

ЧЕРНОВА ТАТЬЯНА ЕВГЕНЬЕВНА

**БИОГЕНЕЗ ФЛОЭМНЫХ ВОЛОКОН
КОНОПЛИ (*Cannabis sativa* L.) И ЛЬНА (*Linum usitatissimum* L.):
СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ**

03.00.12 – физиология и биохимия растений

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Казань – 2007

Работа выполнена в лаборатории механизмов роста растительных клеток Казанского института биохимии и биофизики Казанского научного центра Российской академии наук.

Научные руководители: доктор биологических наук
Горшкова Татьяна Анатольевна,

кандидат биологических наук, доцент
Ситников Андрей Петрович.

Официальные оппоненты: кандидат биологических наук, доцент
Саламатова Татьяна Сергеевна,

доктор биологических наук, профессор
Максютова Наиля Назибовна.

Ведущая организация: Институт физиологии и биохимии растений
и микроорганизмов РАН, г. Саратов.

Защита состоится «09» ноября 2007 г. в 12⁰⁰ час. на заседании диссертационного совета К 002.005.01 по присуждению ученой степени кандидата биологических наук при Казанском институте биохимии и биофизики КазНЦ РАН (420111, г. Казань, а/я 30, ул. Лобачевского, 2/31).

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной библиотеке Казанского научного центра РАН.

Автореферат разослан «___» октября 2007 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

А.Б. Иванова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Постановка проблемы и ее актуальность. Волокно в понимании биологии растений – индивидуальная клетка, к числу основных характеристик, которой относятся исключительная длина (до нескольких сантиметров) и мощно развитая вторичная клеточная стенка, толщина которой многократно превосходит этот показатель для других типов клеток, достигая 20 мкм. Волокно – структурный элемент склеренхимы – механической ткани, придающей растительному органу прочность и упругость. Волокна склеренхимы, различные по происхождению, расположению среди тканей и типу клеточной стенки широко распространены среди высших растений.

Уникальные морфологические характеристики волокон делают их интересным объектом для изучения клеточных механизмов роста и формирования вторичной клеточной стенки. Известно, что за период биогенеза волокна проходят стадии, характерные для большинства растительных клеток. Однако при общем согласии относительно хода биогенеза волокон в целом, существуют различные, иногда противоречивые точки зрения о продолжительности и механизмах осуществления отдельных стадий.

На примере первичных флоэмных волокон льна (*Linum usitatissimum* L.) недавно пересмотрены существовавшие представления о биогенезе растительных волокон (Горшкова и др., 2003; Gorshkova et al., 2003, 2005). Ранее считали, что волокна удлиняются месяцами, достигая своих огромных размеров за счет роста кончиков клетки; при этом срединная «более старая» часть клетки формирует вторичную клеточную стенку (Эзау, 1980; Fahn, 1990). При изучении ключевых стадий развития волокон - интрузивного роста и формирования вторичной клеточной стенки установлено, что удлинение волокон льна ограничено во времени до нескольких дней и происходит за счет роста всей поверхности клетки (Gorshkova et al., 2003; Ageeva et al., 2005). Эти волокна формируют особый, так называемый желатинозный, тип вторичной клеточной стенки. Обнаружен тканеспецифичный полисахарид, который прочно связывается с микрофибриллами целлюлозы (Gurjanov et al., 2007b), выявлена интенсивная модификация слоев вторичной клеточной стенки (Gorshkova et al., 2003, 2005).

Однако вопрос о том, имеет ли вышеприведенный характер развития первичных волокон льна место при биогенезе волокон, входящих в состав других, филогенетически отдаленных видов растений, а также волокон, формирующихся в результате деятельности иной меристематической ткани, остается открытым. Сопоставление этапов развития флоэмных волокон различного происхождения может позволить придать развиваемым представлениям более общий характер, выявить ключевые закономерности биогенеза волокон, а также отличительные черты, обеспечивающие разнообразие свойств волокон различного происхождения.

Для исследования в этом направлении нами были выбраны флоэмные волокна конопли (*Cannabis sativa* L.). Роды *Linum* и *Cannabis* представляют собой филогенетически отдаленные таксоны; они относятся к различным подклассам *Dicotyledoneae*. Растение конопли формирует не только первичные, но и вторичные флоэмные волокна, образующиеся за счет деятельности камбия.

Цель и задачи исследований. Целью представляемой работы являлось сопоставление биогенеза флоэмных волокон различного происхождения. Были поставлены следующие задачи:

- 1) проанализировать характер интрузивного роста первичных и вторичных волокон конопли и сопоставить его с интрузивным ростом волокон льна;
- 2) охарактеризовать состав клеточной стенки волокон конопли, в том числе для полимеров, прочно связанных с целлюлозой;
- 3) проанализировать ультраструктуру вторичной клеточной стенки волокон конопли и сопоставить ее с ультраструктурой волокон льна; оценить наличие модификаций отложенных слоев клеточной стенки;
- 4) оценить наличие и охарактеризовать тканеспецифичный полимер флоэмных волокон конопли;
- 5) сопоставить состав тканеспецифичных полимеров волокон различного происхождения.

Научная новизна работы. В работе охарактеризованы отдельные стадии биогенеза флоэмных волокон конопли; проведено сопоставление развития первичных и вторичных флоэмных волокон, а также волокон льна и конопли. Выявлены общие закономерности, к которым относятся: отделенность стадии интрузивного роста от стадии утолщения клеточной стенки; формирование клеточной стенки особого, желатинозного, типа; интенсивная модификация слоев клеточной стенки; наличие тканеспецифичного высокомолекулярного галактана, построенного по сходному типу. Установлено, что этот полимер присутствует только на стадии формирования желатинозной клеточной стенки и во всех проанализированных волокнах прочно связывается с целлюлозой. Впервые обнаружено, что образованию галактановых слоев вторичной клеточной стенки желатинозных волокон предшествует отложение ксиланового слоя.

Впервые обнаружена высокая вариабельность состава ткане- и стадийспецифичного галактана желатинозных волокон, наблюдаемая не только между различными видами растений, или между различными генотипами одного вида, но и у растений одного генотипа. Впервые показано, что показатели длины боковых цепочек тканеспецифичного галактана волокон льна имеют дискретный характер, что может свидетельствовать о блочном характере синтеза полимера в аппарате Гольджи.

Практическая ценность работы. Практическая значимость работы во многом определяется тем, что исследования проведены на хозяйственно ценных лубоволокнистых культурах – на растениях льна и конопли. Использование и

дальнейшее усовершенствование сформированных представлений и разработанных методов позволит проанализировать биогенез волокон, связанных онтогенетически с другими тканями и входящих в состав других растительных органов, что в свою очередь определит дополнительные подходы как к разработке классификации растительных волокон и к целенаправленному изменению их свойств.

Связь работы с научными программами. Исследования проводились в соответствии с планами НИР КИББ КазНЦ РАН (номер госрегистрации 0120.0 408625); частично поддержаны грантами РФФИ №№ 05-04-48906; 06-04-48853; 06-04-81049. Научные положения и выводы диссертации базируются на результатах собственных исследований автора.

Апробация работы. Материалы диссертации докладывались на XLI Международной студенческой конференции «Студент и научно-технический прогресс» (Новосибирск, 2003), V съезде Общества физиологов растений России (Пенза, 2003), VIII Молодежной конференции ботаников (Санкт-Петербург, 2004), на X Международной конференции по клеточной стенке (Сорренто, Италия, 2004), на Международной научно-практической конференции (Торжок, 2004), на годовом собрании Общества физиологов растений России (Вологда, 2005), на Международной научной конференции, посвященной 200-летию Казанской ботанической школы (Казань, 2006), на I (IX) Международной конференции молодых ботаников (Санкт-Петербург, 2006), на II Международном симпозиуме «Сигнальные системы клеток растений: Роль в адаптации и иммунитете» (Казань, 2006), на годовом собрании Общества физиологов растений России (Ростов-на-Дону, 2006), на VI съезде Общества физиологов растений России (Сыктывкар, 2007), на Международном симпозиуме «Клеточные, молекулярные, и эволюционные аспекты морфогенеза» (Москва, 2007), на XI Международной конференции по клеточной стенке (Копенгаген, Дания, 2007), на конференциях молодых ученых КИББ КазНЦ РАН (2003, 2004, 2005) и итоговой конференции КИББ КазНЦ РАН (2007).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 20 работ.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 127 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания объекта и методов исследования, изложения и обсуждения результатов, заключения, выводов и списка литературы. В работе представлено 10 таблиц и 33 рисунка. Список литературы включает 154 источника, из них 31 - отечественных.

1. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

1.1. Растительный материал. В качестве объекта исследований использовали растения конопли (*Cannabis sativa* L.) и льна (*Linum usitatissimum* L.). Растения конопли однодомных безгашишных сортов Диана и Ингрета, выращенные на экспериментальном поле НИИСХ г. Цивильска (Чувашия) в 2003 и 2004 гг.,

отбирали в два срока – в фазу бутонизации (через 65-67 дней после посева) и в фазу начала созревания семян (через 117 дней после посева). Основной объем исследований выполнен на зеленостебельном сорте Диана. Отобранные для исследования растения в фазу бутонизации имели общую высоту стебля 170 см, при высоте верхней части стебля с очередным листорасположением – 15 см; общая высота растений в фазу начала созревания семян составляла 220 см, из них 60 см – высота верхней части стебля. Растения первого и второго сроков фиксации имели по 9 междоузлий равной длины. Для биохимического анализа использовали растения, находящиеся в фазе бутонизации. Фиксировали флоэму из верхнего трехсантиметрового участка стебля; флоэму, ксилему и листья из восьмого междоузлия стебля (снизу); флоэму из третьего междоузлия (снизу). Наружную (флоэмную) и внутреннюю (ксилемную) части стебля разделяли вручную по камбию. Для выделения первичных и вторичных волокон конопли флоэму из третьего междоузлия выдерживали в 1,2 % растворе мацерозима (Serva) в течение 18 часов при 4 °С.

