



УДК 577.152.087:581.2

Л. М. Бабенко, М. М. Щербатюк, І. В. Косаківська

Структурно-функціональні особливості кореневища *Equisetum arvense* L. в онтогенезі

(Представлено членом-кореспондентом НАН України Я. П. Дідухом)

Досліджено характер змін активності ліпоксигенази та ультраструктуру тканин кореневища хвоща польового (*Equisetum arvense* L.) у період фізіологічного спокою і під час виходу з нього. Встановлено, що вихід зі стану спокою відбувається на фоні зростання активності ліпоксигенази. Виявлені специфічні зміни, що відбувалися в ультраструктурі тканин кореневища хвоща під час виходу із стану спокою, серед яких зменшення числа крохмальних зерен в амілопластах та збільшення кількості ліпідних крапель, які формують розташований поруч із плазмолемою ліпідний шар.

Ключові слова: *Equisetum arvense* L., ліпоксигеназа, ультраструктура, кореневище.

Ліпоксигенази (лінолеат:кисень:оксидоредуктази КФ 1.13.11.12; ЛОГ) — клас негемових залізовмісних діоксигеназ, які каталізують окиснення поліненасичених жирних кислот (ПНЖК), що містять 1,4-цис-, цис-пентадієнову систему, з утворенням гідропероксидів транс- та цис-кон'югованих дієнів [1]. Така реакція є ключовою в циклі окиснення ПНЖК [2]. Подальші перетворення ферментами ліпоксигеназної системи призводять до утворення окиснених похідних ПНЖК, у тому числі фізіологічно активних сполук — оксиліпінів, які забезпечують відповідь організму на дію абіотичних та біотичних стресорів, а також участь у процесах росту, розвитку, старіння клітин та клітинної смерті, захисті від патогенного ураження [1–4]. До головних фізіологічних функцій ЛОГ належать участь у процесах пероксидного окиснення ліпідів, синтезі сигнальних сполук, мобілізація ліпідів [5]. ЛОГ знайдені в тканинах тварин, вищих рослин, папоротей, хвощів, водоростей, мохів, дріжджів, грибів і ціанобактерій [6–10]. Більша частина ліпоксигеназ є розчинними цитоплазматичними ензимами, проте окремі з них виявлені в хлоропластах, мітохондріях та вакуолях. Завдяки високому вмісту і відносній стабільності ЛОГ вищих рослин виділені і очищені до гомогенного стану, охарактеризовані їхні структура і біологічні властивості [7, 8, 9]. Однак відомості про фізіологічну функцію ЛОГ спорових рослин обмежені і потребують подальшого вивчення.

© Л. М. Бабенко, М. М. Щербатюк, І. В. Косаківська, 2015

Хвоці належать до одних із найдавніших рослин, які з'явилися більше 300 млн років тому в девоні палеозойської ери і досягли розквіту в кам'яновугільний період. У наш час відділ хвоцеподібних (*Equisetophyta*) представлений одним родом Хвоц (*Equisetum*), який нараховує 25 видів [11]. У попередніх дослідженнях виявлено дві ізоформи ліпоксигенази — 13-ЛОГ та 9-ЛОГ та встановлено характер залежності їхнього розподілу в різних органах надземної та підземної частин репродуктивного і вегетативного пагонів *E. arvense* від фази онтогенетичного розвитку [11]. Також було досліджено ультраструктуру клітин вегетативних пагонів *E. arvense* [12] і досить детально вивчено структуру та характер відкладень кремнезему в пагонах цього виду [13].

Ми ставили за мету дослідити ліпоксигеназну активність та вивчити ультраструктуру клітин кореневища *E. arvense* на різних етапах онтогенезу для з'ясування можливої участі ензиму в мобілізації ліпідів при переході до активного розвитку та виявленні специфічних структурних перебудов, що відбуваються на фоні активізації метаболічних процесів.

