

КОЗЛОВА Людмила Валерьевна

**Глюкан со смешанным типом связей и глюкуроноарабиноксилан
в ходе роста корней и coleoptилей кукурузы (*Zea mays* L.)**

03.01.05 – физиология и биохимия растений

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

КАЗАНЬ 2012

Работа выполнена в лаборатории механизмов роста растительных клеток Федерального государственного бюджетного учреждения науки Казанского института биохимии и биофизики Казанского научного центра Российской академии наук (КИББ КазНЦ РАН)

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор
заведующий лабораторией
КИББ КазНЦ РАН, г. Казань
Татьяна Анатольевна Горшкова

Официальные оппоненты: доктор биологических наук
ведущий научный сотрудник
ИФР РАН, г. Москва
Галина Викторовна Новикова

доктор биологических наук
заведующий лабораторией
КИББ КазНЦ РАН, г. Казань
Фарида Вилевна Минибаева

Ведущая организация: Санкт-Петербургский государственный
университет, г. Санкт-Петербург

Защита состоится «17» апреля 2012 г. в 11⁰⁰ часов на заседании диссертационного совета Д 002.005.01 по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки КИББ КазНЦ РАН по адресу: 420111, г. Казань, ул. Лобачевского, 2/31, а/я №30, тел/факс (843)2927347.

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной библиотеке КазНЦ РАН.

Автореферат разослан «16» марта 2012 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук



Анна Борисовна Иванова

ВВЕДЕНИЕ

Постановка проблемы и ее актуальность. Рост растяжением – основополагающая особенность растительных организмов. J.A. Lockhart (1965) одним из первых описал этот процесс посредством физических переменных. Согласно его уравнению скорость роста растяжением определяется гидростатическим давлением внутри клетки и свойствами ее клеточной стенки. В настоящее время на основе этого уравнения создано множество других, учитывающих факты, не принятые во внимание при создании первоначального варианта, и с большой точностью описывающих поведение растущих клеток (Geitman, 2010). Тем не менее ключевыми детерминантами роста растяжением в каждом из них остаются, по-прежнему, тургор клетки и способность клеточной стенки к растяжению. В течение долгого времени именно тургор считался определяющим рост клеток. Однако в настоящий момент ключевой детерминантой этого процесса принято считать свойства клеточных стенок (Kroeger et al., 2011).

Клеточная стенка растущей клетки представлена несколькими слоями микрофибрилл целлюлозы, погруженных в матрикс, состоящий из гемицеллюлоз и пектиновых веществ. Различают два типа клеточных стенок: тип I, характерный, в основном, для двудольных, где преобладающей гемицеллюлозой служит ксилоглюкан и значительна доля пектиновых веществ, и тип II, имеющийся, в основном, у злаков, в котором гемицеллюлозы представлены глюканом со смешанным типом связей и глюкуроноарабиноксиланом, а ксилоглюкан и пектиновые вещества почти отсутствуют (Gibeaut, Carpita, 1993). Суть процесса растяжения клеточной стенки заключается в модификации сети полимеров, представленной микрофибриллами целлюлозы и молекулами гемицеллюлоз. Господствующей теорией относительно механизма этой модификации в настоящее время является экспансиновая, согласно которой небольшие белки экспансины, разрушая водородные связи между микрофибриллами целлюлозы и гемицеллюлозами, позволяют первым скользить друг относительно друга, а клеточным стенкам растягиваться (Cosgrove, 2000). Однако большая часть доказательств этой гипотезы была получена на двудольных растениях, имеющих клеточные стенки I типа. У злаков, клеточные стенки которых принадлежат ко II типу, действие экспансинов фактически не выражено (Шарова, 2007). Этот факт заставляет обратить особое внимание

на данные об изменении характеристик гемицеллюлоз в ходе роста растительных клеток, которые получены как для однодольных (Nishitani, Masuda, 1984; Gibeaut, Carpita, 1991), так и для двудольных (Pauly et al., 2001). Такие изменения могут, вероятно, сказываться на растяжимости клеточных стенок.

Для оценки взаимосвязи между характеристиками гемицеллюлоз и ходом процесса растяжения клеток необходимо детально представлять, что именно происходит с полисахаридами матрикса клеточных стенок, и с какими именно параметрами и стадиями процесса растяжения эти изменения сопряжены. Для этого удобно использовать объект, в котором клетки, имеющие различные параметры роста, отделены друг от друга пространственно. Таким объектом могут служить корни растений, в частности, первичный корень проростка кукурузы; в нём можно дифференцировать относительно крупные зоны, клетки в которых находятся на разных стадиях развития и растут с разной скоростью (Иванов, 1974). Для сопоставления удобно использовать coleoptили этих же проростков, которые характеризуются более низкой относительно корней скоростью роста растяжением (Иванов, 2011).

Цель и задачи исследования. Целью представляемой работы было сопоставление характеристик ключевых полисахаридов матрикса клеточных стенок (глюкана со смешанным типом связей и глюкуроноарабиноксилана) в клетках и органах проростка кукурузы, растущих с разной скоростью.

Были поставлены следующие задачи:

-выявление в проростках кукурузы зон с разной скоростью роста и их характеристика как объектов для исследования изменений полимеров клеточной стенки (скорость роста, ультраструктура клеток, осмотичность клеточного содержимого);

-оценка изменений содержания в клеточных стенках глюкана со смешанным типом связей и глюкуроноарабиноксилана в ходе роста растяжением;

-характеристика локализации глюкана со смешанным типом связей в различных органах проростка кукурузы;

-анализ структур глюкана со смешанным типом связей и глюкуроноарабиноксилана в стенках клеток, растущих с разной скоростью.

Научная новизна работы. Впервые проведено системное исследование, позволившее сопоставить содержание и структуру ключевых полисахаридов матрикса клеточных стенок в клетках, находящихся на разных стадиях роста или растягивающихся с различной скоростью. В корнях и coleoptилях проростков кукурузы показано постепенное

накопление глюкана со смешанным типом связей и глюкуроноарабиноксилана в ходе роста. Иммуноцитохимически установлена локализация глюкана со смешанным типом связей в различных тканях; показано его отсутствие в клетках покоящегося центра. Продемонстрировано сохранение глюкана со смешанным типом связей в первичной клеточной стенке клеток корня после завершения роста растяжением, что ставит под сомнение классическое восприятие этого полисахарида как транзитного полимера, существование которого сопряжено исключительно со стадией растяжения клеток. Обнаружено изменение структуры глюкана со смешанным типом связей, сопровождающее окончание роста растяжением.

Впервые установлено, что инициация растяжения клеток сопровождается изменением структуры глюкуроноарабиноксилана. Впервые в составе этого полимера выявлено несколько типов структур, по ряду свойств сходных с доменами ксилоглюкана двудольных растений. Показано изменение соотношения различных доменов глюкуроноарабиноксилана в ходе роста растяжением. Выявлены параметры структуры полисахаридов матрикса, отличающиеся у клеток, растягивающихся с различной скоростью.

Практическая значимость. Результаты исследований вносят вклад в понимание одного из ключевых процессов жизнедеятельности растительного организма – роста растяжением, а также участия в нем основных полисахаридов матрикса клеточных стенок. Изучение детерминант роста растяжением позволяет вести направленный поиск факторов, регулирующих ход этого процесса. В перспективе подобные работы могут служить основой для прикладных исследований, целью которых станет контроль над интенсивностью роста растений.

Экспериментальные данные и методические приемы, изложенные в работе, могут быть применены в учреждениях сельскохозяйственного, биологического, биотехнологического и технического профилей, занимающихся проблемами гликобиологии и химии углеводов, изучением роста и развития растений, а также при чтении курсов лекций по физиологии и биохимии растений в ВУЗах.

Связь работы с научными программами и собственный вклад автора в исследования. Работа проводилась с 2008 по 2011 гг. в соответствии с планом научных исследований КИББ КазНЦ РАН по теме «Формирование и модификация надмолекулярной структуры растительных клеточных стенок». Исследования автора, как исполнителя данной тематики, поддержаны грантами РФФИ и грантом по программе «Молекулярная и клеточная биология». Научные положения и выводы диссертации базируются на результатах собственных исследований автора.

Апробация работы. Материалы диссертации докладывались лично автором на XII международной конференции по клеточной стенке (г. Порту, Португалия, 2010), российско-индийском симпозиуме по исследованию углеводов (г. Москва, Россия, 2011), IV конференции «Биосинтез клеточных стенок» (г. Авадзи, Япония, 2011), VII съезде Общества физиологов растений России (г. Нижний Новгород, Россия, 2011), IV школе-конференции «Химия и биохимия углеводов» (г. Саратов, Россия, 2011), итоговых конференциях и семинарах КИББ КазНЦ РАН (2010, 2011, 2012).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 8 работ, из них 2 статьи в рецензируемых изданиях.

Структура и объем работы. Диссертация изложена на 147 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, изложения результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Список литературы включает 234 источника, из них 223 зарубежных. В работе представлено 10 таблиц и 31 рисунок.

1. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

1.1. Растительный материал. Объектом исследования служили четырехдневные проростки кукурузы (*Zea mays*, сорт Интеркрас 375), которые выращивали в темноте при 27°C.