Растения льна сорта Новоторжский выращивали в условиях вегетационного опыта в ящиках со слоем почвы 50 см на открытом воздухе при естественном освещении и ежедневном поливе. Растения льна 23 различных генотипов из коллекции ВИР им Н.И. Вавилова были выращены на полях Пушкинского филиала ВИР (Ленинградская обл.) в 2004 и 2005 гг., различавшихся по погодным условиям и набору выращиваемых генотипов; 11 форм было изучено в течение двух лет. Для ряда генотипов образцы были отобраны с двух делянок рандомизированного посева. Общее количество проанализированных образцов льна составило 56. Растения фиксировали в период быстрого роста льна (35-45 дней после посева). Участок стебля (5 или 10 см) ниже «точки слома», которая служит маркером начала формирования вторичной клеточной стенки волокон льна (Горшкова и др., 2003), разделяли на внутреннюю (ксилемную) и наружную части. Для анализа использовали содержащую волокна наружную часть стебля.

Для определения длины волокон льна использовали чесаное волокно, полученное из урожая льна, выращенного на полях ВНИИЛ (г. Торжок). Для приготовления ультратонких срезов использовали растения льна сорта Новоторжский на стадии быстрого роста и растения конопли в фазе бутонизации.

1.2. Определение размеров и числа флоэмных волокон конопли и льна.

Отдельные волокна выделяли под стереомикроскопом (x12.5), подтверждали их целостность и индивидуальность под микроскопом NU-2 (Zeiss) (x100) и измеряли длину. Число аналитических повторностей при измерении длин первичных и вторичных волокон конопли составило 100; при измерении длин волокон льна - 150. Число первичных и вторичных волокон в индивидуальном растении рассчитывали по разработанной методике (Горшкова и др., 2003), исходя из длины волокнистой части стебля, числа волокон на поперечном срезе и средней длины волокна.

1.3. Подсчет числа волокон на поперечных срезах стебля конопли. Из середины каждого междоузлия стебля с помощью бритвенного лезвия получали поперечный срез и окрашивали его метиленовым синим. Подсчет числа волокон производили при помощи микроскопа NU-2 (Zeiss) (x100). Число волокон подсчитывали дважды в каждом междоузлии пяти растений каждого срока фиксации. Полученные результаты обработаны статистически, при изложении данных приведены средние значения и их стандартные отклонения.

1.4. Приготовление серийных поперечных срезов волокон конопли. Использовали участки стебля из третьего междоузлия (снизу). Срезы, толщиной 3 мкм, получали с помощью ультрамикротомы LKB-8800 с шагом 9-12 мкм; просматривали и фотографировали с помощью микроскопа Axiovert 200M (Zeiss). Просмотрено 7 последовательностей серийных срезов.

1.5. Проведение ультрамикроскопических и иммуноцитохимических исследований. Для приготовления ультратонких срезов небольшой участок флоэмной ткани из средней части стебля растений льна и конопли фиксировали по традиционной методике (Vigre, 1998). Для пропитки растительных клеток использовали смолу LR White (TED PELLA, INC.). Ультратонкие срезы получали с помощью алмазного ножа на ультрамикротоме LKB Ultracut III и анализировали при помощи электронных микроскопов EM 10C/EM 10 CR (Zeiss), 60 кВ и JEOL 1200 EX, 80 кВ. Представленные в работе фотоснимки получены в результате применения одного метода фиксации растительной ткани.

Для проведения иммуноцитохимической реакции в качестве первичного антитела использовали крысиное моноклональное антитело LM5 (Plant Probes), специфичное к β -(1 $\rightarrow$ 4)-D-галактанам или LM11 (Plant Probes), специфичное к β -(1 $\rightarrow$ 4)-D-ксиланам. Вторичное антитело – антикрысиное, конъюгированное с коллоидным золотом (размер частиц 5 нм, Amersham Pharmacia Biotech).

1.6. Выделение и анализ полимеров клеточных стенок волокон конопли и льна. Растительную ткань гомогенизировали в 50 мМ К-фосфатном буфере (pH 7,0). Буферорастворимые полимеры осаждали 80% этанолом.

Клеточную стенку выделяли путем последовательной экстракции клеточного содержимого 80% этанолом, ацетоном, обработкой глюкоамилазой (Sigma) и фракционировали с использованием оксалата аммония (0,5%) и КОН (1М). Оставшийся осадок использовали для выделения полисахаридов, прочно связанных с целлюлозой по разработанной методике (Gurjanov et al., 2007b) с использованием N,N-диметилацетамида, LiCl и целлюлазы (Cellusoft-L; Novo Nordisk Bioindustrie).

Выделенные полисахариды фракционировали на колонке (12x400 мм) с Сефарозой CL-4В (Pharmacia), в качестве детектора использовали дифференциальный рефрактометр Кнауер. Определение моносахаридного состава фракций проводили методом высокоэффективной анионообменной хроматографии, на колонке CarboPac PA 1 (4x250 mm, Dionex), используя пульс - амперометрический детектор (PAD, Dionex).

Высокомолекулярный галактан выделяли из буферорастворимой фракции, отделяя его от других полимеров по характерному пику в области 2000-900 кДа. Его содержание определяли по суммарному содержанию моносахаридов и рассчитывали в мкг/см длины стебля во взятой пробе. Среднюю степень полимеризации боковых галактозных цепочек определяли по соотношению галактозы и рамнозы, входящих в состав полимера.

Растения конопли и льна анализировали в двух-трех биологических повторностях и в двух аналитических. В таблицах и на графиках представлены средние значения и их стандартные отклонения для биологических повторностей.

1.7. Определение параметров качества льноволокна проведено сотрудниками ВИР им Н.И. Вавилова по стандартным методикам (Методы ..., 1981). Анализ корреляционных связей между различными параметрами выполнен при помощи пакетов программ «Анализ данных» Excel XP и «Statistica 6». Корреляции подсчитывали отдельно по годам для средних значений признаков (между двумя повторностями). Достоверность оценивали по t-критерию Стьюдента (Лакин, 1990).

1.8. ^1H ЯМР спектроскопия. Образец растворяли в D_2O (99.96 % D), спектр был записан на Bruker Avance DPX300 ЯМР спектрометре при 27°C . В качестве внешнего стандарта использовали ацетон (2,22 м.д.).

1.9. Иммуноферментный анализ полисахаридов волокон конопли проводили с использованием крысиного моноклонального антитела, специфичного к эпитопам β -1,4-D-галактана LM5 (Plant Probes).

Выражаю искреннюю благодарность за методическую помощь сотрудникам лаборатории механизмов роста растительных клеток КИББ КазНЦ РАН д.б.н. В.В. Сальникову и к.б.н. М.В. Агеевой (электронномикроскопический и иммуноцитохимический анализ), к.б.н. О.П. Гурьянову (анализ прочно связанных с целлюлозой полисахаридов и ^1H ЯМР спектроскопия), к.б.н. Н.Н. Ибрагимовой (иммуноферментный анализ). Особую благодарность приношу сотрудникам ВИР им Н.И. Вавилова (группе под руководством д.б.н. Н.Б. Брач) за предоставление образцов коллекции генотипов льна и анализ качества льноволокна.

2. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

2.1. Размеры и число флоэмных волокон конопли и льна

Стебли растений конопли и льна имеют анатомическую структуру, характерную для стебля двудольного растения с непучковой проводящей системой при вторичном утолщении. У использованных нами сортов льна диаметр стебля составлял в среднем 1,5 мм. Стебель конопли имел средний диаметр 15-20 мм и превосходил толщину стебля льна приблизительно в десять раз. Волокна льна и конопли относятся к экстраксилярным волокнам и входят в состав флоэмы. Волокна

разделены радиальными прослойками паренхимы на отдельные пучки. В стебле льна присутствуют только первичные флоэмные волокна (Esau, 1943; Горшкова и др., 2003), которые располагаются тяжами вдоль всей длины стебля.

В структуру стебля конопли, наряду с первичными флоэмными волокнами, входят вторичные флоэмные. Более крупные первичные флоэмные волокна расположены в периферийной области поперечного среза стебля. Первичные волокна конопли, так же как первичные волокна льна, образуют тяжи вдоль всей длины стебля. Между первичными волокнами и камбием располагаются более мелкие вторичные флоэмные волокна. В стеблях молодых растений (высотой 50-60 см) вторичные волокна у проанализированных сортов отсутствовали. В фазу бутонизации в нижней части стебля вторичные флоэмные волокна были представлены несколькими рядами; в середине стебля число их рядов сокращалось до одного-двух, в верхней части стебля они отсутствовали. В стеблях растений конопли, находившихся в фазе созревания семян, вторичные волокна располагались почти по всей длине стебля.