Матеріали і методи. Об'єктом дослідження були кореневища хвоца польового, який зростав на науково-виробничій базі Інституту ботаніки ім. М. Г. Холодного НАН України "Феофанія" (м. Київ) в умовах Північного Лісостепу України. Хвоц польовий — багаторічна трав'яниста рослина, що має пагони двох типів: репродуктивні (спороносні) і вегетативні (асиміляційні). Спороносні пагони з'являються навесні (друга половина квітня — початок травня). Після дозрівання спор репродуктивні пагони відмирають, а замість них розвиваються вегетативні, які відмирають у другій половині вересня, з настанням холодів. Кореневище хвоца польового залягає в ґрунті горизонтальними та вертикальними тяжами. Воно бурувато-чорного кольору, без серединної порожнини, повзуче, сильно розгалужене з довгими міжвузлями, які почленовані вузлами, що мають листкові піхви, утворені редукованими листками. Як і на надземних стеблах, на кореневищах під захистом редукованих листків закладаються бруньки майбутніх пагонів та коренів, але, на відміну від надземних пагонів, більшість стеблових бруньок на кореневищах зазвичай залишаються сплячими, а зачатки коренів часто проростають, пробиваючи листкові піхви, тому вузли кореневища частіше мають не відгалуження пагонів, а додаткові відгалуження коренів. Деякі бічні бруньки як на горизонтальних, так і на вертикальних кореневищах, проростаючи, утворюють бульбочки, які являють собою сильно потовщене, видозмінене і вкорочене міжвузля [12, 13].

Для виділення ЛОГ наважки тканин гомогенізували в охоложеному до +4 °С 0,1 М фосфатному буфері, рН 6,3, з додаванням 2 мМ фенілметилсульфонілфториду. Після 30 хв екстракції при перемішуванні гомогенат центрифугували на центрифугу "WPW-310" (ПНР) при 10000 об/хв протягом 20 хв. Отриману надосадову рідину використовували для визначення ензиматичної активності. Загальний вміст білка визначали за методом Бредфорд [14]. Дослідження активності ферменту проводили за методом [11].

Для дослідження ультраструктури тканин кореневища проводили відбір фрагментів розміром 1 × 2 мм, які фіксували розчином 3% глутарового альдегіду "Fluka AG" (ФРН) і 1%-го чотириокису осмію на фосфатному буфері з рН 7,2, потім зневоднювали в серії розчинів етилового спирту зростаючої концентрації і після обробки ацетоном переносили у суміш епоксидних смол епону і аралдиту "Fluka AG" (ФРН) згідно з загальноприйнятими методиками [15]. Ультратонкі зрізи готували на ультрамікротомі ЛКВ-3 (Швеція) та аналізували в мікроскопі JEM-1230 (JEOL, Японія). Досліди проводили у двох біологічних та трьох аналітичних повторах.

Результати і обговорення. У кореневищах *E. arvense*, що перебували в стані фізіологічного спокою, виявлено ізоформу 9-ЛОГ, рН 4,2 (рис. 1). Наявність у кореневищі ЛОГ

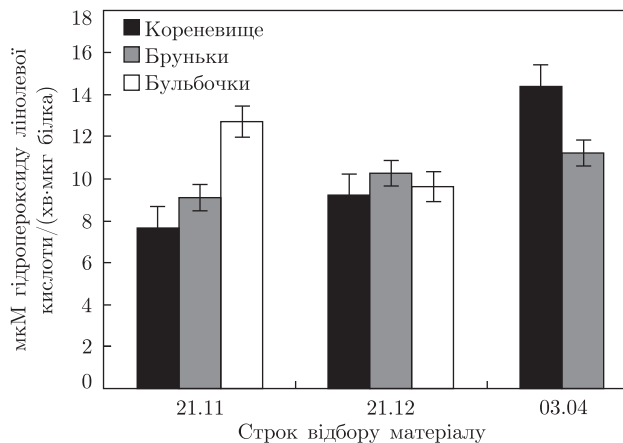


Рис. 1. Активність ліпоксигенази 9-ЛОГ в різних органах на різних етапах онтогенезу *E. arvense*