Для проведения большинства экспериментов использовали части проростков, разделенных по следующей схеме. Апикальную часть первичных корней после отсечения чехлика разделяли на пять зон: 0-1 мм – меристема, 1-2 мм – начало растяжения, 2-6 мм – растяжение, 6-7 мм – окончание растяжения, 7-11 мм – зона клеток, закончивших растяжение. Из coleoptилей выделяли две зоны: растягивающихся клеток – четыре миллиметра из середины длины coleoptиля, и зону клеток, закончивших растяжение – верхний миллиметр на кончике coleoptиля. Предложенная схема была разработана на основе экспериментов с нанесением чернильных меток на корни и coleoptили для определения относительной скорости роста, оценки возрастания длин клеток метаксилемы в корне, цитологической характеристики паренхимных клеток в исследованных зонах (размеры, ультраструктура), а также данных литературы (Иванов, 1974; Фролов, 2005; Иванов, 2011).

Для анализа глюкуроноарабиноксилана методом ЯМР и выделения клеточных стенок использовали 11 мм отрезки апикальной части первичного корня без чехлика и целые coleoptили, отсеченные на высоте 2-3 мм над coleoptильным узлом, без листьев.

1.2. Иммуноцитохимический анализ. Зоны проростков кукурузы фиксировали по стандартной методике подготовки образцов для иммуноцитохимических и

электронномикроскопических исследований (Salnikov et al., 2008). Распределение глюкана со смешанным типом связей оценивали с помощью конфокальной (микроскоп Axiovert 200M, Carl Zeiss, Германия) и электронной микроскопии (микроскоп Jeol 1200 EX, Jeol, Япония) на полутонких (1 мкм) и тонких (0.5 нм) срезах, соответственно, с использованием моноклонального антитела BGI к (1→3)(1→4)-β-D-глюкану (Biosupplies Australia Pty Ltd, Австралия) (Meikle et al., 1994). В качестве вторичного антитела использовали козье антимышиное антитело, конъюгированное с коллоидным золотом для электронной микроскопии, и конъюгированное с флуорохромом FITC (Sigma-Aldrich, США) – для конфокальной микроскопии.

1.3. Осмометрия. Исследуемые зоны проростков кукурузы замораживали жидким азотом для разрушения мембран и выдавливали клеточный сок. С помощью осмометра Osmomat 030 (Gonotec, Германия) определяли температуру замерзания и соответствующую осмолярность клеточного сока (C_i). Осмотическое давление (π) определяли по формуле $\pi = RTC_i$, где R – газовая постоянная, T – температура среды. В каждую биологическую повторность объединяли отрезки 300 проростков, число биологических повторностей – 4.

1.4. Выделение фрагментов глюкана со смешанным типом связей и глюкуроноарабиноксилана. Поли- и олигосахаридные фрагменты гемицеллюлоз получали по методу Y. Kato и D. Nevins (1984). После фиксации 10-минутным кипячением в 70% этаноле растительный материал растирали в ступке и последовательно отмывали 0.3% NaCl в 10 mM Na-фосфатном буфере (pH 6.5), 3 M LiCl в 10 mM Na-ацетатном буфере (pH 6.8). Суспендировали в воде, нагревали 15 мин на кипящей водяной бане, осаждали, отмывали водой. Удаляли крахмал трехкратной обработкой α-амилазой (Sigma, США), оставшийся материал трижды отмывали тем же буфером.

Для получения фрагментов глюкана со смешанным типом связей материал инкубировали с лихеназой (Megazyme, Ирландия), взятой с избытком из расчета 15 мкг белка на 1 мл суспензии (рис. 1). Гидролиз проводили в 10 mM Na-фосфатном буфере (pH 6.5) при 40°C в течение 24 часов. Фермент инактивировали кипячением. Негидролизированный материал осаждали центрифугированием (10000g×10мин), супернатант концентрировали высушиванием в токе воздуха при 60°C. Обработку лихеназой повторяли трижды, супернатанты объединяли.

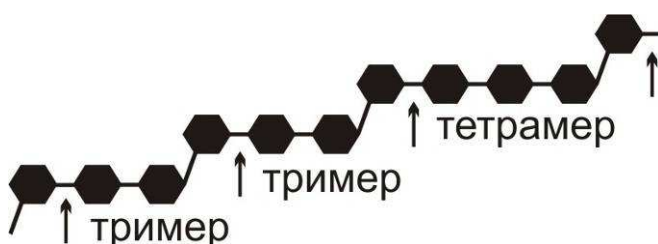
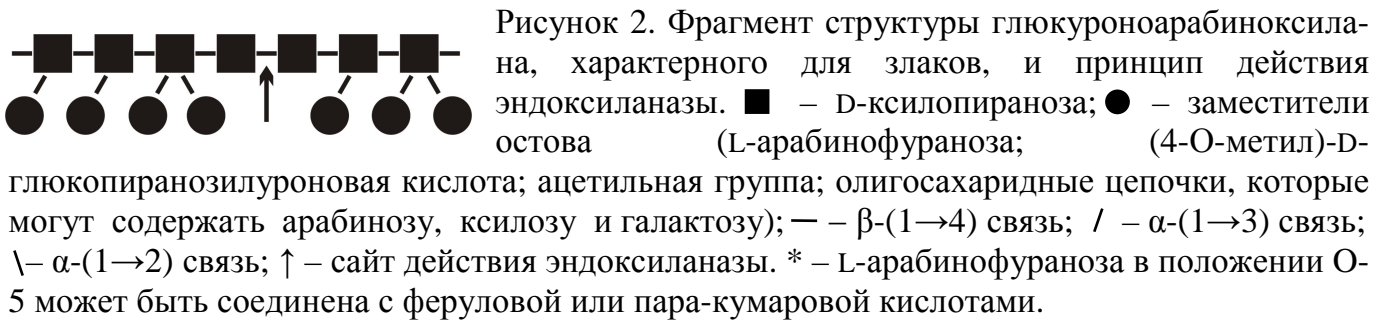


Рисунок 1. Фрагмент структуры глюкана со смешанным типом связей, характерного для злаков, и принцип действия лихеназы. ● – D-глюкопираноза; — — β-(1→4) связь; /– β-(1→3) связь; ↑ – сайт действия лихеназы.

После удаления глюкана со смешанным типом связей для получения фрагментов глюкуроноарабиноксилана растительный материал инкубировали с эндоксилазой (Megazyme, Ирландия), взятой с избытком из расчета 10 мкг белка на 1 мл суспензии (рис. 2). Гидролиз проводили в 10 mM Na-ацетатном буфере (pH 6.5) при 40°C в течение 24 часов. Фермент инактивировали кипячением. Негидролизованный материал осаждали центрифугированием, супернатант концентрировали высушиванием в токе воздуха при 60°C. Обработку эндоксилазой повторяли трижды, супернатанты объединяли. Эксперимент провели в трех повторностях. В одну повторность объединяли отрезки 450 проростков.



Для оценки природы полисахаридов, сохранившихся в клеточных стенках после обработки специфическими эндогликаназами, оставшийся материал гидролизовали до моносахаридов в трифторуксусной кислоте (ТФУ) или проводили экстракцию щелочью по методу S. Fry (1988) для последующего дот-блоттинга.

1.5. Гидролиз углеводов до моносахаридов. Исследуемые образцы гидролизовали в 2M ТФУ из расчета 2.5 мкл кислоты на 1 мкг субстрата при 120°C в течение часа.

1.6. Дот-блоттинг. Раствор углеводов, сохранившихся в клеточных стенках после воздействия эндогликаназ, полученный с применением щелочи, нейтрализовали и обессоливали, затем в нескольких разведениях наносили на нитроцеллюлозные мембраны. После высушивания и обработки 3% сухим молоком мембраны инкубировали в растворе с первичными антителами (BGI, специфичное к глюкану со смешанным типом связей; LM15, специфичное к ксилотглюкану; LM11, специфичное к ксиланам). Отмывали в фосфатно-солевом растворе, затем инкубировали с антимишиным (для BGI) или антикрысиным (для LM11 и LM 15) конъюгатами. Вторым конъюгатом служила стрептавидин-щелочная фосфатаза (Sileks, Россия). Отмывку и проявление мембран проводили по инструкции Sileks с использованием субстратов нитро-голубой тетразолий и бром-4-хлоро-3-индолил фосфат.

1.7. Гель-проникающая хроматография. Углеводы, освобожденные из растительного материала в результате действия эндогликаназ, хроматографировали на колонке (10×1000 мм) с гелем TSK-65F (Tosoh Bioscience, Япония). Количество углеводов

в каждой фракции определяли по методу М. Dubois (Dubois et al., 1956). Фракции, содержащие углеводы, объединяли по пикам и высушивали в токе воздуха при 60°C, предварительно обессолив.

1.8. Высокоэффективная анионообменная жидкостная хроматография. Смеси моно- и олигосахаридов анализировали с использованием хроматографической системы DX 500 (Dionex, США), оснащенной пульс-амперометрическим детектором PAD ED 40 (Dionex, США). Для профилирования смесей олигосахаров использовали колонку CarboPac PA-200 (4×250 мм, Dionex, США), для смесей моносахаров применяли колонку CarboPac PA-1 (4×250 мм, Dionex, США).

1.9. Выделение клеточной стенки. Массовую долю клеточной стенки в растительном материале оценивали после ее выделения по методу К.В. Talmadge с соавторами (1973) в трех биологических повторностях.