Оценили распределение длин волокон льна и конопли, построив вариационный ряд с величиной классового интервала 5 мм. Длина первичных флоэмных волокон льна составляла, в среднем, 25 мм, однако наблюдали волокна в два-три раза длиннее. Волокна льна в средней части клетки имели диаметр 20-25 мкм, в кончике - 4-6 мкм. Средняя длина первичных волокон конопли составляла 18 мм, однако встречали волокна, достигающие длины 50-55 мм (рис. 1а). Средняя длина вторичных волокон равнялась 8 мм, и, как правило, не превышала 35 мм (рис. 1б). Диаметр средней части клетки первичных волокон конопли составлял $29,5 \pm 1,3$ мкм, вторичных - $7,9 \pm 0,6$ мкм. Морфологические характеристики волокон конопли позволяют сделать вывод, что период интрузивного роста вторичных флоэмных

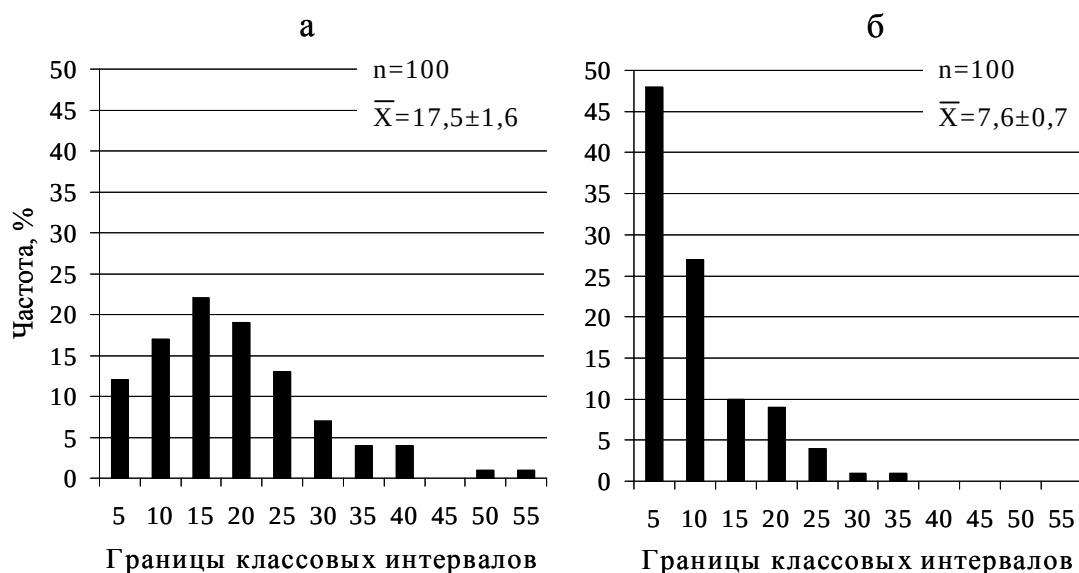


Рис. 1. Частота встречаемости флоэмных волокон различной длины (мм) в стебле конопли; а – первичные волокна; б – вторичные волокна.

волокон протекает с меньшей эффективностью, по сравнению с интрузивным ростом первичных волокон.

Оценив длину волокнистой части стебля, число волокон на поперечном срезе и среднюю длину индивидуальной клетки, подсчитали количество волокон в стебле. Стебель льна содержал около 17 тыс. флоэмных волокон. В структуру стебля конопли входило приблизительно 700-800 тыс. первичных флоэмных волокон и более 2 млн. вторичных.

2.2. Характер интрузивного роста волокон конопли

Продолжительность и характер интрузивного роста оценивали, анализируя поперечные срезы стебля. Для первичных волокон подход отработан в предшествующих исследованиях на льне. Он заключается в анализе поперечных срезов на одном уровне стебля в ходе развития растений. Если при этом происходит увеличение числа первичных волокон на поперечных срезах, то в данном участке стебля волокна удлиняются интрузивно. Было установлено, что период роста волокон льна непродолжителен и составляет 2-3 сут; интрузивно растущие волокна локализованы лишь в верхней части стебля – верхние 5-7 см, ниже находятся волокна, прекратившие рост (Gorshkova et al., 2003; Горшкова и др., 2003).

Аналогичный подход использовали для первичных волокон конопли, при этом анализировали растения на двух фазах развития, интервал между которыми составлял 50 дней. Для большей части стебля обнаружили, что количество волокон не возрастало (рис. 2), следовательно, первичные волокна конопли, находящиеся на стадии удлинения были локализованы выше по стеблю. Таким образом, в стебле конопли, как и у льна, период интрузивного роста первичных волокон непродолжителен, а удлиняющиеся первичные волокна локализованы только в верхней части стебля.

При сравнении числа вторичных волокон конопли на поперечных срезах на одном и том же уровне стебля в ходе развития растений наблюдали, что их количество в растениях второго срока фиксации возрастало в несколько раз (рис. 2). Вклад в увеличение числа вторичных волокон могли вносить два одновременно протекающих процесса: новообразование волокон в результате деятельности камбия и удлинение в ходе интрузивного роста уже имеющихся волокон.

Для исследования характера интрузивного роста вторичных волокон конопли проводили анализ поперечных серийных срезов стебля на уровне 3 междоузлия с шагом 9-12 мкм. Наблюдали равномерное утолщение клеточной стенки по всей длине волокна, отсутствовали тонкостенные кончики с первичной клеточной стенкой на фоне остальной части клетки с вторичным утолщением. Равномерное утолщение волокна – доказательство в пользу разграниченности стадий интрузивного удлинения и формирования вторичной клеточной стенки вторичных волокон конопли. Тонкостенные волокна наблюдали только в непосредственной близости к камбию, на расстоянии 3-4 слоев, а это значит, что и у вторичных волокон интрузивный рост непродолжителен и может продолжаться не более недели.

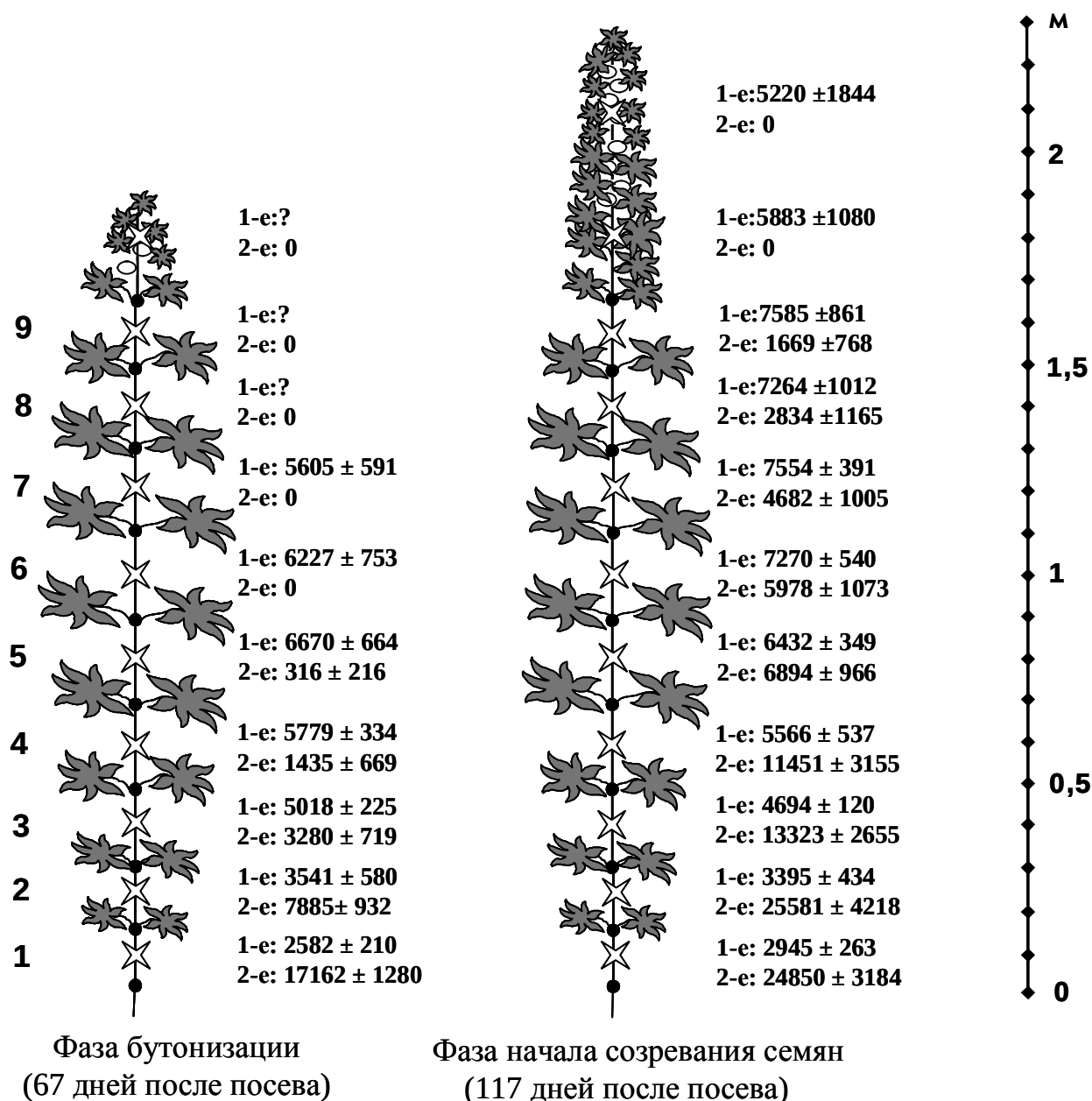


Рис. 2. Схема подсчета и число волокон на поперечных срезах стебля конопли сорта Диана. ☆ - Участок поперечного среза стебля; 1-9 – междоузлия стебля; 1-е – количество первичных волокон на поперечном срезе стебля; 2-е – количество вторичных волокон на поперечном срезе стебля; ? – число волокон не установлено.

