 с.
22. Barros J., Serk H., Granlund I., Pesquet E. The cell biology of lignification in higher plants // Annals of botany. 2015. Vol. 7. Pp. 1053–1074. DOI: 10.1093/aob/mcv046.
23. Андреева В.А. Фермент пероксидаза. Участие в защитном механизме растений. М., 1988. 127 с.
24. Roitto M., Ahonen-Lonnarh U., Lamppi J., Huttunen S. Apoplastic and total peroxidase activities in Scots pine needles at subarctic polluted sites // European Journal of Forest Pathology. 1999. Vol. 29. №6. Pp. 399–410.
25. Шавнин С.А., Юсупов И.А., Марина Н.В., Монтиле А.А., Голиков Д.Ю. Сезонные изменения содержания хлорофиллов и каротиноидов в хвое сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) в зоне влияния теплового поля газового факела // Физиология растений. 2021. Т. 68. №2. С. 1–11. DOI: 10.31857/S0015330321020184.

Поступила в редакцию 4 июня 2021 г.

После переработки 3 декабря 2021 г.

Принята к публикации 17 декабря 2021 г.

Для цитирования: Гусакова М.А., Боголищын К.Г., Красикова А.А., Селиванова Н.В., Хвиюзов С.С. Характеристика редокс-состояния лигноуглеводной матрицы древесины на начальных этапах развития на примере сосны обыкновенной // Химия растительного сырья. 2022. №1. С. 213–223. DOI: 10.14258/jcprgm.2022019685.

Gusakova M.A.¹, Bogolitsyn K.G.^{1,2}, Krasikova A.A.^{1*}, Selivanova N.V.¹, Khviuzov S.S.¹ CHARACTERISTICS OF THE REDOX STATE OF THE LIGNIN-CARBOHYDRATE WOOD MATRIX AT THE INITIAL STAGES OF DEVELOPMENT ON THE EXAMPLE OF SCOTS PINE

¹ N. Laverov Federal Center for Integrated Arctic Research of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, nab. Severnoy Dviny, 23, Arkhangelsk, 163069 (Russia), e-mail: ann.krasikova@gmail.com

² Northern (Arctic) Federal University named after M.V. Lomonosov, nab. Severnoy Dviny, 17, Arkhangelsk, 163002 (Russia)

The studies of wood formation at the initial stages allowed confirming the determining role of the redox transformations of monolignols in the lignification of plant matrix. The change in the composition of the phenolic fraction (conjugated and non-conjugated phenolic structures) of the phenol-quinone redox system of the cell wall was studied using the derivative and differential UV spectroscopy. It was shown that the accumulation of low-molecular phenolic compounds in the initial period of ontogenesis occurs mainly in the "needles" of plants. It was confirmed that the seedlings being removed to the hardening site adapt to the existing temperature regime. It is characterized by lower content of low-molecular phenolic compounds preventing the development of oxidative processes. The plant is exposed to oxidative stress at low temperatures, when the enzymatic (peroxidase activity) system of plant protection is activated. The change in the coniferyl alcohol content as a marker of the lignification is shown. The correlation of changes in peroxidase activity with the total content of phenolic compounds and coniferyl alcohol was shown. The IR spectroscopy method showed a change in the ratio of carbohydrate and lignin components at the initial stages of the development of seedlings of scots pine.

Keywords: redox processes, cell wall, scots pine, phenolic compounds, enzymatic activity.