оптимуму рН із низьким значенням розглядається як одна із складових механізму адаптації *E. arvense* до існування в кислому ґрунті (рН 4,8) [11]. На зразках кореневищ, зібраних у листопаді–грудні, були знайдені крохмалевмісні бульбочки, діаметр яких становив 2,5–5,0 мм. На кореневищах, відібраних навесні, бульбочок не було, що пояснюється мобілізацією з них запасних речовин при відновленні ростових процесів. Встановлено, що на вузлах кореневища у всіх відібраних зразків під захистом листових піхв формувалися зачатки пагонів (бруньки) і зачатки коренів. Бруньки являли собою вкорочені спорозні пагони, що містили 6–7 міжвузлів та зачатковий стробіл. Зазвичай, у зимовий період більшість бруньок знаходяться в сплячому стані і довжина їх дорівнює 0,5–2,5 мм. Виявлену варіабельність у морфометричних показниках можна пояснити аномально високими температурами повітря в першій половині зими досліджуваного періоду.

Впродовж осінньо-зимового періоду відбувалося незначне збільшення активності ЛОГ у кореневищах на 20% та бруньках на 12% і її зниження в бульбочках на 25% (див. рис. 1). Ближче до середини весни (03.04) при встановленні позитивної середньодобової температури зачатки пагонів (бруньки) виходили із стану спокою, відновлюючи ростову активність. Відповідно, активність ліпоксигенази в кореневищах зростала майже вдвічі, а в бруньках — на 25%. Слідові значення активності 13-ЛОГ ($0,23 \pm 0,002$ мкМ гідропероксиду лінолевої кислоти/(хв · мкг білка)) зафіксовані в бруньках кореневища. У попередніх дослідженнях 13-ЛОГ активність була визначена в надземній (стробіл, міжвузля, листки) і підземній (кореневище) частинах хвоща, тоді як 9-ЛОГ — у стробілі і кореневищі. Було, зокрема, встановлено, що 9-ЛОГ активність значно зростала в кореневищі при висипанні спор — на початку процесу відмирання генеративного пагона. При дослідженні вегетативного пагона 9-ЛОГ активність була ідентифікована тільки в кореневищі [11]. Подібний тип розподілу ЛОГ активності характерний для вищих рослин, зокрема для картоплі, у якої 13-ЛОГ присутня лише в листках і стеблах, а 9-ЛОГ — у бульбах [2]. Відомо, що основними продуктами ліпоксигеназних реакцій є моногідроперокси, які виконують різні фізіологічні функції, при цьому 9-ЛОГ каталізує реакцію утворення 9-гідропероксидів, а 13-ЛОГ — 13-гідропероксидів ПНЖК. 13-гідроперокси є попередниками біологічно активних речовин, таких як травматин, жасмонова кислота (ЖК) та її похідні [1, 2]. 9-гідроперокси ПНЖК у вищих рослин є попередниками сполук, які стимулюють синтез кетолів, що індують цвітіння, забезпечуючи забарвлення квітів, захист та апоптоз при мікробіологічному