1.10. ЯМР-спектроскопия. Фрагменты глюкуроноарабиноксилана корней и колеоптилей кукурузы, а также арабиноксилан пшеничной муки (Megazyme, Ирландия) растворяли в D₂O (99.996% D). ¹H ЯМР спектры, а также двумерные COSY-спектры записывали на ЯМР спектрометре Avance III 600 MHz (Bruker, Германия) при 303К. В качестве внутреннего стандарта вносили ацетон-d₆ (2.05 м.д.).

Для статистической обработки данных использовали Microsoft Excel. Достоверность результатов оценивали по t-критерию Стьюдента при уровне доверительной вероятности 0.95. Бары на диаграммах и «±» в таблицах соответствуют стандартной ошибке.

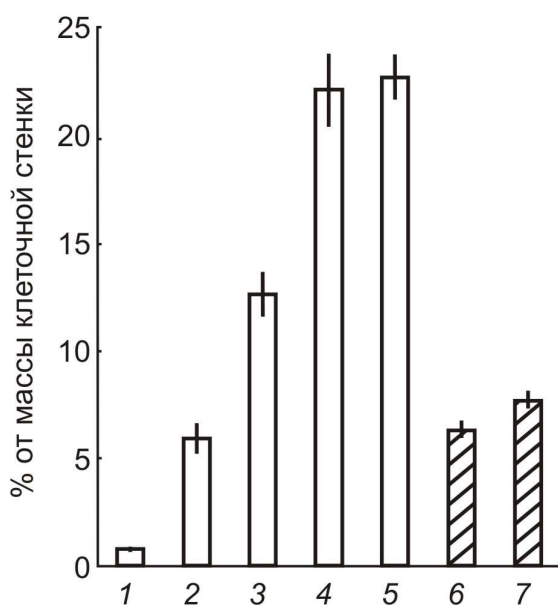
2. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

2.1. Характеристика зон проростка кукурузы, отобранных для анализа

Абсолютная скорость роста первичного корня проростка кукурузы составляла 1.04±0.01 мм/час, колеоптиля – 0.66±0.01 мм/час. Относительная скорость роста клеток корня достигала 66±12%/час, тогда как в колеоптиле ее максимум составлял 16%/час. Достоверных различий между меристематическими и переходящими к растяжению клетками корня (1.06±0.03 МПа и 1.06±0.1 МПа), а также растягивающейся и не растягивающейся областями колеоптиля не было выявлено (0.88±0.05 МПа и 0.83±0.07 МПа, соответственно). Зоны растяжения корней и колеоптилей также характеризовались сходным осмотическим давлением, несмотря на разницу скоростей их роста. Обнаружено снижение осмотического давления по длине корня от меристемы (1.06±0.03 МПа) к зоне клеток, закончивших растяжение (0.68±0.07 МПа). Таким образом, не отмечено таких различий осмотического давления, которые могли бы позволить рассматривать его в качестве фактора, обеспечивающего инициацию и высокие скорости растяжения клеток.

2.2. Содержание глюкана со смешанным типом связей в корнях и coleoptiliaх кукурузы

Содержание исследуемого полисахарида определяли в глюкозном эквиваленте как количество олигомерных производных, полученных в результате действия на растительный материал лихеназы. В корне доля глюкана со смешанным типом связей возрастала с $0.8 \pm 0.14\%$ от массы клеточных стенок в меристеме до $22.6 \pm 1\%$ в зоне окончания растяжения и не снижалась в зоне клеток, закончивших растяжение (рис. 3). Содержание глюкана со смешанным типом связей в обеих исследовавшихся зонах

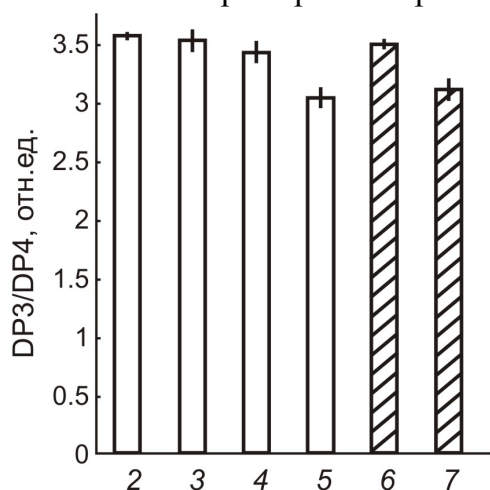


coleoptilia составило около 7% от массы клеточных стенок; его количество в зоне растяжения было достоверно ниже, чем в зоне без растяжения. Растягивающиеся клетки корня характеризовались вдвое большим содержанием глюкана со смешанным типом связей, чем клеточные стенки в зоне растяжения coleoptilia (рис. 3).

Рисунок 3. Содержание глюкана со смешанным типом связей в проростках кукурузы. 1 – меристема, 2 – начало растяжения, 3 – растяжение, 4 – окончание растяжения, 5 – клетки, закончившие растяжение, 6 – растяжение, 7 – клетки, закончившие растяжение. □ – корень, ▨ – coleoptиль.

2.3. Структура глюкана со смешанным типом связей в разных частях проростка кукурузы

В соответствии с принципом действия лихеназы основными олигосахаридами, полученными в результате гидролиза, были β -D-глюкозил-(1→3)-целлобиоза (тример) и β -D-глюкозил-(1→3)-целлотриоза (тетрамер) (рис. 1). Коэффициенты DP3/DP4 (молярное соотношение тримера и тетраметра) для глюканов из зон растяжения корня и coleoptilia



были одинаковыми (рис. 4).

Рисунок 4. Молярные соотношения тримера и тетрамера, полученных в результате гидролиза растительного материала лихеназой. 2 – начало растяжения, 3 – растяжение, 4 – окончание растяжения, 5 – клетки, закончившие растяжение, 6 – растяжение, 7 – клетки, закончившие растяжение. □ – корень, ▨ – coleoptиль. * – количество углеводов, полученных из меристемы корня, было недостаточным для олигосахаридного анализа.

Однако, как в корне, так и в coleoptile растягивающиеся области характеризовались более высоким коэффициентом $DP3/DP4$, чем не растягивающиеся (рис. 4).

2.4. Локализация глюкана со смешанным типом связей в клеточных стенках проростка кукурузы

В корне связывание антитела BGI отмечали уже в меристеме (рис. 5), стенки клеток покоящегося центра антитела не связывали (рис. 5в). В основной части меристемы эпитоп был лучше представлен в периклинальных стенках (рис. 5д), а в антиклинальных практически не выявлялся (рис. 5г), за исключением клеточных стенок, охватывающих потомство одной материнской клетки (рис. 5б).