2.3. Формирование вторичной клеточной стенки волокон конопли

2.3.1. Состав клеточной стенки волокон конопли. Основную массу клеточной стенки волокон конопли составляла целлюлоза, содержание которой в первичных волокнах было $86,8 \pm 0,6\%$, во вторичных – $80,0 \pm 0,0\%$. Высокая доля целлюлозы, аксиальное расположение ее микрофибрилл (Roland, et al., 1995) и низкая степень лигнификации клеточной стенки (Bonatti et al., 2004; Cronier et al., 2005) позволяют предполагать, что волокна конопли формируют клеточную стенку желатинозного типа.

Для сопоставления состава клеточных стенок первичных и вторичных волокон конопли мы отделяли их после частичной мацерации ткани. Моносахаридный

состав обычно анализируемых фракций, извлекаемых оксалатом аммония и щелочью у них сходен. Можно отметить более высокое содержание ксилозы у вторичных волокон.

Особый интерес для нас представляли полимеры, прочно связанные с целлюлозой, которые не извлекаются даже концентрированной щелочью. В клеточной стенке волокон льна эти полимеры представлены тканеспецифичным галактаном; отработан метод выделения этих полисахаридов в полимерной форме, который заключается в растворении целлюлозы органическим растворителем, ее гидролизе целлюлазой и отделении матричных полисахаридов путем гель-фильтрации (Gurjanov et al., 2007b). Прочно связанные с целлюлозой полисахариды присутствовали и в первичных, и во вторичных волокнах и имели сходный состав. Моносахариды большинства фракций представлены галактозой, рамнозой и галактуроновой кислотой (табл. 1). Это свидетельствует о том, что полимеры построены аналогично тканеспецифичному полисахариду волокон льна и состоят из рамногалактуронанового остова и боковых цепочек из бета-1,4-галактозы. Возможность такого вывода подтвердили данные иммуноферментного анализа с использованием моноклонального антитела LM5, результаты которого позволили установить присутствие β -1,4-галактозы во фракциях полисахаридов, прочно связанных с клеточной стенкой волокон конопли. Таким образом, наличие галактозосодержащих полимеров, прочно связанных с целлюлозой – характерная черта клеточных стенок желатинозного типа.

Табл. 1. Содержание моносахаридов (моль%, мкг/мг клеточной стенки) во фракциях прочно связанных с целлюлозой полисахаридов клеточной стенки первичных волокон конопли. 1-4 – фракции после деления полимера на колонке с Сефарозой CL-4B

№ фракции	Рам	Ара	Гал	Глю	Кси, Ман*	ГалК	ГлюК
1, моль%; мкг/мг к.ст.	23,6 $\pm$ 0,1 0,1 $\pm$ 0,0	0,1 $\pm$ 0,1 следы	28,7 $\pm$ 0,1 0,2 $\pm$ 0,0	0,1 $\pm$ 0,1 следы	0,3 $\pm$ 0,1 следы	47,1 $\pm$ 0,3 0,3 $\pm$ 0,0	0,1 $\pm$ 0,0 следы
2, моль%; мкг/мг к.ст.	22,3 $\pm$ 0,1 0,2 $\pm$ 0,0	0,8 $\pm$ 0,2 следы	26,1 $\pm$ 0,5 0,2 $\pm$ 0,1	0,0 $\pm$ 0,0 0,0 $\pm$ 0,0	2,2 $\pm$ 0,2 следы	47,3 $\pm$ 1,1 0,5 $\pm$ 0,0	1,3 $\pm$ 0,1 следы
3, моль%; мкг/мг к.ст.	11,5 $\pm$ 2,2 следы	1,9 $\pm$ 0,2 следы	30,8 $\pm$ 3,2 0,1 $\pm$ 0,0	0,3 $\pm$ 0,0 следы	16,9 $\pm$ 0,1 0,1 $\pm$ 0,0	31,2 $\pm$ 6,1 0,1 $\pm$ 0,1	7,5 $\pm$ 0,6 следы
4, моль%; мкг/мг к.ст.	1,2 $\pm$ 0,3 следы	2,3 $\pm$ 0,0 следы	18,8 $\pm$ 1,6 0,1 $\pm$ 0,0	31,1 $\pm$ 5,8 0,2 $\pm$ 0,0	22,5 $\pm$ 2,4 0,3 $\pm$ 0,0	22,4 $\pm$ 10,2 0,2 $\pm$ 0,1	1,6 $\pm$ 0,1 следы

Примечание: *частично ксилоза и манноза представляют собой примеси, использованного препарата целлюлазы.

2.3.2. Ультраструктурный анализ клеточной стенки волокон конопли. При анализе ультраструктуры волокон льна была выявлена интенсивная модификация отложенных слоев вторичной клеточной стенки (Gorshkova et al., 2004, 2005). Для проверки ее наличия в волокнах конопли анализировали характер формирования вторичной клеточной стенки первичных и вторичных волокон. У конопли, так же как у льна, не все волокна, находящиеся на одном уровне стебля, одновременно

наращивают вторичную клеточную стенку. Для первичных волокон характерно, что первыми формируют вторичную клеточную стенку волокна, расположенные на периферии пучка (Esaу, 1943; Gorshkova et al., 2004). Неравномерное утолщение волокон в пучке дает возможность проследить динамику формирования вторичной клеточной стенки на одном уровне стебля. Вторичные волокна, расположенные на одном уровне стебля, не только имеют вторичную клеточную стенку различной толщины, но и находятся на разных стадиях развития, что связано с их образованием в результате деятельности вторичной меристемы. Образцы для ультраструктурного анализа клеточной стенки волокон конопли отбирали из средней части стебля растений в фазе бутонизации.

Вторичная клеточная стенка первичных волокон была более развита и достигала толщины в 7 мкм, тогда как клеточная стенка вторичных волокон на этом же уровне стебля не превышала 2 мкм (табл. 2). Вторичная клеточная стенка как первичных, так и вторичных волокон была неравномерна по составу и структуре; наблюдали три различающихся слоя S_1 , S_2 , S_3 . Слои S_1 , S_2 имели однородную структуру; слой S_3 выглядел как «полосатый». Подобную структуру имела вторичная клеточная стенка флоэмных волокон льна: так же присутствовал внутренний «полосатый» слой и наружный электроннопрозрачный слой (Сальников и др., 1993; Gorshkova et al., 2003, 2005), однако слой S_1 не был выражен так четко, как в волокнах конопли.

Табл. 2. Толщина вторичной клеточной стенки и отдельных ее слоев у первичных и вторичных флоэмных волокон конопли на поперечных срезах срединной части стебля растений в фазе бутонизации (67 дней после посева)

Толщина вторичной клеточной стенки, мкм	Толщина слоев вторичной клеточной стенки, мкм			Суммарная толщина слоев, мкм	n
	S ₁	S ₂	S ₃		
Первичные волокна					
<1,5	0,22±0,04	0,58±0,13	0,40±0,04	1,19±0,09	5
1,5-3,0	0,19±0,01	1,61±0,19	0,52±0,09	2,32±0,22	7
3,0-4,5	0,26±0,02	2,51±0,11	0,75±0,03	3,52±0,13	11
>4,5	0,27±0,03	4,40±0,45	0,96±0,08	5,64±0,44	7
Вторичные волокна					
<1,5	0,48±0,04	—	0,52±0,09	1,00±0,11	5
	0,47±0,03	0,40±0,05	0,47±0,04	1,34±0,05	10
>1,5	0,51±0,02	0,97±0,10	0,58±0,03	2,07±0,10	22

Примечание: n – число повторностей.

После отложения слоя S_1 , его толщина сохранялась постоянной на протяжении всего формирования вторичной клеточной стенки волокон конопли (табл. 2). Во вторичных волокнах слой S_1 был толще, чем в первичных и составлял, в среднем, 0,49 мкм, тогда как слой S_1 в первичных волокнах на разных этапах развития клетки составлял, в среднем, 0,25 мкм (табл. 2).

В процессе формирования вторичной клеточной стенки волокон конопли вслед за слоем S_1 откладывался «полосатый» слой S_3 (табл. 2). Слой S_3 подвергался модификации и преобразовывался в S_2 , толщина которого в первичных и вторичных волокнах конопли возрастала в ходе развития (табл. 2, рис. 3). В то же время со стороны плазмалеммы происходило постоянное пополнение S_3 слоя новыми полисахаридами клеточной стенки. В зрелых волокнах льна слой S_3 исчезает (Сальников и др., 1993; Gorshkova et al., 2003, 2005), то же происходит и в волокнах конопли. Таким образом, для волокон конопли, так же как и для волокон льна, характерна интенсивная модификация новообразованных слоев вторичной клеточной стенки.

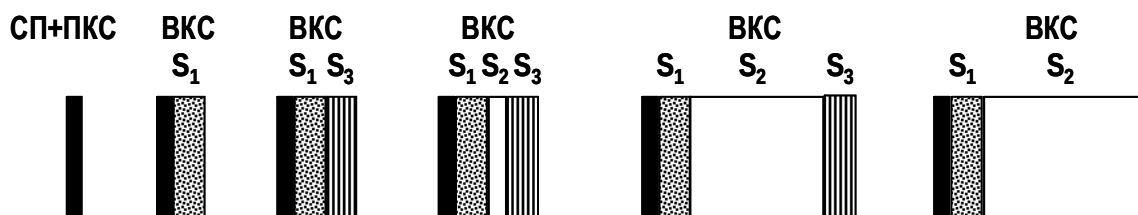


Рис. 3. Схема отложения слоев вторичной клеточной стенки в первичных и вторичных флоэмных волокнах конопли. СП – срединная пластинка, ПКС – первичная клеточная стенка, ВКС – вторичная клеточная стенка, S_1 , S_2 , S_3 – слои вторичной клеточной стенки.