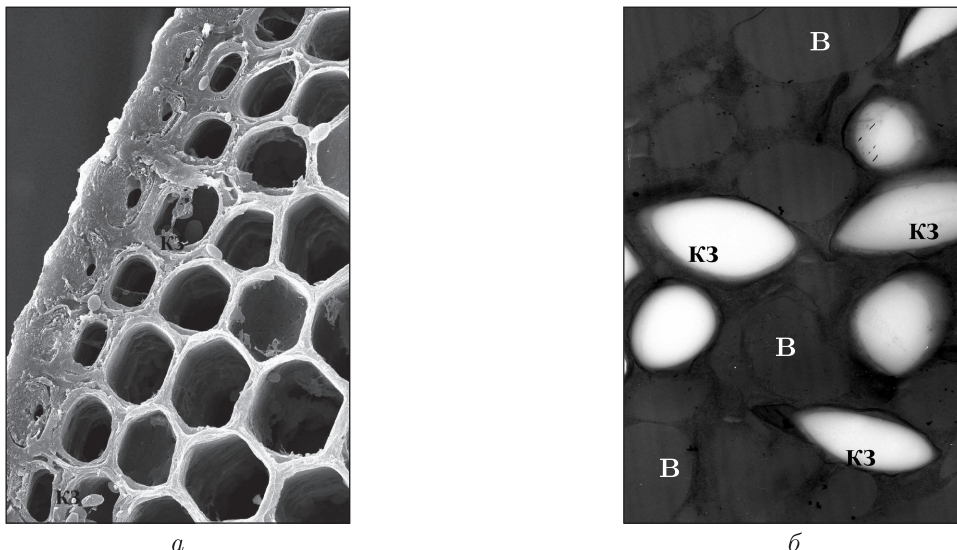


Рис. 2. Локалізація крохмалю в клітинах кореневища *E. arvense*: *a* — фото, отримане на сканувальному електронному мікроскопі ($\times 750$); *б* — фото фрагмента клітини паренхіми кореневища, отримане на трансмісійному електронному мікроскопі ($\times 15000$). Позначення: КЗ — крохмальні зерна; в — компартментизована вакуоля

ураженні патогенами листків, регулюють бульбоутворення *Solanum tuberosum* L. В умовах *in vivo* ці продукти ліпоксигеназної реакції індукували бульбоутворення, викликаючи переорієнтацію мікротрубочок, що супроводжувалося збільшенням радіального розтягування клітин і сприяло розвитку бульби [2]. Роль 9-гідропероксиду ПНЖК у хвощів поки що не відома.

E. arvense належить до багаторічних рослин, і на зиму в ґрунті залишається лише розгалужене кореневище. Для хвоща характерні горизонтальний і вертикальний типи кореневищ. Горизонтальні зазвичай більш товсті, з довгими міжвузлями; вертикальні — тонші, з коротшими міжвузлями. Поверхня кореневищних міжвузлів порівняно з поверхнею надземних міжвузлів вегетативних пагонів більш рівна, її гребені слабо виражені. У кореневищі відсутні продихи, а також фотосинтезуюча паренхіма (хлоренхіма), а тяжі механічної тканини такого типу, як у надземних вегетативних пагонах [12]. Під епідермою (ризодермою) міжвузлів кореневища залягає кілька шарів відносно товстостінних паренхімних клітин, що не дерев'яніють, і в стінках яких може відкладатись кремнезем [13]. Під ними розташовані більш тонкостінні клітини основної паренхіми. Клітини паренхіми містять численні амілопласти, заповнені крохмальними зернами, і є достатньо вакуолізованими (див. рис. 2), що вказує на активну запасуючу функцію. На мікрофотографіях тканин зимового кореневища, отриманих за допомогою сканувального електронного мікроскопа, видно сферичні крохмальні зерна, які залишаються в сухому матеріалі. З аналізу зображень, отриманих на трансмісійному електронному мікроскопі, зрозуміло, що крохмальні зерна містяться в амілопластах, по одному, рідше по два в одній органелі. Саме такий характер відкладання крохмальних зерен мають амілопласти асиміляційних пагонів. Клітини кореневища в зимовий період містять значну кількість амілопластів, наповнених крохмалем (див. рис. 2). У міру виходу із стану спокою і з початком формування генеративних пагонів в амілопластах зменшується кількість крохмальних зерен, збільшується число ліпідних крапель,

