

УДК 547.458.88

НАКОПЛЕНИЕ ЛИГНИНА И ФЕНОЛЬНЫХ КИСЛОТ В КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКЕ ГИПОКОТИЛЕЙ ОГУРЦА ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ ПЕКТИНОВЫХ ОЛИГОСАХАРИДОВ*

© Н.Ю. Селиванов**, О.Г. Селиванова, А.А. Галицкая, Л.Ю. Матора

*Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов, ФИЦ
«Саратовский научный центр РАН», пр. Энтузиастов, 13, Саратов,
410049, Россия, selivanovn64@yandex.ru*

Продemonстрирована эффективность применения продуктов ферментализации цитрусового пектина для стимулирования проявлений фитоиммунитета и устойчивости к абиогенным стрессам. Показано, что обработка олигосахаридами деэтерифицированного цитрусового пектина (полигалактуроновой кислоты, ПГК) вызывает индукцию синтеза лигнина и увеличение содержания фенольных кислот в клеточных стенках гипокотилей огурца (*Cucumis sativus*). Установлено, что модификация ПГК на 3.8% остатками глюкозамина повышает активность продуктов ее ферментализации и приводит к увеличению на 17% общего содержания фенольных соединений в клеточных стенках гипокотилей огурца по сравнению с результатами обработки растений фрагментами немодифицированной ПГК. При этом абсолютное содержание доминирующих фенольных компонентов – кофейной и п-кумаровой кислот увеличивается на 55 и 26% соответственно, а также изменяется спектр минорных компонентов фенольных кислот в клеточной стенке этиолированных гипокотилей огурца. Предложенный в работе вариант модификации позволяет получать полисахариды с регулируемым содержанием вводимого лиганда. Реакция конденсации с образованием химически стойкой амидной связи позволяет эффективно легировать углеводные полисахариды и их фрагменты, что повышает возможность получения биоактивных гликоконъюгатов для использования их в качестве индукторов устойчивости к абиогенным стрессам и болезням, локализуемых инфекцию в процессе заражения растения.

Ключевые слова: *Cucumis sativus*, пектин, олигосахариды, биологическая активность, фенольные кислоты.

Для цитирования: Селиванов Н.Ю., Селиванова О.Г., Галицкая А.А., Матора Л.Ю. Накопление лигнина и фенольных кислот в клеточной стенке гипокотилей огурца под воздействием пектиновых олигосахаридов // Химия растительного сырья. 2025. №2. С. 93–102. <https://doi.org/10.14258/jcprm.20250213544>.

Введение

Вырабатываемые растениями фенольные кислоты являются вторичными метаболитами и играют важную роль в клетках и тканях растительного организма в процессах клеточного цикла, онтогенеза, адаптации к стрессам, а также во взаимоотношениях растений с микроорганизмами. Фенольные соединения действуют как сигнальные молекулы-медиаторы при иницировании симбиоза ризобий и бобовых растений, установлении симбиоза арбускулярной микоризы и являются факторами защиты растений [1], при этом индуцированная резистентность регулируется сетью взаимосвязанных путей передачи сигнала [2].

Оксикоричные кислоты (*n*-кумаровая, кофейная, феруловая, синаповая) интенсивно синтезируются в ответ на инфицирование и повреждение растительных тканей из шикимовой кислоты в системе фенилпропаноидного биосинтеза, контролируемого ферментами фенилаланинаминиаз лиазой и кумароил-КоА лигазой, и как продукты распада полимеров клеточной стенки в сосудистых растениях [3, 4]. Они служат предшественниками синтеза защитных полифенолов, таких как лигнин, а также образуют ковалентные связи с полисахаридами, в частности, с пектиновыми полимерами и гемицеллюлозами, что придает клеточной стенке устойчивость к механическому и ферментативному разрушению [5]. Фенольные метаболиты

*Данная статья имеет электронный дополнительный материал (приложение), который доступен читателям на сайте журнала. DOI: 10.14258/jcprm.20250213544s

** Автор, с которым следует вести переписку.

участвуют в формировании неспецифической устойчивости у растений и могут выступать в качестве как локальных, так и системных факторов резистентности к различным биогенным и абиогенным стрессам, а также могут подавлять ионный, водный транспорт и диффузию медиаторов в тканях растения и между растением и патогеном. Накопление фенольных соединений в месте инфицирования часто сопровождается локализованной выработкой активных форм кислорода, обеспечивающих антимикробную активность и приводящих к модификации полимеров клеточной стенки [6].

В качестве одного из основных первичных механизмов индукции защитных реакций рассматривается рецепция олигосахаридных фрагментов пектиновой природы, образующихся на ранних этапах инфицирования растительной ткани. Аналогичной активностью обладают хитиновые и хитозановые олигосахариды, образующиеся при ферментативной деградации клеточных стенок фитопатогенных грибов [7]. Олигосахариды различной структуры являются индукторами защитных реакций и медиаторами морфо- и онтогенеза у растений. Пектиновые олигосахариды, отличающиеся степенью полимеризации, участвуют в регуляции различных физиологических процессов [8]. Для пектиновых полимеров характерна постсинтетическая модификация, заключающаяся в деэтерификации карбоксильных групп и облегчающая последующую ферментативную деградацию молекул. Наличие и распределение модификаций в структуре пектиновых полисахаридов ограничивает ферментативную деградацию в клеточной стенке в условиях *in vivo* и может регулировать образование олигосахаридов различной степени полимеризации [9]. Для рамногалактуронановых разветвленных участков молекул пектина показано образование устойчивых боратных комплексов, а также образование ковалентных конъюгатов с феруловой кислотой [10, 11].

Таким образом, пектиновые полисахариды являются ценным источником биологически активных гликоконъюгатов, способных положительно воздействовать на фитоиммунитет, причем модификации в структуре данных природных полимеров могут изменять уровень их активности.