В цитоплазме волокон льна в период интенсивного формирования вторичной клеточной стенки обнаружена необычная динамика поведения пузырьков аппарата Гольджи (Salnikov et al., 1993; Gorshkova et al., 2005). В волокнах конопли в период синтеза желатинозных слоев вторичной клеточной стенки также были обнаружены пузырьки аппарата Гольджи, внешний вид и необычная динамика поведения которых были аналогичны пузырькам волокон льна.

2.3.3. Иммуномечение моноклональным антителом LM11 клеточной стенки волокон конопли и льна. Отличительной чертой волокон конопли, по сравнению с волокнами льна, являлся четко различимый слой S_1 , что позволяет делать предположение об иной, отличной от слоев S_2 и S_3 его природе. В волокнах древесины напряжения формированию желатинозного слоя вторичной клеточной стенки предшествует отложение одного или нескольких слоев ксиланового типа (Fahn, 1990). Кроме того, в желатинозных волокнах древесины напряжения описано характерное расслаивание вторичной клеточной стенки на границе ксиланового и желатинозного слоев, что происходит вследствие фиксации (Clair et al., 2005). На поперечных срезах волокон конопли также наблюдали расслаивание, проходящее по границе слоя S_1 с остальными слоями вторичной клеточной стенки. Во вторичных волокнах толщина слоя S_1 выше, чем в первичных, при этом в составе клеточной стенки выше доля ксилозы. Все эти факты позволили сделать предположение о ксилановой природе слоя S_1 вторичной клеточной стенки волокон конопли.

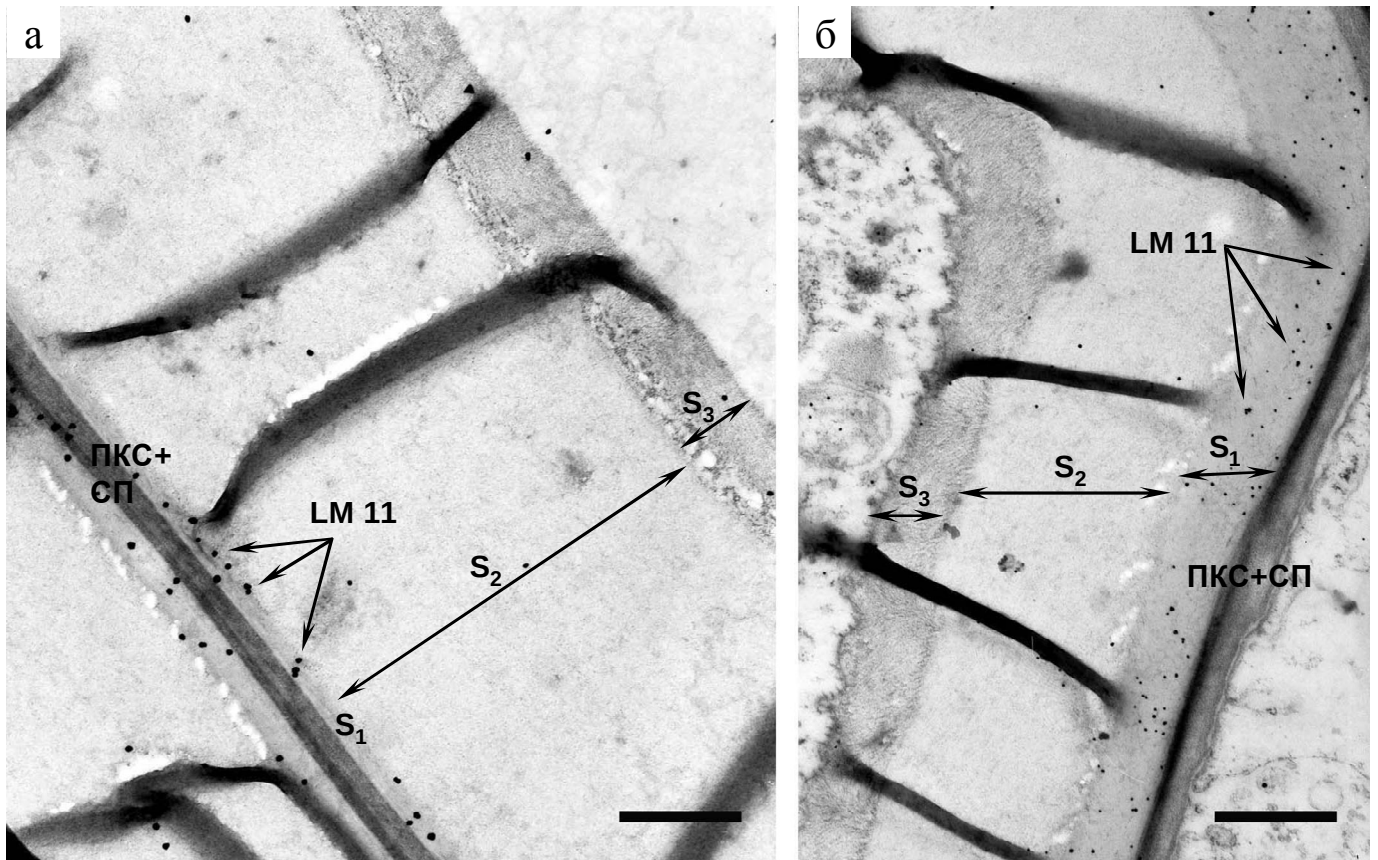


Рис. 4. Иммуномечение клеточных стенок волокон конопли моноклональным антителом LM11; *а* – первичные волокна; *б* – вторичные волокна. СП – срединная пластинка; ПКС – первичная клеточная стенка; ВКС – вторичная клеточная стенка; S_1 , S_2 , S_3 – слои вторичной клеточной стенки. Ваг – 1 мкм.

Для проверки предположения использовали метод иммуномечения клеточной стенки волокон конопли антителом на ксилан. Присутствие моноклонального антитела LM11, специфичного к эпитопам β -(1→4)-D-ксилана, наблюдали в слое S_1 первичных и вторичных волокон (рис. 4*а*, *б*). Метка на ксилан отсутствовала в остальных слоях вторичной клеточной стенки волокон. В ксилеме метка распределялась равномерно по всей толщине вторичной клеточной стенки.

В клеточной стенке волокон льна отсутствовал четко выраженный слой S_1 и, тем не менее, во внешней части вторичной клеточной стенки так же, как и в волокнах конопли, присутствовали эпитопы для антитела LM11. Распределение метки при этом было более рыхлым и неравномерным. Таким образом, во вторичной клеточной стенке желатинозного типа образованию желатинозного слоя всегда предшествует отложение ксиланового.

2.4. Тканеспецифичный галактан волокон конопли

Ключевую роль в биогенезе флоэмных волокон льна играет тканеспецифичный полимер клеточной стенки - β -(1→4)-D-галактан, присутствующий в буферорастворимой фракции волокон на этапе формирования вторичной клеточной стенки (Gorshkova et al., 1996, 2004, 2005). Тканеспецифичный галактан волокон льна представляет собой рамногалактуронан I с высокой степенью ветвле-

ния остатков рамнозы (до 90%) и с боковыми цепочками разной длины, состоящими из β -1,4-галактозы; последние составляют основную массу полимера и определяют его название (Гурьянов и др., 2006; Gurjanov et al., 2007a). Предстояло выяснить, имеется ли полимер с аналогичными характеристиками в волокнах конопли.

Биохимический анализ буферорастворимой фракции флоэмной части стебля конопли позволил установить присутствие высокомолекулярного (2000 кДа) полисахарида. Элюирующий в этой области полисахарид был обнаружен и в первичных, и во вторичных флоэмных волокнах конопли, однако отсутствовал в ксилемной части стебля и в листьях. Не обнаружен высокомолекулярный полимер и в верхней части стебля, где расположены интрузивно удлиняющиеся волокна. Следовательно, подобно галактану флоэмных волокон льна (Gorshkova et al., 1996, 2004; Gorshkova, Morvan, 2006), буферорастворимый полимер конопли – ткане- и стадиеспецифичен. Анализ моносахаридов высокомолекулярного полимера волокон конопли показал, что основным моносахаридом была галактоза, содержание которой составляло от 35 до 50 моль%.

Тканеспецифичный галактан волокон льна эффективно метится антителом LM5, эпитопом которого служит тетрамер галактозы, связанный β -(1 $\rightarrow$ 4)-связью (Jones et al., 1997). Иммуноферментный анализ с использованием антитела LM5 позволил установить присутствие β -(1 $\rightarrow$ 4)-D-галактозы в тканеспецифичном полимере буферорастворимой фракции волокон конопли. Полимеры, выделенные из различных участков стебля конопли (третье и восьмое междоузлие) имели различную интенсивность иммуномечения, при этом она была в сотни раз ниже, чем интенсивность иммуномечения галактана льна. Вероятно поэтому, при иммуномечении LM5 ультратонких срезов не выявлена метка в слоях вторичной клеточной стенки первичных и вторичных волокон. Результаты иммуномечения дают основание предполагать, что галактан конопли отличается от галактана льна более низким содержанием тетрамеров β -(1 $\rightarrow$ 4)-D-галактозы, и что его состав отличается в различных участках стебля.