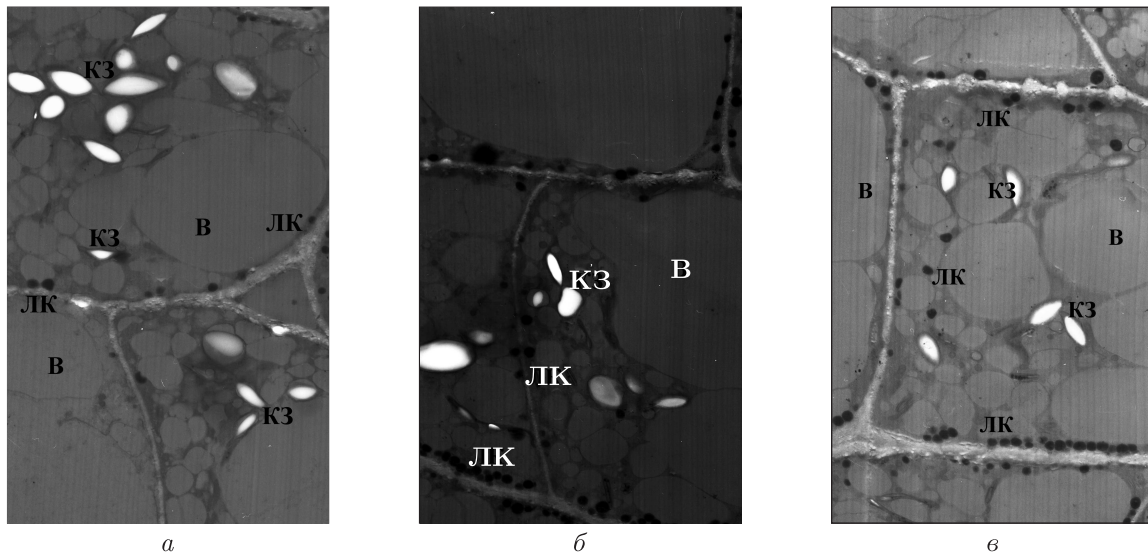


Рис. 3. Ультраструктура тканин кореневища *E. arvense* на різних етапах онтогенезу: *a* – 21.11; *б* – 21.12; *в* – 3.04. Позначення: ЛК – ліпідні краплі; КЗ – крохмальні зерна; *в* – компартментізована вакуоля ($\times 3000$)

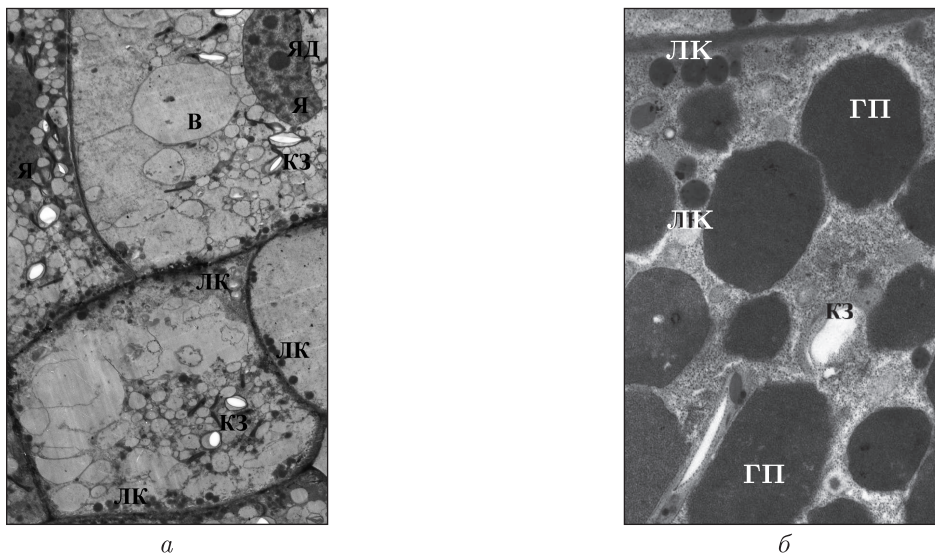


Рис. 4. Загальний вигляд клітини основної паренхіми кореневища *E. arvense* навесні (*a*, $\times 2000$) та фрагмент клітини епідерми (ризодерми) кореневища в зимовий період (*б*, $\times 8000$). Позначення: ЛК – ліпідні краплі, КЗ – крохмальні зерна, В – компартментізована вакуоля, Я – ядро, ЯД – ядерець, ГП – осмієфільні гранули пігменту

які формують ланцюжки, розташовані поруч із плазмолемою (рис. 3). Наявність таких пов'язаних з метаболізмом змін свідчить про відновлення ростових процесів у кореневищі. Також у клітинах основної паренхіми в зразках кореневищ, відібраних навесні, добре візуалізуються ядра з ядерецями (рис. 4, *a*). Згідно з результатами мікроскопічних досліджень, в клітинах епідерми (ризодерми) та поверхневих шарах клітин паренхіми, що вкривають кореневище, містяться численні осмієфільні пігментні гранули значної електронної густини, які зумовлюють темний колір кореневища хвоща (див. рис. 4, *б*).