В настоящей работе исследовано влияние минорных модификаций карбоксильных групп глюкозамином в молекуле полигалактуроновой кислоты на элиситорную активность образующихся олигосахаридов – продуктов ферментализации в отношении накопления фенольных соединений в клеточных стенках этиолированных проростков огурца.

Экспериментальная часть

Содержание уроновых кислот в пектиновых полисахаридах определяли по реакции с 3,5-диметилфенолом с использованием галактуроновой кислоты в качестве стандарта [12].

Высокоэффективную гель-хроматографию продуктов ферментализации пектиновых полисахаридов проводили на колонке Synchropak GPC300 (4.6×250 мм, Eichrom Tech., США) с предколонкой Eprogen GPC1000 (4.6×50 мм, Eprogen, США) на хроматографической системе SmartLine (Knauer, Германия) с ультрафиолетовым детектором K-2500. Углеводы элюировали 50 мМ калий фосфатным буфером, содержащим 0.1 М NaCl, pH 7.2. Скорость потока составляла 0.2 мл/мин, объем образца – 20 мкл. Регистрацию осуществляли при $\lambda=205$ и 226 нм.

Получение деэтерифицированного пектина. Коммерческий препарат цитрусового пектина (Sigma), содержащий 80% галактуроновой кислоты и со степенью этерификации 9% (*m/m*), очищали переосаждением тремя объемами 96% этанола. Пектин дополнительно дemetоксилировали 0.1 М NaOH при перемешивании в течение 30 мин при комнатной температуре [13]. Полученный раствор нейтрализовали 0.5 М раствором лимонной кислоты до pH 6,0 и осаждали тремя объемами 96% этанола. Осадок отжимали, обезвоживали ацетоном и сушили при 50 °C.

Получение пектина, модифицированного глюкозамином. 100 мг деэтерифицированного цитрусового пектина (содержание галактуроновой кислоты 80%) растворяли в 20 мл деионизированной воды, добавляли 16 мг 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)-карбодиимида (Fluka), 27 мг β -D-глюкозамина гидрохлорида (Рехим) и 0.5 М раствор HCl до pH 4.7. Реакцию проводили при комнатной температуре в течение 4 часов при перемешивании, заданное значение pH поддерживали 0.5 М раствором HCl. По окончании реакции смесь осаждали тремя объемами 96% этанола в присутствии 5 мМ HCl и выдерживали ночь при 4 °C. Полученный преципитат отделяли центрифугированием, промывали ацетоном и высушивали при 50 °C.

Содержание глюкозамина в модифицированном пектиновом полимере определяли хроматографически на колонке Kromasil C-18, 2×150, с использованием предколоночной модификации аминохинолин N

гидроксисукцинимидил карбоматом по методу AccQ Tag (Waters США), с гидрохлоридом глюкозамина в качестве внешнего стандарта. Для этого 1 мг образца гидролизовали в 0.5 мл 2 М трифторуксусной кислоты 4 ч при 100 °С. Кислоту трижды упаривали с добавлением метанола в токе азота, остаток растворяли в 0.5 мл буфера 10 мкл образца использовали для анализа.

Ферментативный гидролиз пектиновых препаратов. Препараты демеоксилированного цитрусового пектина (20 мг) растворяли в 4.5 мл 0.04 М натрий ацетатного буфера pH 4.5, добавляли 95 мкл раствора коммерческого препарата эндополигалактуроназы из *Aspergillus niger* (Fluka, активность 1.52 Е/мл), который предварительно обессоливали на колонке с Sephadex 25М, перемешивали и инкубировали при 37 °С. Через 30 мин реакцию останавливали кипячением, денатурированный фермент удаляли центрифугированием, продукты ферментолитического анализа анализировали методом высокоэффективной гель-хроматографии и хранили при -20 °С.

Определение активности олигосахаридов. В работе использовали растения огурца *Cucumis sativus* сорта Феникс (агрофирма Аэлита, Москва). Семена проращивали в темноте в течение 4 дней при 23 °С. В экспериментах использовали отрезки гипокотилей длиной 10 мм, которые разрезали вдоль на две равные части. Нарезанные половинки отмывали 30 мин в дистиллированной воде и затем инкубировали в растворах тестируемых олигосахаридов в темноте при комнатной температуре в течение 20 ч [14]. Сегменты, инкубированные в дистиллированной воде, использовали в качестве контроля. Все манипуляции проводили при рассеянном свете.

Гистохимическое окрашивание лигнина. По окончании инкубации сегменты гипокотилей помещали в 0.1% раствор флюороглюцина в 96% этаноле, содержащем 5–10% HCl. После проявления окраски половинки сканировали на планшетном сканере Epson Perfection 1260, интенсивность окраски оценивали визуально. Биологическую активность олигосахаридов определяли, как минимальную концентрацию, которая вызывала развитие красной окраски сегментов гипокотилей [14].

Экстракция и количественное определение фенольных кислот в клеточных стенках гипокотилей огурца. После инкубации с тестируемыми олигосахаридами, делали навески половинок гипокотилей по 500 мг сырого веса, гомогенизировали в 1 мл калий фосфатного буфера, pH 6.8, встряхивали в течение 15 мин и центрифугировали. Осадок суспендировали в 1 мл 80% этанола, обрабатывали в течение 5 мин в ультразвуковой ванне УЗУМИ-05 и экстрагировали 30 мин при комнатной температуре, затем центрифугировали, осадок промывали ацетоном и сушили под вакуумом. Высушенные клеточные стенки суспендировали в 1 мл 1 н раствора NaOH, продували азотом и перемешивали в течение 2 ч в темноте при комнатной температуре. Полученный гидролизат нейтрализовали HCl и экстрагировали 0.5 мл этилацетата 8 ч при температуре 4 °С. Фазу этилацетата отделяли центрифугированием, количественно собирали и высушивали в токе азота, образцы растворяли в 100 мкл 0.1% трифторуксусной кислоты. 20 мкл использовали для хроматографического анализа.