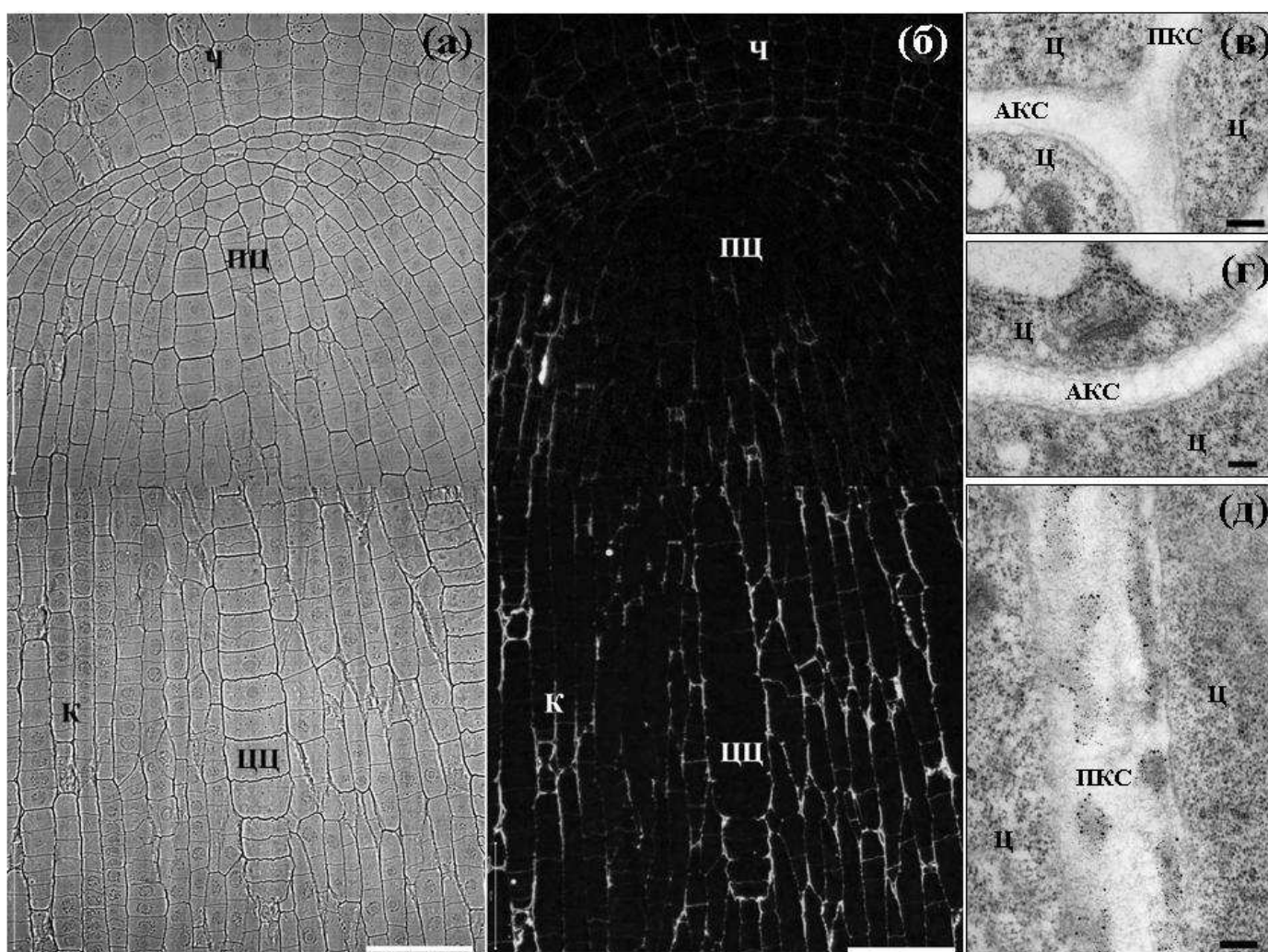


Рисунок 5. Иммуноцитохимическая локализация глюкана со смешанным типом связей (антитело BGI) на продольных срезах меристемы корня кукурузы. Фотографии, демонстрирующие структуру тканей корня (а), флуоресценцию их клеточных стенок (б). Электронные микрофотографии клеточных стенок покоящегося центра (в) и основной части меристемы ((г) и (д)). Ч – чехлик, ПЦ – покоящийся центр, К – кора, ЦЦ – центральный цилиндр, Ц – цитоплазма, АКС – антиклинальная клеточная стенка, ПКС – периклинальная клеточная стенка. Масштабные линии: (а), (б) – 50 мкм; (в), (г), (д) – 0.2 мкм.

Интенсивность связывания антитела BGI с клеточными стенками (как периклиральными, так и антиклинальными) возрастала в зоне начала растяжения (рис. 6).

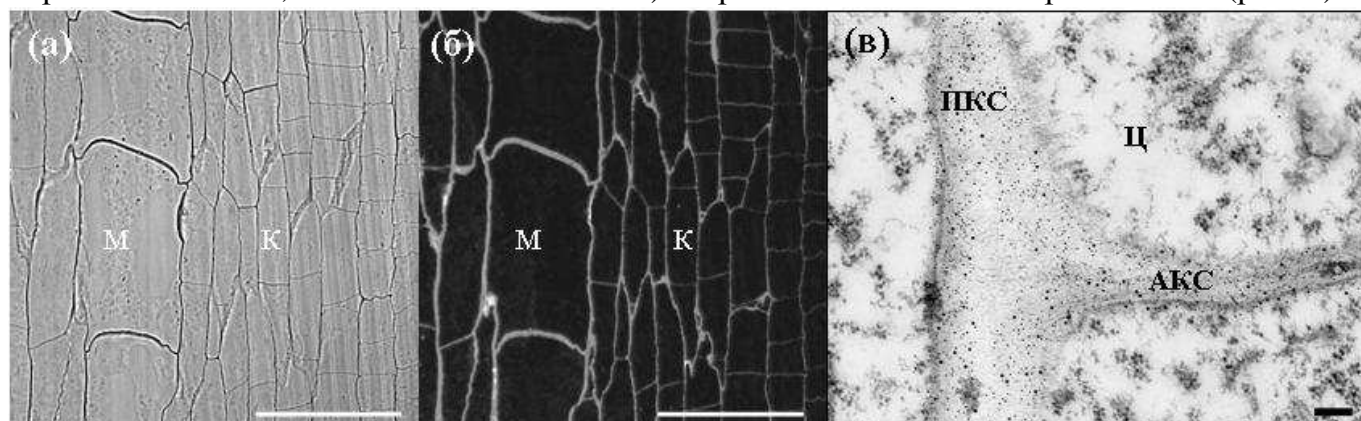


Рисунок 6. Иммуноцитохимическая локализация глюкана со смешанным типом связей (антитело BGI) на продольном срезе зоны начала растяжения корня кукурузы. Фотографии, демонстрирующие структуру тканей корня (а), флуоресценцию их клеточных стенок (б). Электронная микрофотография клеточных стенок коры (в). К – кора, М – метаксилема, Ц – цитоплазма, АКС – антиклинальная клеточная стенка, ПКС – периклиральная клеточная стенка. Масштабные линии: (а) – 50 мкм; (б) – 0.2 мкм.

2.5. Содержание глюкуроноарабиноксилана, извлекаемого при обработке эндоксилазой из различных зон проростка кукурузы

Доля глюкуроноарабиноксилана, извлекаемого при обработке растительного материала эндоксилазой, возрастала от $1.1 \pm 0\%$ от массы клеточных стенок в меристеме до $3.8 \pm 0.4\%$ в зоне окончания растяжения корня и оставалась на том же уровне в зоне клеток, закончивших растяжение (рис. 7). В coleoptiles кукурузы количество углеводов, полученных в результате действия эндоксилазы, составило около 2% от массы клеточных стенок (рис. 7). Различия между анализировавшимися зонами coleoptiles не было достоверным. Количество глюкуроноарабиноксилана в зоне растяжения coleoptiles было достоверно ниже, чем в зоне растяжения корней.

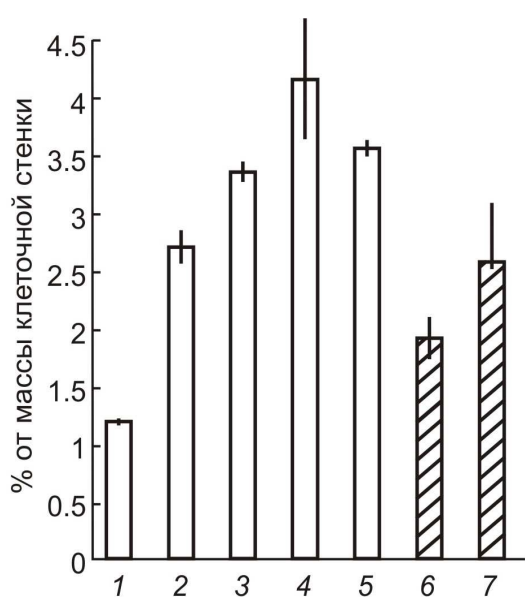


Рисунок 7. Содержание глюкуроноарабиноксилана, извлекаемого из различных зон проростка кукурузы в результате действия эндоксилазы. 1 – меристема, 2 – начало растяжения, 3 – растяжение, 4 – окончание растяжения, 5 – клетки, закончившие растяжение, 6 – растяжение, 7 – клетки, закончившие растяжение. □ – корень, ▨ – coleoptиль.

Моносахаридный состав углеводов, извлеченных в результате действия эндоксилазы, подтвердил специфичность действия выбранного фермента: суммарная

доля арабинозы, ксилозы и глюкуроновой кислоты в корне составляла около 90 моль%, а в колеоптиле – около 80 моль% от всех полученных моносахаридов. Ни одна из фракций, полученных до обработки эндоксилазой, ксилозу не содержала.

Применяемый нами метод позволяет извлечь из состава клеточных стенок только часть полисахарида, доступную для действия специфических эндогликаназ, которую принято называть метаболически активной (Pauly et al., 1999a). В клеточных стенках колеоптилей кукурузы эта доля составляет примерно 20% от всего глюкуроноарабиноксилана (Kato, Nevins, 1984).

Для оценки эффективности извлечения глюкуроноарабиноксилана из клеточных стенок проростка кукурузы был проведен гидролиз в ТФУ материала, оставшегося после обработки специфическими эндогликаназами. По моносахаридному составу было оценено количество ксилозы, оставшейся в клеточной стенке после действия ферментов, затем был вычислен ее процентный выход под действием эндоксилазы (табл. 1).

Таблица 1. Доля ксилозы, извлеченной из клеточной стенки под действием эндоксилазы, % от общего содержания ксилозы

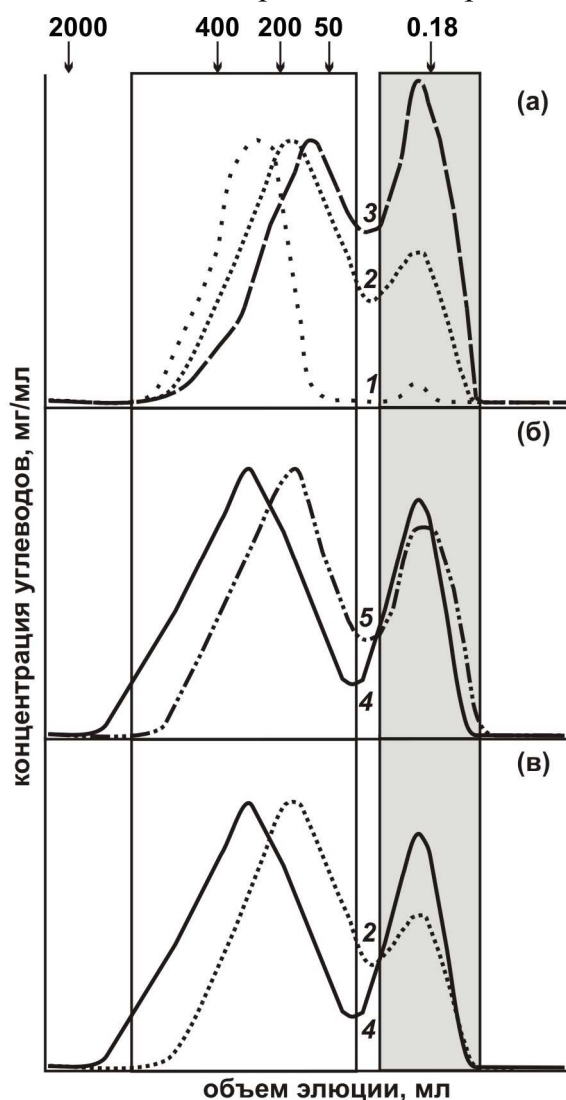
Меристема	Корень				Колеоптиль	
	Начало растяжения	Растяжение	Окончание растяжения	Клетки, закончившие растяжение	Растяжение	Клетки, закончившие растяжение
53±1	47±2	50±1	52±6	43±1	26±1	29±2