Отже, в результаті проведеного дослідження встановлено, що зміни в активності ЛОГ корелюють із сезонними змінами фізіологічних і метаболічних процесів у кореневищі *E. arvense*. Взимку активність перебуває на низькому стабільному рівні. З весняним потеплінням відбувається активація ліпідного обміну, що супроводжується зростанням активності ЛОГ. Підтвердженням цьому також є збільшення числа ліпідних крапель, що формують ланцюжки в цитоплазмі клітин, розташовані поруч із плазмолемою. Виявлено значну кількість крохмалю в клітинах паренхіми кореневища, відкладення якого спостерігалось протягом зимового періоду. З відновленням ростової активності відбувається гідроліз цього запасного полісахариду. Хвощ польовий характеризується накопиченням запасних речовин у пагонах, кореневищі і бульбах під час короткого періоду активного росту. Завдяки унікальній архітектурі кореневища, що глибоко залягає в ґрунті і маса якого перевищує масу надземної частини рослини в кілька разів, хвощ успішно протидіє впливу несприятливих чинників довкілля і конкурує з іншими рослинами.

Цитована література

1. Feussner I., Wasternack C. The lipoxygenase pathway // Annu. Rev. Plant Biol. – 2002. – **53**. – P. 275–297.
2. Бабенко Л. М., Косаківська І. В., Скатерна Т. Д., Харченко О. В. Ліпоксигеназа рослин в адаптації до дії абіогічних стресових чинників // Вісн. Харків. нац. аграр. ун-ту. Сер. Біол. – 2013. – Вип. 2. – С. 6–19.
3. Косаківська І. В., Бабенко Л. М., Устїнова А. Ю., Скатерна Т. Д., Деміревська К. Вплив температурного режиму на активність ліпоксигенази проростків ріпаку *Brassica napus* var. *Oleifera* // Доп. НАН України. – 2012. – № 6. – С. 134–137.
4. Babenko L. M., Kosakivska I. V., Akimov Yu. A., Klymchuk D. O., Skaternya T. D. Effect of temperature stresses on pigment content, lipoxygenase activity and cell ultrastructure of winter wheat seedlings // Gen. and plant physiol. – 2014. – **4**, No 1–2. – P. 117–125.
5. Joo Y.-C., Oh D.-K. Lipoxygenases: Potential starting biocatalysts for the synthesis of signaling compounds // Biotechnol. Advances. – 2012. – **30**. – P. 1524–1532.
6. Zimmernan D., Vick B. Lipoxygenase in *Chlorella pyrenoidosa* // Lipids. – 1973. – **8**, Is. 5. – P. 264–266.
7. Hamberg M. Isolation and structure of lipoxygenase from *Saprolegnia parasitica* // Biochem. Biophys. Acta. – 1986. – **876**. – P. 688–692.
8. Beneytout J., Andrianarison R., Tixiu I. Properties of a lipoxygenase in green algae (*Oscillatoria* sp.) // Plant Physiol. – 1989. – **9**, No 1. – P. 367–372.
9. Liavonchanka A. Lipoxygenases: Occurrence, functions and catalysis // J. Plant Physiol. – 2004. – **99**, No 1. – P. 37–42.
10. Бабенко Л. М., Войтенко Л. В., Скатерна Т. Д., Мусатенко Л. І. Ліпоксигеназна активність в онтогенезі *Equisetum arvense* L. // Физиология растений и генетика. – 2014. – **46**, № 1. – С. 37–44.
11. Войтенко Л. В., Щербатюк М. М., Стахів М. П., Мусатенко Л. І. Ультроструктурні особливості клітин міжвузля хвоща польового (*Equisetum arvense* L.) // Доп. НАН України. – 2012. – № 2. – С. 170–173.
12. Holzhüter G., Narayanan K., Gerber T. Structure of silica in *Equisetum arvense* // Anal. Bioanal. Chem. – 2003. – **372**. – P. 512–517.
13. Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. – 1976. – **72**, No 2. – P. 248–254.
14. Лотова Л. И. Морфология и анатомия высших растений. – Москва: Эдитореал УРСС, 2001. – 528 с.