Хроматографическое определение фенольных соединений клеточных стенок огурца проводили на колонке Kromasil C-18 (2×150 мм, 5 мкм) с предколонкой Phenomenex C-18 (2×4 мм, США). Образцы элюировали градиентом ацетонитрила (0–75%) в 0.1% трифторуксусной кислоте при скорости потока 0.3 мл/мин. Градиент: 0–35 мин – 0–65% CH₃CN, 35–36 мин – 65–75% CH₃CN, 36–45 мин – 75% CH₃CN. Детекция фотометрическая при λ=280 нм. Идентификацию пиков проводили методом внешнего стандарта с помощью программного обеспечения EuroChrom2000 (Knauer, версия 2.05).

Статистическая обработка результатов. Погрешность определения характеризовали стандартным отклонением. Достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента при уровне доверительной вероятности 95%.

Результаты и обсуждение

Получение пектина, модифицированного глюкозамином. Для получения конъюгата в качестве базового полисахарида был использован деэтерифицированный цитрусовый пектин, а в качестве лиганда мономер хитозана – глюкозамин. Конъюгацию осуществляли по реакции конденсации аминогрупп глюкозамина с карбоксильными группами остатков галактуроновой кислоты пектина при помощи водорастворимого 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)-карбодиимида (EDC) (рис. 1).

Данный реагент широко применяется в пептидной и нуклеотидной химии, а также для модификации биологических макромолекул [15–17]. Он селективно взаимодействует с карбоксильными группами с образованием активированного О-ацилизомочевинного интермедиата, который далее вступает в реакцию с аминосодержащими нуклеофилами с образованием амидной связи [18].

Основной целью этапа модификации было получение полисахарида с частично замещенными карбоксильными группами. Наличие свободных карбоксильных групп необходимо для проявления активности пектиновых фрагментов [19, 20]. С этой целью реакцию проводили в присутствии двукратного избытка карбодиимида и концентрации глюкозамина в расчете на пятипроцентное замещение карбоксильных групп пектина. Анализ содержания глюкозамина в полученном образце показал, что 3.8% от общего числа остатков галактуроновой кислоты в нем замещены глюкозамином. При увеличении концентрации лиганда в 6 раз его содержание в конъюгате увеличилось незначительно, и составило лишь 4.6%. Константа скорости реакции гидролиза промежуточного О-ацилизомочевинного комплекса в случае водорастворимого карбодиимида EDC составляет $2\text{--}3\text{ с}^{-1}$ [18], что может служить объяснением наблюдаемой слабой зависимости выхода реакции от концентрации лиганда.

Получение пектиновых олигосахаридов и олигосахаридных конъюгатов проводили методом ограниченной ферментативной фрагментации соответствующих полимеров с использованием коммерческого препарата пектиназы из *Aspergillus niger*. Время реакции и количество фермента рассчитывали так, чтобы за 2 ч деградации подвергалось около 10% гликозидных связей. Продукты ферментолитического деэтерифицированного пектина и пектина, модифицированного глюкозамином, по данным гель-хроматографии, состояли из олигосахаридов с молекулярной массой 2–3 кДа.

Оценку биологической активности полученных модифицированных олигосахаридов проводили с использованием растительного биотеста, основанного на индукции биосинтеза лигнина в клеточных стенках гипокотилей этилированных проростков огурца [14]. Этот биотест позволяет выявить элиситорную активность олигосахаридов различного состава: как пектиновой, так и хитин-хитозановой природы.

В работе использовали смесь олигосахаридов с диапазоном молекулярных масс 2–8 кДа, что соответствует степени полимеризации 11–48n. На наличие биологической активности были протестированы препараты олигосахаридов в диапазоне концентраций $10^{-7}\text{--}10^{-5}$ М. На наличие элиситорной активности были также протестированы мономеры пектина и хитозана – галактуроновая кислота, глюкозамин и N-ацетилглюкозамин в соответствующих концентрациях (рис. 2).