2.6. Хроматографический анализ метаболически активной части глюкуроноарабиноксилана клеток, растущих с разной скоростью

Профили элюирования углеводов, полученных из растительного материала, на колонке с гелем Toyopearl TSK-65F всегда содержали два пика (рис. 8). В состав первого пика, обозначенного как высокомолекулярный глюкуроноарабиноксилан, входили фрагменты в диапазоне молекулярных масс от 30 до 400 кД. То есть часть глюкуроноарабиноксилана извлекалась, но не гидролизовалась эндоксилазой. Второй пик, молекулярная масса углеводов в котором составляла менее 10 кД, был обозначен как низкомолекулярный глюкуроноарабиноксилан. Соотношение высоко- и низкомолекулярного пиков отличалось в разных зонах.

Углеводы, извлеченные из меристемы корня кукурузы, были в основном высокомолекулярными (рис. 8а). В последующих зонах корня доля высокомолекулярного пика снижалась и в зоне клеток, закончивших растяжение, составляла только половину от полученных углеводов (рис. 9).

Профили элюирования углеводов, полученных из обеих исследовавшихся зон колеоптиля, были сходны. Доля низкомолекулярного пика в смеси углеводов из зоны растяжения и зоны клеток, закончивших растяжение, составляла 32.0 ± 1.1 и $33.0 \pm 4.0\%$, соответственно (рис. 8б, 9). Сравнение хроматограмм, полученных при гель-фильтрации



углеводов, извлеченных из зон растяжения корня и колеоптиля, приведено на рисунке 8в. Высокомолекулярный пик в колеоптиле шире, а низкомолекулярный выше, чем в зоне растяжения корня. Их относительное содержание различается незначительно: в зоне растяжения корня доля высокомолекулярного пика составляла $71.2 \pm 0.7\%$, в колеоптиле – $67.3 \pm 1.1\%$ от общего выхода (рис. 9).

Рисунок 8. Профили элюирования углеводов, извлеченных из различных зон проростка кукурузы в результате действия эндоксилаказы, полученные при их гель-фильтрации. 1 – меристема, корень; 2 – растяжение, корень; 3 – клетки, закончившие растяжение, корень; 4 – растяжение, колеоптиль; 5 – отсутствие растяжения, колеоптиль. ↓ и цифра над ней – объем элюции для углеводного стандарта и его молекулярный вес (кД). Данные для зон начала и окончания растяжения корня не представлены ввиду их промежуточного характера. Хроматограммы выровнены по высоте высокомолекулярного пика.

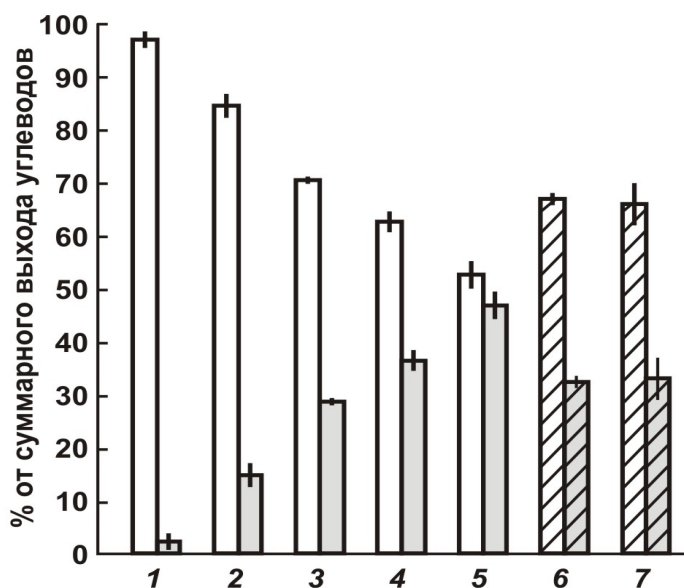


Рисунок 9. Соотношение высоко- и низкомолекулярной фракций глюкоуроноарабиноксилана, полученных из различных зон проростков кукурузы в результате действия эндоксилаказы. □ – высокомолекулярная фракция, корень; ■ – низкомолекулярная фракция, корень; ▨ – высокомолекулярная фракция, колеоптиль; ▩ – низкомолекулярная фракция, колеоптиль. 1 – меристема, 2 – начало растяжения, 3 – растяжение, 4 – окончание растяжения, 5 – клетки, закончившие растяжение, 6 – растяжение, 7 – клетки, закончившие растяжение.

Высокомолекулярный глюкуроноарабиноксилан из различных зон проростка кукурузы отличался по средней молекулярной массе (M_n). По мере растяжения корня было отмечено снижение этого показателя (рис. 8а, 10). Средняя молекулярная масса полисахаридов, полученных из меристемы корня, составляла 137 ± 12 кД. Из зоны окончания растяжения в результате обработки эндоксилаказой были извлечены высокомолекулярные углеводы со средней массой 64 ± 1 кД; аналогичное значение (66 ± 4 кД) было отмечено в зоне клеток, закончивших растяжение (рис. 10).

Высокомолекулярные фрагменты глюкуроноарабиноксилана из зоны растяжения колеоптилей кукурузы характеризовались наибольшей средней молекулярной массой – 148 ± 10 кД, что почти в 2 раза превышало аналогичный показатель для зоны растяжения корня (78 ± 3 кД). Глюкуроноарабиноксилан из зоны колеоптиля, в которой растяжение

отсутствовало, был менее массивен, чем полисахарид из зоны растяжения (108 ± 10 кД), но также превосходил по массе высокомолекулярный глюкуроноарабиноксилан из большинства зон корня (рис. 10).

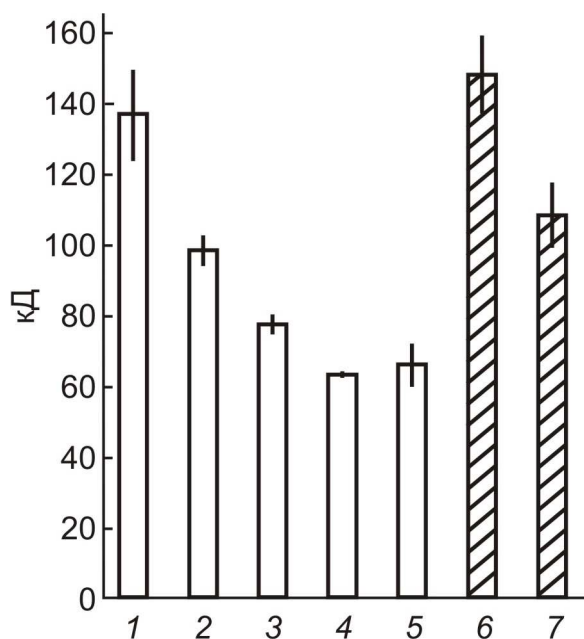


Рисунок 10. Средняя молекулярная масса высокомолекулярного глюкуроноарабиноксилана, извлеченного эндоксилаказой из различных зон проростка кукурузы. 1 – меристема, 2 – начало растяжения, 3 – растяжение, 4 – окончание растяжения, 5 – клетки, закончившие растяжение, 6 – растяжение, 7 – отсутствие растяжения. □ – корень, ▨ – колеоптиль.

2.7. Моносахаридный состав метаболически активного глюкуроноарабиноксилана клеток, растущих с разной скоростью

В составе высокомолекулярного пика, как в корне, так и в колеоптиле доминировали ксилоза, арабиноза и глюкуроновая кислота (табл. 2). Отношение Ara/Xyl в различных зонах корня составляло от 0.69-0.77, без достоверных различий; в колеоптиле этот структурный коэффициент был несколько выше. Низкомолекулярные углеводы характеризовались меньшими значениями Ara/Xyl (табл. 2).

В низкомолекулярном пике углеводов, извлеченных из различных частей проростка кукурузы, «ксилановые» моносахариды (ксилоза, арабиноза, глюкуроновая кислота) также доминировали, хоть и не столь явно. Наиболее широко «нексилановые» моносахариды были представлены в низкомолекулярном пике углеводов, извлеченных из меристемы корня и зоны растяжения колеоптиля (табл. 2).