References

1. Feussner I., Wasternack C. Annu. Rev. Plant Biol., 2002, **53**: 275–297.
2. Babenko L. M., Kosakivska I. V., Skaternya T. D., Kharchenko O. V. The bulletin of Kharkiv National Agrarian Univ. (Ser. biology), 2013, Is. 2(29): 6–19 (in Ukrainian).

3. Kosakivska I. V., Babenko L. M., Ustinova A. Yu., Skaterna T. D., Demirevska K. Dopov. NAN Ukraine, 2012, No 6: 134–137 (in Ukrainian).
4. Babenko L. M., Kosakivska I. V., Akimov Yu. A., Klymchuk D. O., Skaternya T. D. Gen. and plant physiol., 2014, 4, No 1–2: 117–125.
5. Joo Y.-C., Oh D.-K. Biotechnol. Advances, 2012, 30: 1524–1532.
6. Zimmennan D., Vick B. Lipids, 1973, 8, Is. 5: 264–266.
7. Hamberg M. Biochem. Biophys. Acta, 1986, 876: 688–692.
8. Beneytout J., Andrianarison R., Tixiu I. Plant Physiol., 1989, 9, No 1: 367–372.
9. Liavonchanka A. J. Plant Physiol., 2004, 99, No 1: 37–42.
10. Babenko L. M., Voytenko L. V., Skaterna T. D., Musatenko L. I. Physiologia rasteniy i genetika, 2014, 46, No 1: 37–44 (in Ukrainian).
11. Voytenko L. V., Shcherbatiuk M. M., Stachiv M. P., Musatenko L. I. Dopov. NAN Ukraine, 2012, No 2: 170–173 (in Ukrainian).
12. Holzhüter G., Narayanan K., Gerber T. Anal. Bioanal. Chem., 2003, 372: 512–517.
13. Bradford M. Anal. Biochem., 1976, 72, No 2: 248–254.
14. Lotova L. I. Morphology and anatomy of higher plants, Moscow: Editoreal URSS, 2001 (in Russian).

Інститут ботаніки ім. М. Г. Холодного
НАН України, Київ

Надійшло до редакції 29.01.2015

Л. М. Бабенко, Н. Н. Щербатюк, И. В. Косаковская

Структурно-функциональные особенности корневища *Equisetum arvense* L. в онтогенезе

Інститут ботаніки ім. М. Г. Холодного НАН України, Київ

*Исследован характер изменений активности липоксигеназы и ультраструктуры тканей корневища хвоща полевого (*Equisetum arvense* L.) в период физиологического покоя и во время выхода из него. Установлено, что выход из состояния покоя происходит на фоне роста активности липоксигеназы. Обнаружены специфические изменения, которые происходили в ультраструктуре тканей корневища хвоща при выходе из состояния покоя, среди которых уменьшение числа крахмальных зерен в амилопластах и увеличение количества липидных капель, которые формируют расположенный рядом с плазмолеммой липидный слой.*

Ключевые слова: *Equisetum arvense* L., липоксигеназа, ультраструктура, корневище.

L. M. Babenko, M. M. Shcherbatiuk, I. V. Kosakivska

Structural-functional peculiarities of *Equisetum arvense* L. rhizomes in ontogenesis

M. G. Kholodny Institute of Botany of the NAS of Ukraine, Kiev

*The nature of changes in the lipoxygenase activity and the tissue ultrastructure of rootstock horsetail (*Equisetum arvense* L.) during the physiological rest and during the way out of it are investigated. It is found that going out the dormancy occurs against a background of the increased activity of lipoxygenase. Specific changes that took place in the cell ultrastructure horsetail rhizome, while leaving the rest, are identified. They include reducing the number of starch grains in amyloplast and increasing the number of lipid droplets that form the lipid layer located next to the plasmolemma.*

Keywords: *Equisetum arvense* L., lipoxygenase, ultrastructure, rootstock.