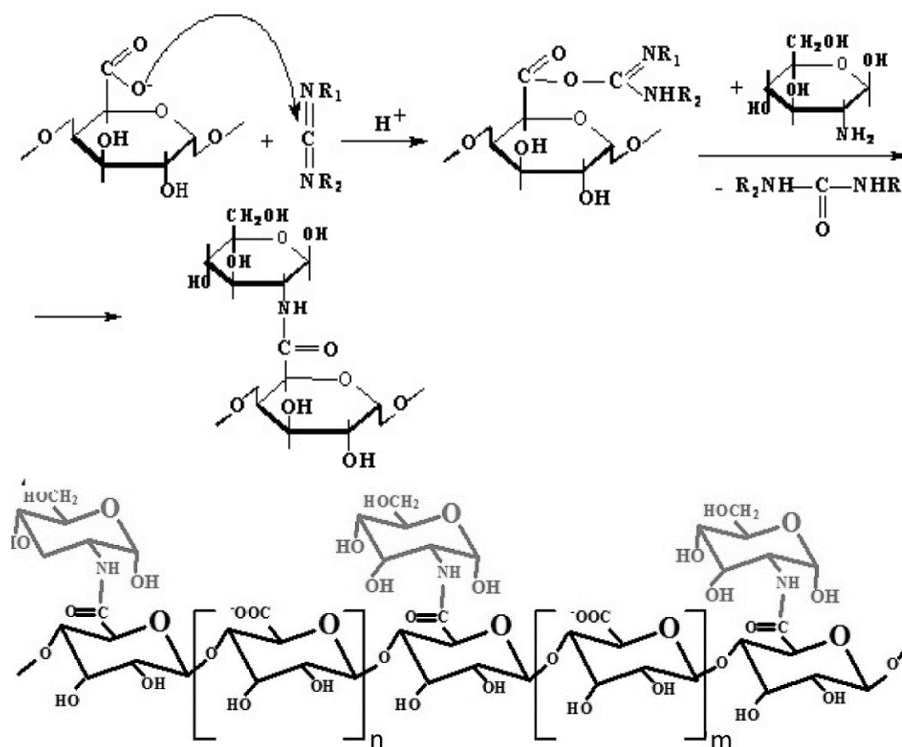


Рис. 1. Схема модификации карбоксильных групп пектина глюкозамином

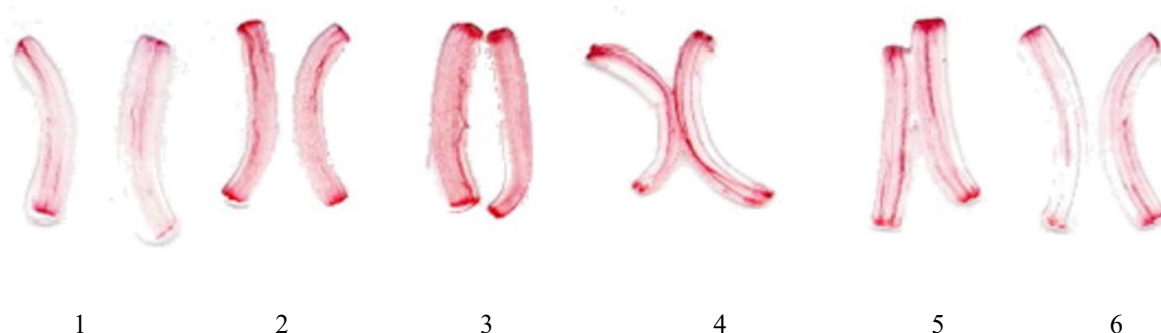


Рис. 2. Накопление лигнинных компонентов в гипокотильях огурца. 1 – контроль без олигосахаридов; 2 – олигосахариды деэтерифицированного цитрусового пектина 10^{-6} М; 3 – олигосахариды деэтерифицированного цитрусового пектина, замещенного глюкозамином на 4.8% 10^{-6} М; 4 – контроль галактуриновая кислота 10^{-6} М; 5 – контроль глюкозамин 10^{-6} М; 6 – контроль N-ацетилглюкозамин 10^{-6} М

Сегменты этиолированных гипокотилей инкубировали в течение 20–24 ч в растворах тестируемых олигосахаридов в концентрациях от 1 до 100 мкг/мл, в качестве положительного контроля использовали немодифицированные олигосахариды деэтерифицированного цитрусового пектина. Показано, что препараты пектиновых олигосахаридов в концентрации 50 мкг/мл стимулируют синтез лигнина в различных тканях отрезков гипокотилей.

Наличие лигнина в гипокотильях огурца выявляли гистохимически по образованию окрашенного комплекса с флюороглюцином. Показана концентрационная зависимость действия тестируемых олигосахаридов на накопление лигнина. При этом нижний предел чувствительности биотеста с использованием флюороглюцинола составил 10 мкг/мл как для деэтерифицированных, так и для модифицированных олигосахаридов.

Биологическую (специфическую) активность образцов определяли как минимальную концентрацию препаратов олигосахаридов, которая вызывает увеличение интенсивности красной окраски на поверхности гипокотиллярных сегментов. Данный биотест позволяет проводить качественную оценку и сравнение элиситорной активности олигосахаридных препаратов.

Для количественной характеристики элиситорной активности олигосахаридных конъюгатов исследовали содержание фенольных соединений в клеточных стенках гипокотилей огурца с использованием ВЭЖХ анализа (см. электронное приложение).

Сегменты этиолированных гипокотилей огурца инкубировали в течение 20 ч в растворах тестируемых олигосахаридов в концентрации 50 мкг/мл. Фенольные соединения выделяли путем щелочного гидролиза клеточных стенок с последующим анализом монофенолов методом обращенно-фазовой ВЭЖХ. Хроматографический анализ образцов выявил наличие двух доминирующих компонентов, содержание которых изменялось под воздействием исследуемых олигосахаридных препаратов. Идентификацию и количественное определение кофейной и *n*-кумаровой кислот осуществляли методом внешнего стандарта, по абсолютному времени удерживания пиков. Количественный анализ содержания минорных компонентов проводили с использованием кофейной кислоты в качестве внешнего стандарта.

Анализ полученных данных показал, что как в контрольных, так и в опытных образцах доминирующим компонентом среди монофенолов оказалась кофейная кислота. На ее долю приходилось до 45.4% суммарной площади всех пиков образца. Также щелочные экстракты содержали значимые количества *p*-кумаровой кислоты, которая составляла до 11.5% суммарной площади пиков. Следует отметить, что полученный нами спектр отличался от ранее описанного в литературе спектра фенольных соединений клеточных стенок гипокотилей огурца с доминированием *n*-гидроксibenзальдегида, *n*-гидроксibenзойной и *n*-кумаровой кислот [21]. Данные различия могут определяться особенностями биосинтеза фенольных метаболитов и полимеров в этиолированных и зеленых тканях растений [22].

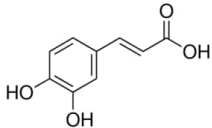
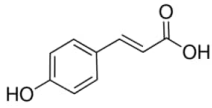
Таким образом, анализ спектра монофенолов, образующихся в тканях этиолированных гипокотилей под воздействием препаратов олигосахаридов, показал увеличение общего содержания фенольных соединений, причем это увеличение происходило за счет неравномерного накопления отдельных компонентов.

В таблице приведены значения как абсолютного содержания компонентов в пересчете на 100 мг сырой биомассы, так и относительное процентное содержание фенольных компонентов.