Таблица 2. Моносахаридный состав углеводов, полученных в результате действия эндоксилаказы на растительный материал, моль%

		Корень					Колеоптиль	
		1	2	3	4	5	6	7
ВМ	Ara+Xyl+GlcA	91.2±1.9	88.4±2	86.5±2.3	86.2±2.3	85.7±1.5	86.4±1.4	81.2±2.2
	Ara/Xyl	0.77±0.08	0.77±0.08	0.69±0.03	0.74±0.03	0.69±0.06	0.82±0.07	0.84±0.07
НМ	Ara+Xyl+GlcA	67.5±1.9	75.9±1.8	85.0±2.0	89.2±2.7	90.6±3.0	54.6±3.1	74.9±2.9
	Ara/Xyl	0.46±0.02	0.44±0	0.36±0.01	0.34±0.02	0.34±0.02	0.40±0.09	0.31±0.01

1 – меристема, 2 – начало растяжения, 3 – растяжение, 4 – окончание растяжения, 5 – клетки, закончившие растяжение, 6 – растяжение, 7 – отсутствие растяжения, ВМ – высокомолекулярный пик, НМ – низкомолекулярный пик

2.8. Различные типы структуры глюкуроноарабиноксилана

Метаболически активная часть полисахаридов матрикса извлекается из клеточных стенок под действием специфических эндогликаназ и поэтому, как правило, после выделения представлена олигосахаридными фрагментами (Kato, Nevins, 1984; Pauly et al., 1999a; 2001a; Козлова с соавт., 2012). Однако в нашем исследовании из клеточных стенок проростков кукурузы были получены, помимо олигосахаридных фрагментов, и полисахариды. Это означает, что в нативном полисахариде клеточных стенок кукурузы присутствуют масштабные области, не поддающиеся гидролизу эндоксилаказой. Они характеризуются высоким соотношением Ara/Xyl и небольшим количеством «нексиановых» моносахаридов в своем составе (табл. 2). Фрагменты глюкуроноарабиноксилана, получаемые в низкомолекулярной форме, очевидно, представляют собой части молекул, доступные для гидролиза использовавшимся ферментом. В них содержится меньше арабинозы, а доля «нексиановых» моносахаридов значительно больше. Два этих типа структур связаны ковалентно гликозидными связями, которые разрушаются под действием эндоксилаказы. То есть низко- и высокомолекулярные углеводы, извлекаемые из клеточных стенок под действием эндоксилаказы, *in vivo* располагаются на одном ксилановом остове.

На ксилоглюкане стеблей гороха было продемонстрировано, что метаболически активная часть полисахарида ковалентно связана с той его частью, которая не экстрагируется в результате работы эндогликаназ, поскольку взаимодействует с микрофибриллами целлюлозы (Pauly et al., 1999a). Если принять во внимание то, что около половины всей ксиланозы в корне и более двух третей в колеоптиле сохраняются после действия эндоксилаказы в клеточных стенках (табл. 1), можно предположить, что глюкуроноарабиноксилан кукурузы имеет в своем составе домен, взаимодействующий с микрофибриллами целлюлозы и, как следствие, не доступный для действия

эндоксилаказы. Дот-блоттинг полисахаридов, сохранившихся в клеточных стенках после действия ферментов, с использованием антител LM11 и LM15 подтвердил, что большая часть ксилозы в них принадлежит ксиланам, тогда как доля ксилозы в составе ксилоглюкана незначительна.

Исходя из известных структурных особенностей ксиланов, способных к взаимодействию с целлюлозой (Kabel et al., 2007; Köhnke et al., 2008) можно предположить, что этот участок молекулы должен содержать минимум семь остатков ксилозы в остове и иметь низкую степень замещения остова арабинозой (порядка 0.1-0.3).

Таким образом, ферментативный способ выделения позволил различить несколько типов структуры глюкуроноарабиноксилана. Полученные данные указывают на то, что каждая молекула полисахарида имеет в своем составе минимум три различных «домена»: 1) устойчивый к действию эндоксилаз, не взаимодействующий с целлюлозой, высокозамещенный глюкуроноарабиноксилан (соответствует высокомолекулярному пику); 2) разрушаемый эндоксилазой, не взаимодействующий с целлюлозой, менее замещенный ксилан (низкомолекулярный пик); 3) не доступный для действия эндоксилаз, по всей видимости, связанный с микрофибриллами целлюлозы глюкуроноарабиноксилан, предположительно крайне низкозамещенный (условно соответствует ксилозе, сохраняющейся в клеточных стенках после применения эндоксилаказы) (рис. 11).

Особенности строения этих трех доменов могут обуславливать их функции: так, высокомолекулярный и высокозамещенный глюкуроноарабиноксилан может препятствовать взаимодействию целлюлозных микрофибрилл между собой, позволяя им скользить друг относительно друга. Этот домен можно назвать «разрыхляющим».

В противоположность этому низкозамещенные арабиноксиланы, как было показано в ряде экспериментов *in vitro*, при ассоциации с целлюлозой увеличивают прочность микрофибрилл и усиливают их взаимодействие друг с другом (Köhnke et al., 2008). Таким образом, ксилоза, не извлекаемая из растительного материала, возможно, находится в составе низкозамещенного, взаимодействующего с целлюлозой домена глюкуроноарабиноксилана, который можно назвать «связующим».

В рамках «доменной» теории доступная для гидролиза часть глюкуроноарабиноксилана может рассматриваться в качестве промежуточной области между «разрыхляющей» и «связующей» частями полисахарида. Степень замещения остова в ней невелика, но достаточна для предотвращения его взаимодействия с целлюлозой (Kabel et al., 2007), однако, не достаточна для того, чтобы сделать этот участок молекулы недоступным для гидролиза эндоксилазами. Этот домен молекулы глюкуроноарабиноксилана был назван «промежуточным».

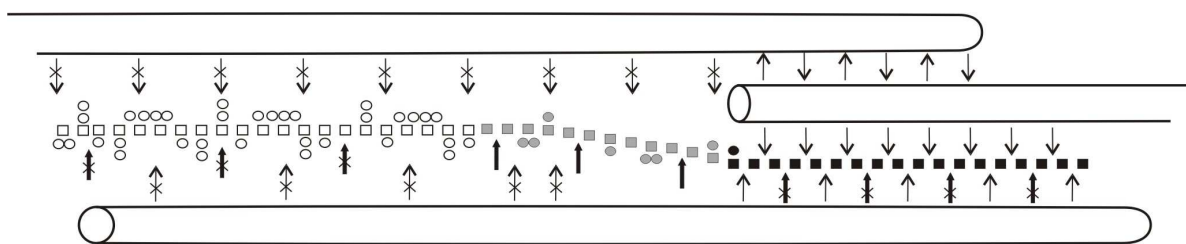
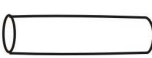









Рисунок 11. Модель доменной структуры молекулы глюкуроноарабиноксилана.  – целлюлозная микрофибрилла;  – «разрыхляющий» домен;  – «промежуточный» домен;  – «связующий» домен;  – гидролиз эндоксилазой возможен;  – гидролиз эндоксилазой не возможен;  – возникновение водородной связи с целлюлозой возможно;  – возникновение водородной связи с целлюлозой не возможно.

2.9. Анализ элементов структуры глюкуроноарабиноксилана проростков кукурузы, устойчивого к гидролизу эндоксилазой

Для оценки общих особенностей структуры глюкуроноарабиноксилана кукурузы, не доступного для действия эндоксилазы, полисахарид выделяли из апикальной части первичного корня, не разделенного на зоны, и целых coleoptiles четырехдневных проростков кукурузы. Высокомолекулярные углеводы, извлеченные из корня и coleoptilia проростков кукурузы, примерно на 90% состояли из «ксилиновых» моносахаридов, коэффициент Ara/Xyl в них составлял 0.74 ± 0.02 и 0.88 ± 0.04 , коэффициенты GlcA/Xyl были равны 0.06 ± 0 и 0.11 ± 0.01 , соответственно. Для сопоставления использовали арабиноксилан пшеничной муки (Megazyme, Ирландия), полностью гидролизуемый эндоксилазой (Ara/Xyl = 0.58 ± 0 ; GlcA/Xyl = 0).

^1H ЯМР спектры высокомолекулярных углеводов корней и coleoptiles кукурузы практически не отличались и были сходны с описанными для арабиноксиланов злаковых (Westerlund et al., 1993; Ebringerová et al., 1994). Сигналы в области 5.10-5.39 м.д. относятся к типичным сигналам аномерных протонов Ara_f. Интенсивный сигнал 5.38 м.д. принадлежит аномерному протону α -L-терминальной Ara_f, связанной с Xyl_r в положении O-3, при отсутствии O-2 замещения арабинозой. Соотнесение протонного спектра по 2D COSY позволило установить сигналы остальных протонов в пределах этого остатка (4.15 (H-2), 3.90 (H-3), 4.25 (H-4), 3.71 и 3.78 (H-5ax/eq) м.д.), а также сигналы H-2 (3.55 м.д.), H-3 (3.64 м.д.), H-4 (3.73 м.д.) и H-5 (3.79 м.д.) ксилозы, монозамещенной арабинозой по O-3. Идентификация остатков согласуется с результатами анализа ЯМР спектров арабиноксиланов, описанных ранее (Hoffmann et al., 1991; Apirattanusorn, 2007).