Буферорастворимый полимер волокон конопли анализировали ^1H ЯМР спектроскопией. ^1H ЯМР спектры, полученные при анализе полимера волокон сопоставляли с опубликованными данными спектров галактанов (Colquhoun et al., 1990; Davis et al., 1990; Гурьянов и др., 2006, Gurjanov et al., 2007b). Спектр ЯМР полисахарида молодых волокон конопли (восьмое междоузлие) сходен со спектром высокомолекулярного галактана льна (рис. 5а, б). Сигналы в области 3,67 - 3,69 м.д. относятся к H2 и H5 1,4-связанной галактозе; пики в областях 3,76 - 3,79 м.д. – H3 и H6 1,4-гактозе. Сигнал 4,17 м.д. относится к H4 1,4-связанной галактозе. Сигналы в областях 3,53 и 3,91 м.д. относятся к H2 и H4 терминальной галактозе.

На ^1H ЯМР спектре полисахарида зрелых волокон конопли (третье междоузлие) наблюдали возрастание сигналов H4 и H2 терминальной галактозы в областях 3,91 и 3,53 м.д., соответственно (рис. 5в). Заметно сократилась интенсивность ответа в районе 3,79 м.д. по сравнению с сигналами в областях 3,76 -

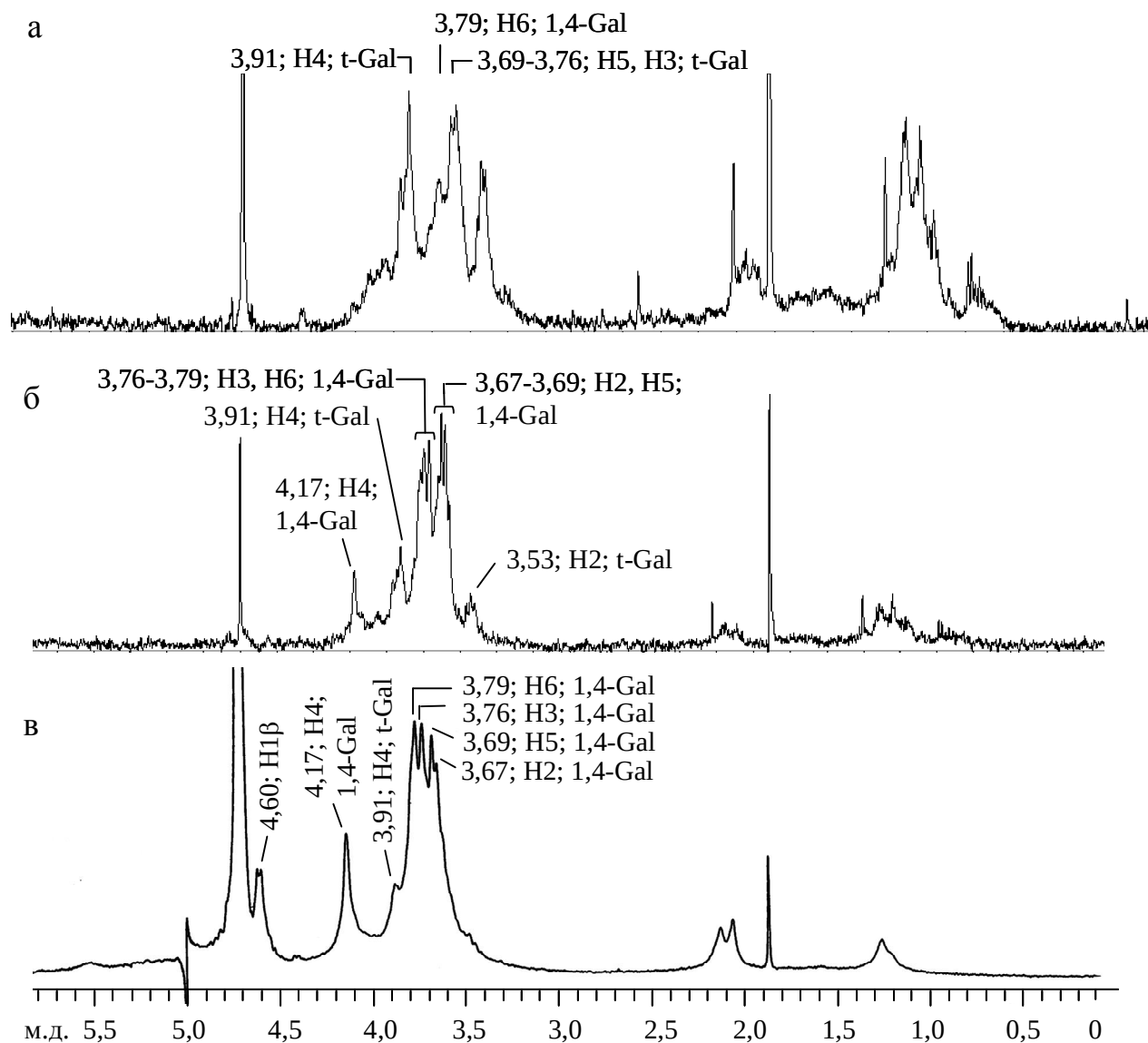


Рис. 5. ^1H ЯМР спектры буферорастворимых тканеспецифичных полисахаридов волокон льна и конопли; а – третье междоузлие стебля конопли; б – восьмое междоузлие стебля конопли; в – стебель льна (по Gurjanov et al., 2007b).

3,69 м.д. Практически отсутствовал Н4 сигнал 1,4-связанной галактозы (4,17 м.д.). Сигналы в областях 3,69, 3,76 и 3,79 м.д. относятся к Н5, Н3 и Н6 терминальной галактозы, соответственно (рис. 5в). Уширенные сигналы в спектрах полимеров волокон конопли и льна в районе 1,00-2,00 м.д. и 3,00-4,00 м.д., вероятно, принадлежат белку (каталог сигналов ЯМР аминокислот, Aldrich).

Буферорастворимый полимер волокон конопли, выделенный из третьего междоузлия стебля, содержал, вероятно, лишь следы 1,4-связанной галактозы. Высокая интенсивность сигналов в областях 3,53 и 3,91 м.д. (рис. 5в) свидетельствует о том, что полисахарид содержал главным образом терминальную галактозу. Следовательно, в полимере из нижней части стебля конопли значительная доля боковых цепочек состояла только из одного остатка галактозы.

Таким образом, ткане- и стадиеспецифичный полисахарид волокон конопли имел ряд характеристик, аналогичных тканеспецифичному галактану льна:

1) буферорастворимый полимер волокон конопли при гель-фильтрации на Сефарозе CL-4В элюировал в области 2000 кДа; 2) основным моносахаром тканеспецифичного полимера волокон конопли была галактоза, которая составляла 35-50 моль% полисахарида; 3) методами ^1H ЯМР спектроскопии и иммуномечения LM5 в буферорастворимой фракции волокон конопли обнаружен β -1,4-тип связи галактозных остатков; 4) в клеточной стенке полимер обнаруживается во фракции полисахаридов, прочно связанных с целлюлозой.

Однако были выявлены некоторые особенности тканеспецифичного галактана волокон конопли. Полисахарид волокон конопли имел значительно более низкое соотношение β -1,4-типа связи галактозных остатков по сравнению с другими типами связи, что выражалось в слабом иммуномечении антителом LM5 его буферорастворимых фракций и слабых ответах на ^1H ЯМР спектрах.

Тканеспецифичный галактан волокон конопли, выделенный из разных участков стебля, различался по содержанию галактозы и соотношению ее линейных и терминальных остатков. Это может указывать на вариабельность параметров галактана волокон конопли, которую сложно было ожидать, учитывая ткане- и стадие-специфичность полимера. Это побудило нас сопоставить вариабельность состава галактана у разных образцов, отличавшихся по генотипу и условиям выращивания.

2.5. Вариабельность параметров тканеспецифичного галактана желатинозных волокон

Для установления степени вариабельности тканеспецифичного галактана волокон различного происхождения был проведен анализ его содержания и средней степени полимеризации боковых цепочек. При этом использовали растения льна 23 различных генотипов из коллекции ВИР, выращенных в разные годы и в различающихся абиотических условиях. Общее количество проанализированных образцов составило 56. Содержание галактана в стеблях льна и конопли находилось в пределах от 1 до 9 мкг/см.

Средняя степень полимеризации боковых галактановых цепочек тканеспецифичного полимера волокон льна в проанализированных образцах варьировала от 5 до 41 (рис. 6). Тканеспецифичный галактан волокон конопли, выделенный из верхней части стебля (восьмое междоузлие), имел среднюю степень полимеризации боковых цепочек равную 10. Этот же показатель для галактана, выделенного из нижней части стебля конопли (третье междоузлие) составил 3.

В образцах одного и того же генотипа льна, собранных в различные сезоны или с различных делянок, отмечали как высокие, так и низкие значения для содержания тканеспецифичного галактана и средней длины его боковых цепочек (рис. 6). Размах изменений этих показателей у одного генотипа сопоставим с их различиями у разных генотипов. Это значительно затрудняет выделение генетической составляющей варьирования.