Абсолютное содержание каждого компонента представлено по данным внешнего стандарта. Значения относительного содержания монофенолов в образцах отражают качественный компонентный состав фенольных соединений клеточных стенок этиолированных проростков огурца. Как следует из таблицы, соотношение относительного процентного содержания кофейной и *n*-кумаровой кислот в контрольных и опытных образцах отличается незначительно, что говорит о скоординированном характере биосинтеза основных фенольных соединений в контроле и под воздействием нативных и легированных олигосахаридов. Отмечается уменьшение процентной доли минорных компонентов, синтезируемых *de novo* под воздействием препаратов олигосахаридов. Причиной наблюдаемых количественных различий могут быть различия состава фенольных кислот в разных тканях гипокотилей огурца, что видно на примере распределения лигнизации в образцах (рис. 2).

Нативные олигосахариды пектина вызывали увеличение относительного содержания доминирующих компонентов соответственно в 1.97 раза для кофейной и 2.52 для *n*-кумаровой кислот по сравнению с контролем (рис. 3). Общее содержание фенольных соединений в тестовых образцах, инкубированных с дезтеифицированными олигосахаридами, превышало значение контроля в 1.64 раза.

Содержание фенольных компонентов в клеточных стенках гипокотилей огурца, инкубированных с водой (контроль), пектиновыми олигосахаридами и пектиновыми олигосахаридами, модифицированными глюкозамином

| Компонент | Доля компонента в общем содержании монофенолов, соотношение площадей пиков, % | | | Абсолютное содержание компонента, нг/100 мг сырой массы | | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|----------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|---------------------------------|----------------------------------------------------|
| | Контроль | Олигосахариды пектина 50 мкг/мл | Олигосахариды модифицированного пектина, 50 мкг/мл | Контроль | Олигосахариды пектина 50 мкг/мл | Олигосахариды модифицированного пектина, 50 мкг/мл |
|  Кофейная кислота | 31.40 | 37.08 | 45.41 | 78.10±3.41 | 153.90±16.17 | 197.15±6.17 |
|  <i>n</i> -кумаровая кислота | 7.31 | 10.80 | 11.45 | 9.40±1.32 | 23.19±0.47 | 25.70±0.27 |
| Минорные компоненты | 61.37 | 52.12 | 43.14 | 152.64±29.51 | 216.36±71.44 | 187.24±23.17 |
| Сумма | 100.08 | 100.00 | 100.00 | 240.14±35.18 | 393.45±88.51 | 410.09±26.63 |

Примечание. Представлены средние значения из трех независимых определений и их стандартные отклонения.

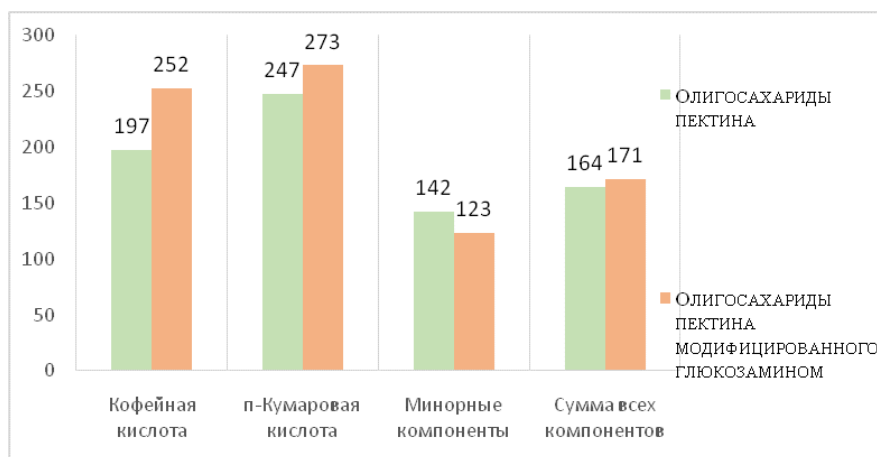


Рис. 3. Изменение содержания фенольных компонентов в клеточных стенках тканей гипокотилей огурца, под воздействием пектиновых олигосахаридов (% от контроля)

Модифицированные олигосахариды вызывали более существенное накопление основных компонентов и общего содержания фенольных соединений в тканях растения. Под действием модифицированных олигосахаридов происходило увеличение содержания кофейной кислоты в среднем в 2.52 раза, а *n*-кумаровой в 2.73 раза по сравнению с контрольными образцами, что превышает уровень индукции под воздействием немодифицированных олигосахаридов на 55 и 26% соответственно (рис. 3). Общее содержание фенольных соединений было выше на 17%. Выявленные изменения активности олигосахаридных препаратов значительно превышают молярную долю глюкозамина (3.8%) в структуре модифицированного пектинового полисахарида.

Одной из причин наблюдаемого различия активности олигосахаридных препаратов может быть не только появление в структуре поли- и олигосахаридов глюкозамина, но и изменение характера ферментолита пектиновых образцов с иным распределением степени полимеризации олигосахаридных продуктов [23]. При этом олигомеры пектина с различной степенью полимеризации способны индуцировать различные физиологические реакции растений. Так, короткие олигосахариды со степенью полимеризации 2–4 n стимулируют биосинтез этилена, регулируя процесс созревания плодов [24], в то время как олигомеры со степенью полимеризации 7–12 n являются индукторами биосинтеза вторичных метаболитов и защитных ферментов – хитиназы, β -1,3 глюканазы и др. [25].

Выводы

Нами показано, что частичная модификация карбоксильных групп пектиновых олигосахаридов глюкозамином, в отличие от природной этерификации, повышает их удельную активность в отношении селективной индукции образования фенилпропаноидов в клеточной стенке растений. Важно отметить, что предложенный вариант модификации позволяет получать полисахариды с регулируемым содержанием вводимого лиганда. Реакция конденсации с образованием химически стойкой амидной связи позволяет эффективно легировать пектиновые полисахариды и их фрагменты, что является перспективным для получения биоактивных гликоконъюгатов.