Интегральные величины сигналов, принадлежащих H-1 α -L-терминальной Ara_f, связанной с Xyl_r в положении O-3 (5.38 м.д.) и H-1 α -L-терминальной Ara_f, связанной по O-3 и O-2 с дизамещенной Xyl_r (два сигнала одинаковой интенсивности в области 5.22 –

5.30 м.д.) (Hoffmann et al., 1991; Vliegenthart et al., 1992; Apirattananusorn, 2007), свидетельствуют, что доля арабинозы, входящей в состав боковых цепей при дизамещении ксилозы, составляет в арабиноксилане пшеничной муки 57%, в высокомолекулярном глюкуроноарабиноксилане корней кукурузы – 27%, в высокомолекулярном глюкуроноарабиноксилане колеоптилей кукурузы – 21%. Сочетание этой информации с моносахаридным составом полимеров позволило определить соотношения замещенной и незамещенной ксилозы в остове (табл. 3), при условии, что вся арабиноза входит в состав боковых цепей не длиннее одного остатка.

Таблица 3. Особенности структуры арабиноксиланов различного происхождения, установленные при сопоставлении моносахаридного состава и данных ЯМР анализа

	Арабиноксилан пшеничной муки	Глюкуроноарабиноксилан корня кукурузы	Глюкуроноарабиноксилан колеоптиля кукурузы
Интегральная величина сигнала A_{raf} (O-3)*	1.5	5.4	7.5
Доля незамещенной арабинозой ксилозы, %	58	36	21
Доля монозамещенной арабинозой ксилозы, %	25	54	70
Доля дизамещенной арабинозой ксилозы, %	17	10	9

* При интегрировании за единицу были взяты сигналы H-1 α -L-терминальной A_{raf} , связанной по O-3 и O-2 с дизамещенной $Xylp$.

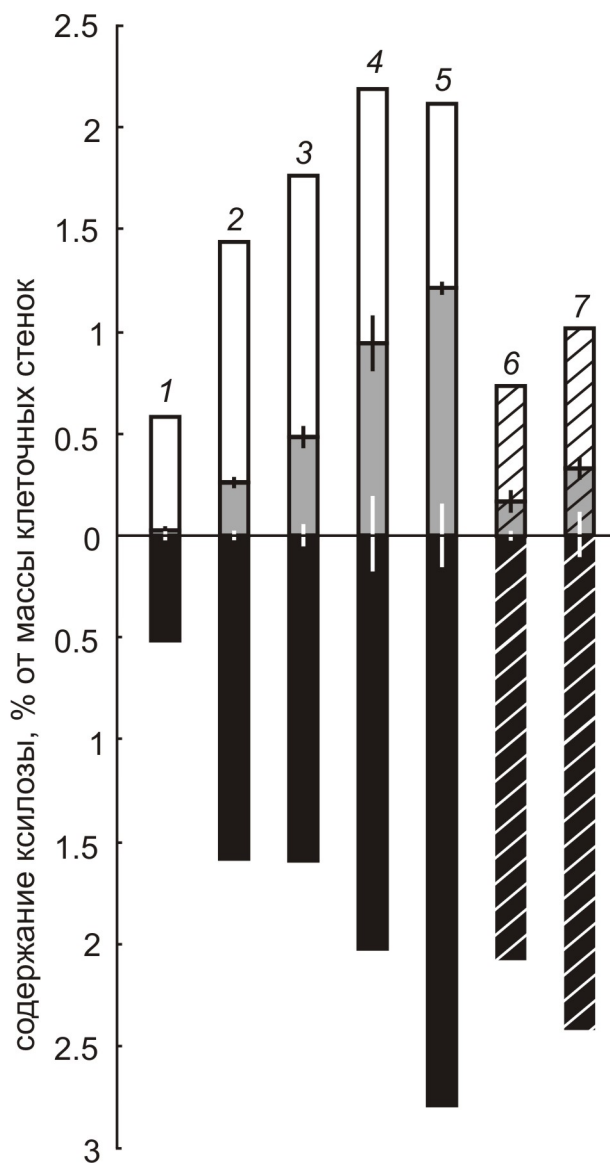
Известно, что для действия эндоксилазаз необходим участок остова ксилана, содержащий минимум два незамещенных остатка ксилозы подряд (Bhat, Hazlewood, 2003). Установленная степень замещения ксилозы глюкуроноарабиноксиланов корней и колеоптилей кукурузы арабинозой (64% и 79%) (табл. 3), а также соотношение GlcA/Xyl (0.06 и 0.11) оставляют возможность наличия сайтов для гидролиза. Устойчивость остова глюкуроноарабиноксилана к действию фермента достигается только в том случае, если незамещенные остатки ксилозы размещены в остове диффузно, чередуясь с замещенными.

Интенсивные сигналы в области 2.15-2.55 м.д., отсутствующие в спектре арабиноксилана пшеничной муки, свидетельствуют о возможном ацетилировании высокомолекулярного глюкуроноарабиноксилана корней кукурузы.

Таким образом, ключевыми особенностями недоступной для гидролиза эндоксилазаз части метаболически активного глюкуроноарабиноксилана, можно считать 1) высокую степень замещения остова полисахарида арабинозой и глюкуроновой кислотой, 2) диффузное распределение остатков незамещенной ксилозы в остове полимера, а также 3) наличие ацетильных групп в структуре остова.

2.10. Изменения соотношения различных доменов глюкоуроарабиноксилана в ходе роста растяжением

В ходе растяжения в клеточных стенках как в корнях, так и в coleoptilyах кукурузы доли ксилозы в составе различных доменов изменялись. В меристеме корня метаболически активная часть глюкоуроарабиноксилана представлена в основном «разрыхляющим» доменом. Доля ксилозы в составе «промежуточного» домена крайне



мала. Содержание метаболически активной части глюкоуроарабиноксилана значительно возрастает при начале растяжения. Если учесть, что возрастает и количество ксилозы, ассоциированной с микрофибриллами целлюлозы, логично предположить, что в клеточную стенку поступают новые порции полисахарида, в то время, как в составе «старых» молекул постепенно начинает доминировать «промежуточная», а затем «связующая» части (рис. 12).

Рисунок 12. Динамика содержания ксилозы в различных доменах глюкоуроарабиноксилана в ходе роста растяжением корня и coleoptilyа кукурузы. □ – «разрыхляющий» домен, корень; ■ – «связующий» домен, корень; ■ – «промежуточный» домен, корень; ▨ – «разрыхляющий» домен, coleoptиль; ▨ – «промежуточный» домен, coleoptиль; ▨ – «связующий» домен, coleoptиль. 1 – меристема, 2 – начало растяжения, 3 – растяжение, 4 – окончание растяжения, 5 – клетки, закончившие растяжение, 6 – растяжение, 7 – клетки, закончившие растяжение.

В ходе всего процесса растяжения количество ксилозы в составе «разрыхляющего» домена глюкоуроарабиноксилана неизменно, однако доля ксилозы в «промежуточном» домене увеличивается (рис. 12). Вероятно, это свидетельствует об активации процесса отщепления боковых цепей глюкоуроарабиноксилана. Неясно, достигается ли это за счет синтеза дополнительных количеств необходимых ферментов или в результате увеличения активности существовавших ранее.

После окончания растяжения корня количество ксилозы в «разрыхляющем» домене достоверно снижается, одновременно продолжая увеличиваться в составе «промежуточного» и «связующего» доменов. Эти факты согласуются с предположением о постепенном переходе молекул глюкуроноарабиноксилана в ассоциированное с микрофибриллами состояние. При сравнении с корнем очевидно, что доля метаболически активного глюкуроноарабиноксилана в клеточных стенках колеоптиля значительно ниже. Количество ксилозы в «разрыхляющем» домене глюкуроноарабиноксилана на пике растяжения примерно в 2 раза ниже, чем в корне. При этом доля ксилозы, извлекаемой только при обработке ТФУ, в колеоптиле сравнима с таковой в корне.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Рост растяжением как характерная особенность растительного организма давно пользуется особым вниманием биологов растений (Иванов, 1974; Cosgrove, 2005; Обручева, 2008; Geitmann, 2010). Если на ранних этапах его изучения превалировала идея о главенствующей роли тургора в инициации и поддержании роста растяжением, то в последнее время основной акцент ставится на свойства клеточной стенки (Kroeger, 2011). В исследованных нами зонах проростка кукурузы не было отмечено резких изменений осмотического давления, которые могли бы свидетельствовать в пользу его участия в инициации роста растяжением или контроле над скоростью этого процесса. Полученные результаты позволяют судить об изменениях полисахаридов матрикса, которые сопровождают инициацию и завершение роста растяжением, а также, возможно, определяют скорость роста.

Инициация растяжения. Сравнивая данные, полученные для меристематической зоны корня и зоны начала растяжения, можно составить представление о процессах, сопутствующих инициации растяжения. При переходе клеток к растяжению в составе их клеточных стенок значительно возрастает доля глюкана со смешанным типом связей (рис. 3) и глюкуроноарабиноксилана (рис. 7), извлекаемых под действием специфических эндогликаназ, то есть так называемая метаболически активная часть. По предположению М. Pauly с соавторами (Pauly et al., 1999a) именно она находится между микрофибриллами целлюлозы, не взаимодействуя с ними. Согласно гипотезе S.D. Thompson (Thompson, 2005), первичная функция гемицеллюлоз состоит не в соединении микрофибрилл целлюлозы друг с другом, а в их разобщении. Возможно, для начала процесса растяжения масса гемицеллюлоз, находящихся между микрофибриллами, должна достигнуть некоего критического значения, которое позволит им скользить друг относительно друга. Это предположение подтверждается тем, что в корне растяжение начинается только после

того, как по всему периметру клеток формируется слой клеточных стенок, содержащий глюкан со смешанным типом связей.