Между тем исследуемый полисахарид – тканеспецифичный полимер клеток, формирующих клеточную стенку желатинозного типа. Возникает вопрос, какие

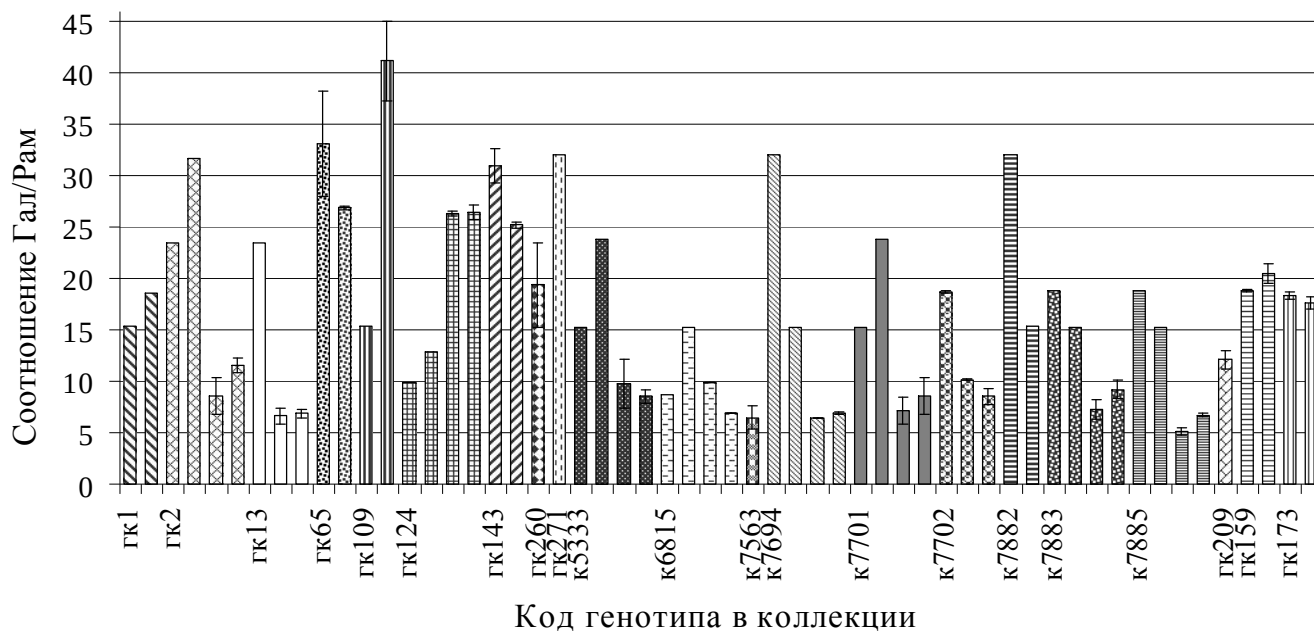


Рис. 6. Средняя степень полимеризации боковых цепочек тканеспецифичного галактана волокон различных генотипов льна (соотношение галактозы и рамнозы, моль%/моль%). Значения для образцов одного и того же генотипа представлены столбцами с одинаковой заливкой.

именно характеристики этого полимера определяют его функциональную роль? Рамногалактуронан I с боковыми цепочками из β -1,4-галактозы может встречаться и в клеточных стенках других типов, во всяком случае, он выявляется в различных тканях с помощью антитела LM5 (Jones et al., 1997; McCartney et al., 2000, 2003). Отличительными чертами галактана желатинозных волокон могут быть: а) высокая степень полимеризации; б) высокий процент замещенных остатков рамнозы; в) сочетание в полимере длинных и коротких боковых цепочек; г) особый характер ветвления боковых цепочек; д) наличие минорных, не охарактеризованных пока компонентов (например, феруловой кислоты); е) небольшие количества остатков галактозы, тип связи которых отличается от β -1,4-связи (например β -1,3 или β -1,6). Широкое варьирование состава галактана при отсутствии резких нарушений в формировании клеточной стенки волокон указывает, что этот полимер может иметь еще одну, неизвестную на данный момент функцию.

2.6. Блочный характер синтеза тканеспецифичного галактана желатинозных волокон

При анализе длины боковых галактозных цепочек тканеспецифичного галактана волокон льна обнаружили, что этот показатель имеет дискретный характер, что хорошо видно при ранжировании образцов по значению параметра, которое выявляет группы с очень близкими значениями (рис. 7). При этом различные образцы не отличались по положению пика, характерного для галактана на профиле элюции при гель-хроматографии на Сефарозе 4В. Этот пик всегда имел максимум в области 2000 кДа и снижался в области 900 кДа (Gorshkova et al., 2005;

Gorshkova, Morvan, 2006). У галактана с различной степенью полимеризации, который выходил в различных участках профиля элюции одного образца, существенных различий в составе моносахаридов не обнаружили. Т. е. фракции полисахарида, элюирующие в областях 2000 и 900 кДа, имели приблизительно равные значения средней степени полимеризации боковых галактановых цепочек. Ни один из остальных проанализированных показателей не имел дискретного характера.

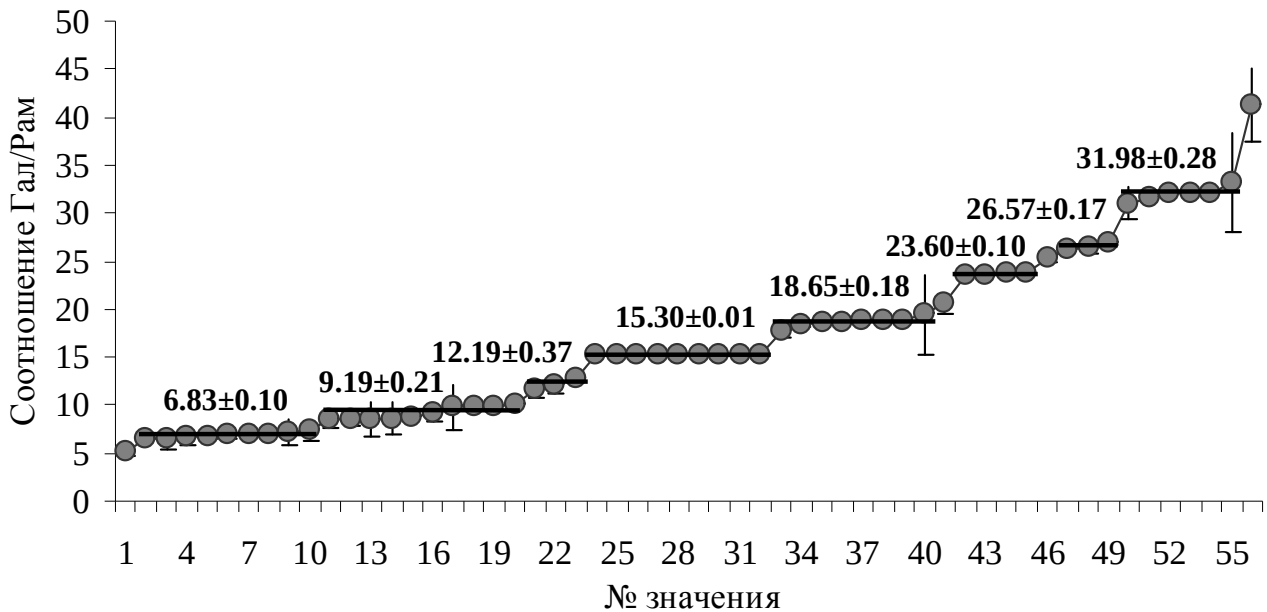


Рис. 7. Ранжированный (от меньшего к большему) ряд значений длин боковых цепочек тканеспецифичного галактана волокон льна со средними значениями выявленных дискретных групп. Разница между средними значениями дискретных групп достоверна ($P < 0,001$).

Данные о дискретности значений средней степени полимеризации боковых цепочек галактана представляют значительный интерес. Считают, что синтез полисахаридов в аппарате Гольджи происходит путем присоединения единичных моносахаридов (в активированной форме) к растущей цепочке полимера (Fry, 1988, с. 188; Carpita, 2000). Такой тип формирования полисахарида не может объяснить дискретный характер значений средней длины боковых цепочек, выявленный в наших экспериментах. Существуют немногочисленные работы, в которых показано, что различные полисахариды могут взаимодействовать друг с другом в аппарате Гольджи с образованием высокомолекулярных комплексов. Так происходит, например, в быстро удлиняющихся клетках злаковых, где арабиноксилан секретируется в виде комплекса молекул, соединенных ковалентными связями через мостики из феруловой кислоты (Fry, 1988). Синтезируемый микросомальной фракцией эпикотилей гороха галактан образует сложный высокомолекулярный комплекс, содержащий полигалактуроновую кислоту, рамногалактуронан I и ксилоглюкан, связанные, вероятно, ковалентно (Rizk et al., 2000; Abdel-Massih et al.,

2003). Молекулы ксилоглюкана могут связываться между собой в аппарате Гольджи так, что их масса возрастает с 300 до 2000 кДа; механизм этого процесса пока не ясен (Kerr, Fry, 2003). Судя по выявленному нами скачкообразному изменению средней степени полимеризации боковых цепочек галактана, при его формировании происходят взаимодействия полимерных участков, а значит, и сборка индивидуального полисахарида идет не по принципу, характерному для остальных полисахаридов клеточной стенки, когда сначала формируется остов, а затем боковые цепочки, а может иметь блочный характер.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проанализированы стадии биогенеза первичных и вторичных флоэмных волокон конопли. Показано, что закономерности развития растительных волокон, установленные ранее на примере волокон льна (Gorshkova et al., 1996; 2003, 2005; Горшкова и др., 2003), имеют место при формировании волокон филогенетически отдаленного вида, а также волокон, образованных другой меристематической тканью. В волокнах различного происхождения интрузивное удлинение предшествует образованию вторичной клеточной стенки, а не сочетается с ним, как считалось ранее. Флоэмные волокна льна и конопли формируют вторичную клеточную стенку желатинозного типа. В ходе ее образования синтезируется ткане- и стадийноспецифичный полисахарид, устроенный у различных волокон по сходному принципу: остов из рамногалактуронана и боковые цепочки из β -1,4-галактозы. Слои вторичной клеточной стенки желатинозных волокон подвергаются интенсивной модификации. Формированию желатинозных слоев клеточной стенки предшествует отложение ксиланового слоя.