Биосинтез фенилпропаноидов является важной частью системы биохимических реакций, регулирующих функциональную активность тканей, дифференцировку клеток, а также защиту растений от атаки патогенов. Мы полагаем, что полученные олигосахаридные конъюгаты могут найти применение в качестве препаратов, регулирующих биосинтетическую активность культур *in vitro*, рост и развитие растений, и повышающих их устойчивость к болезням.

Дополнительная информация

В электронном приложении к статье (DOI: <http://www.doi.org/10.14258/jcprm.20250213544s>) приведен дополнительный экспериментальный материал, раскрывающий основные положения, изложенные в статье.

Благодарности

В работе использовано оборудование центра коллективного пользования «Симбиоз» (ЦКП «Симбиоз») Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, г. Саратов.

Финансирование

Работа выполнена в рамках государственного задания Минобрнауки РФ для Федерального исследовательского центра «Саратовский научный центр РАН», тема НИОКТР № 124020100145-2.

Конфликт интересов

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Открытый доступ

Эта статья распространяется на условиях международной лицензии Creative Commons Attribution 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), которая разрешает неограниченное использование, распространение и воспроизведение на любом носителе при условии, что вы дадите соответствующие ссылки на автора(ов) и источник и предоставите ссылку на Лицензию Creative Commons и укажете, были ли внесены изменения.

Список литературы

1. Mandal S.M., Chakraborty D., Dey S. Phenolic acids act as signaling molecules in plant-microbe symbioses // Plant signaling & behavior. 2010. Vol. 5, no. 4. Pp. 359–368. <https://doi.org/10.4161/psb.5.4.10871>.
2. Van Loon L.C. Systemic Induced Resistance // Mechanisms of Resistance to Plant Diseases. Dordrecht: Springer, 2000. Pp. 521–574. https://doi.org/10.1007/978-94-011-3937-3_13.

3. Weng J.-K., Chapple C. The origin and evolution of lignin biosynthesis // *New Phytologist*. 2010. Vol. 187, no. 2. Pp. 273–285. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03327.x>.
4. Baxter H.L., Stewart Jr C.N. Effects of altered lignin biosynthesis on phenylpropanoid metabolism and plant stress // *Biofuels*. 2013. Vol. 4, no. 6. Pp. 635–650. <https://doi.org/10.4155/bfs.13.56>.
5. Karaki N., Aljawish A., Muniglia L., Bouguet-Bonnet S., Leclerc S., Paris C., Jasiewicz J., Humeau-Virot C. Functionalization of pectin with laccase-mediated oxidation products of ferulic acid // *Enzyme and Microbial Technology*. 2017. Vol. 104. Pp. 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.enzmtec.2017.05.001>.
6. Koike N., Hyakumachi M., Kageyama K., Tsuyumu S., Doke N. Induction of Systemic Resistance in Cucumber against Several Diseases by Plant Growth-promoting Fungi: lignification and Superoxide Generation // *European Journal of Plant Pathology*. 2001. Vol. 107. Pp. 523–533. <https://doi.org/10.1023/A:10112038268057>.
7. Cabrera J.-C., Boland A., Cambier P., Frettinger P., Van Cutsem P. Chitosan oligosaccharides modulate the supramolecular conformation and the biological activity of oligogalacturonides in Arabidopsis // *Glycobiology*. 2010. Vol. 20, no. 6. Pp. 1775–1786. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwq034>.
8. Ridley B.L., O'Neill M.A., Mohnen D.A. Pectins: Structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling // *Phytochemistry*. 2001. Vol. 57. Pp. 929–967. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(01\)00113-3](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(01)00113-3).
9. Jermendi E., Beukema M., van den Berg M.A., de Vos P., Schols H.A. Revealing methyl-esterification patterns of pectins by enzymatic fingerprinting: Beyond the degree of blockiness // *Carbohydrate Polymers*. 2022. Vol. 277. Article 118813. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118813>.
10. O'Neill M.A., Ishii T., Albersheim P., Darvill A.G. Hamnogalacturonan II: Structure and Function of a Borate Cross-Linked Cell Wall Pectic Polysaccharide // *Annual Review of Plant Biology*. 2004. Vol. 55, no. 1. Pp. 109–139. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.55.031903.141750>.
11. Oosterveld A., Beldman G., Schols H.A., Voragen A.G.J. Characterization of arabinose and ferulic acid rich pectic polysaccharides and hemicelluloses from sugar beet pulp // *Carbohydrate Research*. 2000. Vol. 328, no. 2. Pp. 185–197. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(00\)00095-1](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(00)00095-1).
12. Scott R.W. Colorimetric Determination of Hexuronic Acids in plant Materials // *Anal. Chem.* 1979. Vol. 51. Pp. 936–941. <https://doi.org/10.1021/ac50043a036>.
13. Ralet M.-C., Dronnet V., Buchhol H.C., Thibault J.-F. Enzymatically and chemically de-esterified lime pectins: characterisation, polyelectrolyte behaviour and calcium binding properties // *Carbohydr. Res.* 2001. Vol. 336. Pp. 117–125. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(01\)00248-8](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(01)00248-8).
14. Robertsen B. Do galacturonic acid oligomers have a role in the resistance mechanism of cucumber towards *Cladosporium cucumerinum* // *Biology and molecular biology of plant-pathogen interactions*. Berlin: Springer-Verlag, 1986. Pp. 177–183. https://doi.org/10.1007/978-3-642-82849-2_14.
15. Hoare D.G., Koshland D.E. A Method for the Quantitative Modification and Estimation of Carboxylic Acid Groups in Proteins // *J. Biol. Chem.* 1967. Vol. 242. Pp. 2447–2453. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)95981-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)95981-8).
16. Герцюк М.Н., Сергеев В.Н., Цытович А.В., Долинная Н.Г., Кухарь В.П. Синтез и реакционная способность новых водорастворимых карбодимидов // *Биоорганическая химия*. 1990. Т. 16. С. 1268–1276.
17. Wissink M.J.B., Beernink R., Pieper J.S., Poot A.A., Engbers G.H.M., Beugeling T., van Aken, W.G., Feijen J. Immobilization of heparin to EDC/NHS-crosslinked collagen. Characterization and in vitro evaluation // *Biomaterials*. 2001. Vol. 22. Pp. 151–163. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(00\)00164-2](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(00)00164-2).
18. Hermanson G. Bioconjugate techniques. 2nd Edition. Rockford, Illinois, USA: Elsevier, 2008. Pp. 215–219.
19. Limberg G., Korner R., Buchholt H.C., Christensen T.M.I.E., Roepstorff P., Mikkelsen J.D. Quantification of the amount of galacturonic acid residues in blocksequences in pectin homogalacturonan by enzymatic fingerprinting with exo- and endo-polygalacturonase II from *Aspergillus niger* // *Carbohydr. Res.* 2000. Vol. 327. Pp. 321–332. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(00\)00068-9](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(00)00068-9).
20. Rivero R.M., Ruiz J.M., Garcia P.C., Lopez-Lefebvre L.R., Sanchez E., Romero L. Resistance to cold and heat stress: accumulation of phenolic compounds in tomato and watermelon plants // *Plant Science*. 2001. Vol. 160. Pp. 315–321. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(00\)00395-2](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(00)00395-2).
21. Siegrist J., Jeblick W., Kauss H. Defense responses in infected and elicited cucumber (*Cucumis sativus* L.) hypocotyl segments exhibiting acquired resistance // *Plant Physiol.* 1994. Vol. 105. Pp. 1365–1374. <https://doi.org/10.1104/pp.105.4.1365>.
22. Graham M.Y., Graham T.L. Rapid Accumulation of Anionic Peroxidases and Phenolic Polymers in Soybean Cotyledon Tissues following Treatment with *Phytophthora megasperma* f. sp. *Glycinea* Wall Glucan // *Plant Physiol.* 1991. Vol. 97. Pp. 1445–1455. <https://doi.org/10.1104/pp.97.4.1445>.
23. Селиванов Н.Ю., Сорокина И.В., Селиванова О.Г., Соколов О.И., Игнатов В.В. Исследование деградации пектиновых полисахаридов в условиях ограниченного ферментализа // *Биохимия*. 2008. Т. 73. С. 98–106. <https://doi.org/10.1007/s10541-008-1012-2>.
24. Campbell A.D., Labavitch J.M. Induction and Regulation of Ethylene Biosynthesis and Ripening by Pectic Oligomers in Tomato Pericarp Discs // *Plant Physiol.* 1991. Vol. 97. Pp. 706–713. <https://doi.org/10.1104/pp.97.2.706>.
25. Spiro M.D., Ridley B.L., Eberhard S., Kates K.A., Mathieu Y., O'Neill M.A., Mohnen D., Guern J., Darvill A., Albersheim P. Biological Activity of the Reducing-end-Derivatized Oligogalacturonides in Tobacco Tissue Cultures // *Plant Physiol.* 1998. Vol. 116. Pp. 1289–1298. <https://doi.org/10.1104/pp.116.4.1289>.