References

1. Bogolitsyn K.G., Lunin V.V., Kosyakov D.S., Karmanov A.P., Skrebets T.E., Popova N.R., Malkov A.V., Gorbova N.S., Pryakhin A.N., Shkayev A.N., Ivanchenko N.L. *Fizicheskaya khimiya lignina*. [Physical chemistry of lignin]. Moscow, 2010, 492 p. (in Russ.).
2. Fuksman I.L., Novitskaya L.L., Isidorov V.A., Roshchin V.I. *Lesovedeniye*, 2005, no. 3, pp. 4–10. (in Russ.).
3. Freudenberg K. *The constitution and biosynthesis of Lignin. Molecular biology, biochemistry and biophysics*, New York, 1968, pp. 47–122.
4. Sakakibara A. *Recent advances in lignin biodegradation research*, 1983, vol. 1, pp. 12–33.
5. Tobimatsu Y., Schuetz M. *Current Opinion in Biotechnology*, 2019, vol. 56, pp. 75–81. DOI: 10.1016/j.copbio.2018.10.001.
6. Deighton N., Richardson A., Stewart D., McDougall G.J. *Holzforschung*, 1999, vol. 53, pp. 503–510. DOI: 10.1515/HF.1999.083.
7. Bao W., O'Malley D.M., Whetten R., Sederoff R.R. *Science*, 1993, vol. 260, pp. 672–674. DOI: 10.1126/science.260.5108.672.
8. Sharova Ye.I., Medvedev S.S. *Fiziologiya rasteniy*, 2017, vol. 64, no. 1, pp. 3–18. DOI: 10.7868/S0015330317010146. (in Russ.).
9. Zhigunov A.V., Sokolov A.I., Kharitonov V.A. *Vyrashchivaniye posadochnogo materiala s zakrytoy kornevoy sistemoi v Ust'yanskom teplichnom komplekse. Prakticheskiye rekomendatsii*. [Growing planting material with a closed root system in the Ustyansk greenhouse complex. Practical recommendations]. Petrozavodsk, 2016, 43 p. (in Russ.).
10. Mattis G.Ya. *Vestnik sel'skokhozyaystvennoy nauki*, 1978, no. 11, pp. 109–114. (in Russ.).
11. Kozina L.V. *Metabolizm fotoassimilyatov i peredvizheniye veshchestv u khvoynykh*. [Metabolism of photoassimilates and movement of substances in conifers]. Vladivostok, 1995, 126 p. (in Russ.).
12. Nikolayeva T.N., Lapshin P.V., Zagoskina N.V. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*, 2021, no. 2, pp. 291–299. DOI: 10.14258/jcpm.2021028250. (in Russ.).
13. Bogolitsyn K.G., Surso M.V., Gusakova M.A., Zubov I.N. *IVUZ. Lesnoy zhurnal*, 2013, no. 6, pp. 91–96. (in Russ.).
14. Khviuzov S.S., Bogolitsyn K.G., Gusakova M.A., Zubov I.N. *Fundamental'nyye issledovaniya*, 2015, no. 9, pp. 87–90. (in Russ.).
15. Vartanian E., Barres O., Roque C. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2014, vol. 136, pp. 1255–1259. DOI:10.1016/j.saa.2014.10.011.
16. Blansy A., Shutty L. *Fenol'nyye soyedineniya rastitel'nogo proiskhozhdeniya*. [Phenolic compounds of plant origin]. Moscow, 1977, 297 p. (in Russ.).
17. Deng Y., Lu S. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 2017, vol. 36, pp. 257–290. DOI: 10.1080/07352689.2017.1402852.
18. Muro-Villanueva F., Mao X., Chapple C. *Current opinion in biotechnology*, 2019, vol. 56, pp. 202–208. DOI: 10.1016/J.Copbio.2018.12.008.
19. Sudachkova N.Ye. *Lesovedeniye*, 1998, no. 2, pp. 3–9. (in Russ.).
20. Neugart S., Kläring H.P., Zietz M., Schreiner M., Rohn S., Kroh L.W., Krumbein A. *Food Chemistry*, 2012, vol. 133, pp. 1456–1465. DOI: 10.1016/j.foodchem.2012.02.034.
21. Sarkanen K.V., Lyudvig K.Kh. *Ligniny (struktura, svoystva, reaktivnosti)*. [Lignins (structure, properties, reactions)]. Moscow, 1975, 632 p. (in Russ.).

* Corresponding author.

22. Barros J., Serk H., Granlund I., Pesquet E. *Annals of botany*, 2015, vol. 7, pp. 1053–1074. DOI: 10.1093/aob/mcv046.
23. Andreyeva V.A. *Ferment peroksidaza. Uchastiye v zashchitnom mekhanizme rasteniy*. [Enzyme peroxidase. Participation in the defense mechanism of plants]. Moscow, 1988, 127 p. (in Russ.).
24. Roitto M., Ahonen-Lonnarth U., Lamppi J., Huttunen S. *European Journal of Forest Pathology*, 1999, vol. 29, no. 6, pp. 399–410.
25. Shavnin S.A., Yusupov I.A., Marina N.V., Montile A.A., Golikov D.Yu. *Fiziologiya rasteniy*, 2021, vol. 68, no. 2, pp. 1–11. DOI: 10.31857/S0015330321020184. (in Russ.).

Received June 4, 2021

Revised December 3, 2021

Accepted December 17, 2021

For citing: Gusakova M.A., Bogolitsyn K.G., Krasikova A.A., Selivanova N.V., Khviuzov S.S. *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya*, 2022, no. 1, pp. 213–223. (in Russ.). DOI: 10.14258/jcprm.2022019685.