Возрастание доли глюкуроноарабиноксилана в составе клеточных стенок происходит одновременно за счет и «разрыхляющего», и «промежуточного», и «связующего» доменов (рис. 12). Следовательно, в клетках, переходящих к растяжению, идет синтез новых порций полисахарида. Однако инициация растяжения сопровождается значительным снижением (в 1.4 раза) средней молекулярной массы «разрыхляющего» домена (рис. 10). Из этого следует, что, либо новый глюкуроноарабиноксилан уже синтезируется в более доступной для эндоксилаз форме, либо становится таковым под действием ферментов, активность которых возрастает одновременно с инициацией растяжения, например α -L-арабинофуранозидаз. Оценка и модуляция активности таких ферментов могут в дальнейшем позволить сделать выбор из имеющихся предположений.

Различная скорость растяжения. Данные об абсолютной и относительной скоростях роста растяжением подтвердили тот факт, что корни растут быстрее coleoptилей. Оба органа состоят преимущественно из паренхимных клеток, эпидермис и проводящие элементы в которых составляют не более 15% от всех клеток (Обручева, 1965; Carpi et al., 2001; Фролов, 2005). Сравнительная характеристика гемицеллюлоз в зонах наиболее активного роста корня и coleoptиля позволила рассматривать эти полимеры в качестве детерминант роста растяжением.

В клетках, растущих с большей скоростью выше (примерно в 2 раза) содержание и глюкана со смешанным типом связей, и метаболически активного глюкуроноарабиноксилана (рис. 3, 7). При этом доля ксилозы в составе «связующего» домена глюкуроноарабиноксилана у таких клеток существенно ниже (табл. 1, рис. 12). Эти факты прямо соотносятся с функциями, предположенными для различных доменов молекул глюкуроноарабиноксилана (рис. 11).

В составе метаболически активной части глюкуроноарабиноксилана из клеток, растягивающихся с большей скоростью, существенно меньше «нексилановых» моносахаридов (табл. 2). Присутствие «посторонних» моносахаридов в составе углеводов, полученных в результате действия на растительный материал специфических ферментов, как правило, объясняют ковалентными связями полисахаридов-мишеней с другими углеводсодержащими соединениями. Согласно полученным данным, глюкуроноарабиноксилан coleoptилей, возможно, дополнительно закреплен в стенке посредством ковалентных связей с пектиновыми веществами, глюканом со смешанным типом связей или ксилоглюканом, что также может быть причиной ограниченной растяжимости стенок клеток coleoptиля.

Завершение растяжения. Оценку процессов, сопутствующих завершению роста растяжением, можно проводить, сравнивая клетки, находящиеся в зоне растяжения и вышедшие из неё, как в корнях, так и в колеоптилях. Содержание метаболически активной части гемицеллюлоз с окончанием растяжения стабилизировалось (рис. 3, рис. 7). При этом структура глюкана со смешанным типом связей претерпела следующую модификацию: коэффициент DP3/DP4 снизился в корне с 3.56 ± 0.04 до 3.04 ± 0.09 , а в колеоптиле с 3.50 ± 0.03 до 3.10 ± 0.09 (рис. 4). Согласно данным литературы, гели, образуемые такими глюканами, отличаются большей хрупкостью, чем сформированные идентичными по массе полисахаридами, но с DP3/DP4 порядка 3.5 (как на пике растяжения) (Lazaridou et al., 2004; 2007). Возможно, глюкан со смешанным типом связей может увеличивать способность клеточной стенки претерпевать большее по силе растяжение без утраты целостности.

Завершение роста растяжением сопряжено с повышением количества ксилозы в составе «связывающего» домена глюкуроноарабиноксилана (рис. 12), что, вероятно, сказывается на прочности целлюлозно-гемицеллюлозной сети и затрудняет ее дальнейшее растяжение.

Таким образом, содержание, состав и структура полисахаридов матрикса клеточных стенок существенно изменяются на разных этапах роста растяжением, что позволяет отнести эти полимеры к существенным детерминантам параметров роста клеток.

ВЫВОДЫ

1. В клетках проростка кукурузы, растущих с разной скоростью, не отмечено таких различий осмотического давления, которые могли бы позволить рассматривать его в качестве фактора, обеспечивающего инициацию и высокие скорости растяжения клеток.

2. Показано, что инициация роста растяжением сопряжена с резким увеличением количества глюкана со смешанным типом связей и глюкуроноарабиноксилана; содержание этих гемицеллюлоз выше у клеток, растущих с большей скоростью. Это свидетельствует в пользу гипотезы о разрыхляющей роли гемицеллюлоз, согласно которой эти полисахариды увеличивают расстояние между микрофибриллами целлюлозы, позволяя последним эффективнее перемещаться относительно друг друга.

3. Обнаружено, что молекулы глюкуроноарабиноксилана проростка кукурузы неоднородны по длине остова и одновременно содержат три области: а) устойчивую к гидролизу эндосиланазой и остающуюся после её воздействия в составе клеточной стенки

(«связующий» домен); б) устойчивую к действию эндоксилаказы, но извлекаемую в результате её воздействия («разрыхляющий» домен); в) подверженную гидролизу эндоксилазой («промежуточный» домен).

4. Установлено, что недоступность «разрыхляющего» домена глюкуроноарабиноксилана кукурузы для гидролиза эндоксилазой может объясняться повышенным содержанием арабинозы, глюкуроновой кислоты и ацетильных групп в качестве заместителей остова, а также их диффузным распределением, что обеспечивает отсутствие необходимых для работы фермента двух незамещенных остатков ксилозы, расположенных последовательно.

5. В клетках проростка кукурузы, характеризующихся большей скоростью роста, выше содержание ксилозы в составе «разрыхляющего» домена глюкуроноарабиноксилана и ниже – в составе «связующего» домена. В стенках таких клеток молекулы глюкуроноарабиноксилана в меньшей степени связаны с другими углеводсодержащими соединениями, о чем свидетельствуют различия в количестве «нексилановых» моносахаридов, извлекаемых под действием эндоксилаказы.

6. Показано, что в ходе роста растяжением изменяется соотношение различных доменов глюкуроноарабиноксилана и уменьшается молекулярная масса «разрыхляющего» домена.

7. Продемонстрировано, что завершение роста растяжением в корнях и колеоптилях проростка кукурузы не сопровождается уменьшением доли глюкана со смешанным типом связей в их клеточных стенках, как считалось ранее, а сопряжено с изменениями тонкой структуры этого полисахарида, которые могут сказываться на физико-механических свойствах клеточных стенок.

Список работ, опубликованных по материалам диссертации

Статьи, опубликованные в журналах, рекомендованных ВАК

1. **Козлова, Л.В.** Структура и распределение глюкана со смешанным типом связей на разных стадиях растяжения клеток корня кукурузы / Л.В.Козлова, А.В.Снегирева, Т.А.Горшкова // Физиология растений. – 2012. – Т. 59. – С. 376-385.
2. **Козлова, Л.В.** Глюкуроноарабиноксилан, извлекаемый при обработке эндоксилазой, в различных зонах растущего корня проростков кукурузы / Л.В.Козлова, П.В.Микшина, Т.А.Горшкова // Биохимия. – 2012. – Т. 77. – С. 503-513.

Работы, опубликованные в материалах конференций и других изданиях

3. **Kozlova, L.V.** Structure of cell wall polysaccharides as the determinant of plant cell elongation / L.V.Kozlova, A.V.Snegireva, T.A.Gorshkova // Book of abstracts / Universidad do Porto – Porto, 2010. – P. 70.
4. **Козлова, Л.В.** Клеточная стенка как детерминанта роста растяжением / Л.В.Козлова, А.В.Снегирева, О.П.Гурьянов, Т.А.Горшкова // Сборник тезисов / Издательство Казанского государственного университета – Казань, 2010. – С. 28.
5. **Kozlova, L.V.** Polysaccharides of plant cell walls specific for elongation stage of cell development / L.V.Kozlova, A.V.Snegireva, T.A.Gorshkova // Book of abstracts / Институт органической химии им. Н.Д.Зелинского – Moscow, 2011. – С. 15.
6. **Козлова, Л.В.** Роль полисахаридов матрикса в процессе роста растяжением / Л.В.Козлова, А.В.Снегирева, Т.А.Горшкова // Тезисы докладов / Нижегородский государственный университет им. Н.И.Лобачевского – Нижний Новгород, 2011. – С. 347.
7. **Козлова, Л.В.** Изменения гемицеллюлоз в ходе роста растительных клеток растяжением / Л.В.Козлова, А.В.Снегирева, Т.А.Горшкова // Тезисы докладов / Издательство «Ракурс» – Саратов, 2011. – С. 61.
8. **Kozlova, L.V.** Changes of matrix polysaccharides during elongation growth of seedlings / L.V.Kozlova, A.V.Snegireva, T.A.Gorshkova // Book of abstracts / Nara Institute of Science and Technology – Awajjishima, 2011. – P. 19.