Поступила в редакцию 18 сентября 2023 г.

После переработки 13 февраля 2025 г.

Принята к публикации 9 апреля 2025 г.

Selivanov N.Yu.*, Selivanova O.G., Galitskaya A.A., Matora L.Yu. ACCUMULATION OF LIGNIN AND PHENOLIC ACIDS IN THE CELL WALL OF CUCUMBER HYPOCOTYLS UNDER THE INFLUENCE OF PECTIN OLIGOSACCHARIDES

Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Saratov Scientific Centre of the Russian Academy of Sciences, Entuziastov av., 13, Saratov, 410049, Russia, selivanovn64@yandex.ru

The effectiveness of the use of citrus pectin fermentolysis products to stimulate the manifestations of phytoimmunity and resistance to abiotic stresses has been demonstrated. It has been shown that treatment with oligosaccharides of deesterified citrus pectin (polygalacturonic acid, PGA) induces the synthesis of lignin and an increase in the content of phenolic acids in the cell walls of cucumber hypocotyls (*Cucumis sativus*). It was found that modification of PGK by glucosamine residues increases the activity of its fermentolysis products and leads to a 10% increase in the total content of phenolic compounds in the cell walls of cucumber hypocotyls compared with the results of processing plants with fragments of unmodified PGK. At the same time, the absolute content of the dominant phenolic components – caffeic and p-coumaric acids increases by 55% and 27%, respectively, and the spectrum of minor components of phenolic acids in the cell wall of etiolated cucumber hypocotyls also changes. The modification variant proposed in the work allows to obtain polysaccharides with a regulated content of the injected ligand. The condensation reaction with the formation of a chemically resistant amide bond makes it possible to effectively dope carbohydrate polysaccharides and their fragments, which increases the possibility of obtaining bioactive glycoconjugates for use as inducers of resistance to abiotic stresses and diseases that localize infection during plant infection.

Keywords: *Cucumis sativus*, pectin, oligosaccharides, biological activity, phenolic acids.

For citing: Selivanov N.Yu., Selivanova O.G., Galitskaya A.A., Matora L.Yu. *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya*, 2025, no. 2, pp. 93–102. (in Russ.). <https://doi.org/10.14258/jcprm.20250213544>.

References

1. Mandal S.M., Chakraborty D., Dey S. *Plant signaling & behavior*, 2010, vol. 5, no. 4, pp. 359–368. <https://doi.org/10.4161/psb.5.4.10871>.
2. Van Loon L.C. *Mechanisms of Resistance to Plant Diseases*. Dordrecht: Springer, 2000, pp. 521–574. https://doi.org/10.1007/978-94-011-3937-3_13.
3. Weng J.-K., Chapple C. *New Phytologist*, 2010, vol. 187, no. 2, pp. 273–285. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03327.x>.
4. Baxter H.L., Stewart Jr C.N. *Biofuels*, 2013, vol. 4, no. 6, pp. 635–650. <https://doi.org/10.4155/bfs.13.56>.
5. Karaki N., Aljawish A., Muniglia L., Bouguet-Bonnet S., Leclerc S., Paris C., Jasiewicz J., Humeau-Virot C. *Enzyme and Microbial Technology*, 2017, vol. 104, pp. 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.enzmtec.2017.05.001>.
6. Koike N., Hyakumachi M., Kageyama K., Tsuyumu S., Doke N. *European Journal of Plant Pathology*, 2001, vol. 107, pp. 523–533. <https://doi.org/10.1023/A:10112038268057>.
7. Cabrera J.-C., Boland A., Cambier P., Frettinger P., Van Cutsem P. *Glycobiology*, 2010, vol. 20, no. 6, pp. 1775–1786. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwq034>.
8. Ridley B.L., O'Neill M.A., Mohnen D.A. *Phytochemistry*, 2001, vol. 57, pp. 929–967. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(01\)00113-3](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(01)00113-3).
9. Jermendi E., Beukema M., van den Berg M.A., de Vos P., Schols H.A. *Carbohydrate Polymers*, 2022, vol. 277, article 118813. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118813>.
10. O'Neill M.A., Ishii T., Albersheim P., Darvill A.G. *Annual Review of Plant Biology*, 2004, vol. 55, no. 1, pp. 109–139. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.55.031903.141750>.
11. Oosterveld A., Beldman G., Schols H.A., Voragen A.G.J. *Carbohydrate Research*, 2000, vol. 328, no. 2, pp. 185–197. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(00\)00095-1](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(00)00095-1).
12. Scott R.W. *Anal. Chem.*, 1979, vol. 51, pp. 936–941. <https://doi.org/10.1021/ac50043a036>.
13. Ralet M.-C., Dronnet V., Buchhol H.C., Thibault J.-F. *Carbohydr. Res.*, 2001, vol. 336, pp. 117–125. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(01\)00248-8](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(01)00248-8).
14. Roberts B. *Biology and molecular biology of plant-pathogen interactions*. Berlin: Springer-Verlag, 1986, pp. 177–183. https://doi.org/10.1007/978-3-642-82849-2_14.
15. Hoare D.G., Koshland D.E. *J. Biol. Chem.*, 1967, vol. 242, pp. 2447–2453. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)95981-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)95981-8).
16. Gertsyuk M.N., Sergeyev V.N., Tsytovich A.V., Dolinnaya N.G., Kukhar' V.P. *Bioorganicheskaya khimiya*, 1990, vol. 16, pp. 1268–1276. (in Russ.).
17. Wissink M.J.B., Beernink R., Pieper J.S., Poot A.A., Engbers G.H.M., Beugeling T., van Aken, W.G., Feijen J. *Bio-materials*, 2001, vol. 22, pp. 151–163. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(00\)00164-2](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(00)00164-2).
18. Hermanson G. *Bioconjugate techniques. 2nd Edition*. Rockford, Illinois, USA: Elsevier, 2008, pp. 215–219.
19. Limberg G., Korner R., Buchholt H.C., Christensen T.M.I.E., Roepstorff P., Mikkelsen J.D. *Carbohydr. Res.*, 2000, vol. 327, pp. 321–332. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(00\)00068-9](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(00)00068-9).
20. Rivero R.M., Ruiz J.M., Garcia P.C., Lopez-Lefebvre L.R., Sanchez E., Romero L. *Plant Science*, 2001, vol. 160, pp. 315–321. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(00\)00395-2](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(00)00395-2).
21. Siegrist J., Jeblick W., Kauss H. *Plant Physiol.*, 1994, vol. 105, pp. 1365–1374. <https://doi.org/10.1104/pp.105.4.1365>.
22. Graham M.Y., Graham T.L. *Plant Physiol.*, 1991, vol. 97, pp. 1445–1455. <https://doi.org/10.1104/pp.97.4.1445>.

* Corresponding author.

23. Selivanov N.Yu., Sorokina I.V., Selivanova O.G., Sokolov O.I., Ignatov V.V. *Biokhimiya*, 2008, vol. 73, pp. 98–106. <https://doi.org/10.1007/s10541-008-1012-2>. (in Russ.).
24. Campbell A.D., Labavitch J.M. *Plant Physiol.*, 1991, vol. 97, pp. 706–713. <https://doi.org/10.1104/pp.97.2.706>.
25. Spiro M.D., Ridley B.L., Eberhard S., Kates K.A., Mathieu Y., O'Neill M.A., Mohnen D., Guern J., Darvill A., Albersheim P. *Plant Physiol.*, 1998, vol. 116, pp. 1289–1298. <https://doi.org/10.1104/pp.116.4.1289>.

Received September 18, 2023

Revised February 13, 2025

Accepted April 9, 2025

Сведения об авторах

Селиванов Николай Юрьевич – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории иммунохимии, selivanovn64@yandex.ru

Селиванова Ольга Геннадьевна – кандидат биологических наук, ученый секретарь, selivanova_og@mail.ru

Галицкая Анна Алексеевна – кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории иммунохимии, ann.gal@mail.ru

Матора Лариса Юрьевна – доктор биологических наук, профессор, заведующая лабораторией иммунохимии, matora-l@ibppm.ru

Information about authors

Selivanov Nikolay Yuryevich – candidate of biological sciences, senior researcher of the immunochemistry laboratory, selivanovn64@yandex.ru

Selivanova Olga Gennadyevna – candidate of biological sciences, scientific secretary, selivanova_og@mail.ru

Galitskaya Anna Alekseevna – candidate of biological sciences, researcher of the immunochemistry laboratory, ann.gal@mail.ru

Matora Larisa Yuryevna – doctor of biological sciences, professor, head of the immunochemistry laboratory, matora-l@ibppm.ru