При четко выраженных общих закономерностях, биогенез волокон различного происхождения имеет ряд особенностей. Первичные флоэмные волокна льна и конопли относятся к числу наиболее длинных клеток. Вторичные флоэмные волокна значительно короче, их интрузивный рост протекает с меньшей эффективностью. Такое различие в размерах волокон связано, вероятно, с их расположением в стебле, механическими свойствами соседних тканей и величиной усилия, которое волокна вынуждены применять для осуществления интрузивного роста.

В волокнах льна и конопли наблюдали различную степень выраженности ксиланового слоя вторичной клеточной стенки, что объясняет, вероятно, известную разницу в степени их лигнификации (Bonatti et al., 2004; Cronier et al., 2005). Лигнификация затрагивает внешние (ксилановые) слои вторичной клеточной стенки. Она происходит на поздних стадиях развития волокон; поступающие из цитоплазмы мономеры лигнина должны проникнуть через толстый S_2 слой, однако их полимеризация в желатинозных слоях не происходит. Это делает клеточную стенку флоэмных волокон интересной моделью для изучения регуляции лигнификации.

Неожиданным результатом работы стало установление вариабельности структуры тканеспецифичного полисахарида, присутствующего в волокнах на этапе формирования вторичной клеточной стенки, а также дискретности в значениях средней степени полимеризации его боковых цепочек. Тем больший интерес представляет дальнейшее исследование метаболизма и функциональной роли этого полимера.

Полисахариды желатинозного и ксиланового слоев различаются по химическому составу и характеру отложения. Соответственно, расположение микрофибрилл целлюлозы имеет строго спиральную ориентацию в ксилановом слое и продольную в желатинозных слоях вторичной клеточной стенки флоэмных волокон льна (Roland et al., 1995). Кардинально отличный состав ключевых полисахаридов матрикса, сложная перестройка активности аппарата Гольджи, интенсивная модификация уже отложенных слоев клеточной стенки, наблюдаемые при формировании слоев с аксиальным расположением микрофибрилл целлюлозы, заставляют предполагать, что ориентация микрофибрилл определяется не только цитоскелетом, но и свойствами полисахаридов матрикса.

Переход с синтеза первичной клеточной стенки на формирование вторичной у всех проанализированных волокон происходит всегда в строгой последовательности: сначала образуется ксилановый тип вторичной клеточной стенки и только затем галактановый. Осознание причин и механизмов смены типа синтезируемой клеточной стенки – одна из интересных задач для дальнейших исследований.

ВЫВОДЫ

1. Установлено, что период интрузивного роста первичных и вторичных флоэмных волокон конопли непродолжителен и отделен от стадии формирования вторичной клеточной стенки, аналогично характеру интрузивного удлинения волокон льна.

2. Обнаружено, что в первичных и вторичных флоэмных волокнах конопли формирование клеточной стенки желатинозного типа сопровождается интенсивной модификацией уже отложенных слоев, подобной изменениям в структуре слоев клеточной стенки волокон льна.

3. Впервые установлено, что во флоэмных волокнах желатинозного типа формированию галактановых слоев предшествует синтез ксиланового слоя. Толщина и структура ксиланового слоя неодинаковы у волокон различного происхождения.

4. Выявлен высокомолекулярный тканеспецифичный полисахарид клеточной стенки волокон конопли - β -(1→4)-галактан, присутствующий в буферорастворимой фракции волокон, находящихся на этапе формирования вторичной клеточной стенки.

5. Установлено, что тканеспецифичный галактан волокон конопли образует прочно связанные с целлюлозой клеточной стенки комплексы, аналогично тканеспецифичному галактану волокон льна.

6. Впервые обнаружена высокая вариабельность состава тканеспецифичного галактана желатинозных волокон в пределах растений одного генотипа, а также в различных участках стебля. Средняя степень полимеризации боковых галактановых цепочек тканеспецифичного полимера желатинозных волокон варьировала от 3 до 41.

7. Впервые установлено, что показатели длины боковых цепочек тканеспецифичного галактана волокон льна имеют дискретный характер, что позволяет выдвигать предположение о блочном характере сборки полисахарида в аппарате Гольджи.

Список публикаций по теме диссертации

1. **Чернова, Т.Е.** Этапы развития флоэмных волокон стебля льна / Т.Е. Чернова // Материалы XLI Международной студенческой конференции «Студент и научно-технический прогресс». - Новосибирск, 2003. - С.42-43.

2. Ультраструктурная характеристика роста и развития лубяных волокон льна / М.В. Агеева, А.В. Снегирева, **Т.Е. Чернова**, Т.А. Горшкова // V Съезд Общества физиологов растений России и Международная конференция «Физиология растений – основа фитобиотехнологии»: Сб. тезисов. - Пенза, 2003. – С.369.

3. Стадии формирования лубяных волокон *Linum usitatissimum* L. / Т.А. Горшкова, М.В. Агеева, В.В. Сальников, Н.В. Павленчева, А.В. Снегирева, **Т.Е. Чернова** и др. // Ботанический журнал. - 2003. - Т 88. - № 12. - С.1-11.

4. Волокна склеренхимы: стадии развития / **Т.Е. Чернова**, А.В. Снегирева, М.В. Агеева и др. // Материалы VIII Молодежной конференции ботаников. - Санкт-Петербург, 2004. - С.114.

5. Dynamic polysaccharide of the fiber cell wall / N. Pavlencheva, O. Gurjanov, V. Salnikov, M. Ageeva, S. Chemiksova, **T. Chernova** et al. // X Cell Wall Meeting: Abstract book. - Sorrento, Italy, 2004. - P.126.

6. Исследование волокон склеренхимы как предпосылка улучшения качества волокон льна / С.Б. Чемикосова, М.В. Агеева, В.В. Сальников, Н.В. Павленчева, **Т.Е. Чернова** и др. // Материалы Международной научно-практической конференции / Проблемы повышения технологического качества льна-долгунца. - Торжок, 2005. - С.57-68.

7. Формирование первичных и вторичных волокон конопли / **Т.Е. Чернова**, М.В. Агеева, С.Б. Чемикосова, Т.А. Горшкова // Вестник Всероссийского научно-исследовательского института по переработке лубяных культур. - 2005. - № 2. - С.6-13.

8. Разнообразие растительных волокон и закономерности их формирования / **Т.Е. Чернова**, Т.А. Горшкова, Н.Б. Брач, Е.А. Пороховинова // Годичное собрание Общества физиологов растений России и международной конференции «Физиологические и молекулярно-генетические аспекты сохранения биоразнообразия»: Сб. тезисов. - Вологда, 2005. – С.184.

9. Характеристика интрузивного роста флоэмных волокон льна-долгунца *Linum*

usitatissimum L. / А.В. Снегирева, М.В. Агеева, В.В. Сальников, **Т.Е. Чернова** и др. // Вопросы общей ботаники: традиции и перспективы. - Ч.1. / Материалы Международной научной конференции, посвященной 200-летию Казанской ботанической школы.- Казань, 2006.- С.159-160.

10. Биогенез растительных волокон различного происхождения / **Т.Е. Чернова**, М.В. Агеева, О.П. Гурьянов и др. // Вопросы общей ботаники: традиции и перспективы. - Ч.1. / Материалы Международной научной конференции, посвященной 200-летию Казанской ботанической школы. - Казань, 2006. - С.167-168.

11. Маркеры желатинозных волокон / **Т.Е. Чернова**, М.В. Агеева, В.В. Сальников и др. // Материалы I (IX) Международной конференции молодых ботаников. - Санкт-Петербург, 2006. - С.216-217.

12. Особенности функционирования аппарата Гольджи при формировании клеточной стенки желатинозного типа / Н.Е. Мокшина, Т.А. Горшкова, Л.О. Ягодина, М.В. Агеева, Н.Н. Ибрагимова, В.В. Сальников, **Т.Е. Чернова** // Материалы I (IX) Международной конференции молодых ботаников. - Санкт-Петербург, 2006. - С.174.

13. Биоэлектрическая составляющая сигнальных систем в координации развития растительных волокон / А.В. Снегирева, **Т.Е. Чернова**, А.В. Анисимов и др. // II Международный симпозиум «Сигнальные системы клеток растений: Роль в адаптации и иммунитете»: Сб. тезисов. – Казань, 2006. - С.207.

14. Биогенез волокон склеренхимы / **Т.Е. Чернова**, А.В. Снегирёва, Н.Е. Мокшина, Т.А. Горшкова // Материалы годовичного собрания Общества физиологов растений России и конференции «Физиология растений – фундаментальная основа современной фитобиотехнологии». - Ростов-на-Дону, 2006. - С.168.

15. Анализ метаболизма индивидуального полимера клеточной стенки: тканеспецифичный галактан волокон льна / О.П. Гурьянов, С.Б. Чемикосова, П.В. Микшина, **Т.Е. Чернова** и др. // Материалы VI съезда Общества физиологов растений России и Международной конференции «Современная физиология растений: от молекул до экосистем».- Ч. 1.- Сыктывкар, 2007. - С.56-58.

16. Биогенез растительных волокон / **Т.Е. Чернова**, М.В. Агеева, В.В. Сальников и др. // Материалы VI съезда Общества физиологов растений России и Международной конференции «Современная физиология растений: от молекул до экосистем».-Ч. 3.-Сыктывкар, 2007.-С.441-443.

17. **Чернова, Т.Е.** Биогенез растительных волокон / Т.Е. Чернова, Т.А. Горшкова // Материалы Международного симпозиума «Клеточные, молекулярные и эволюционные аспекты морфогенеза». - Москва, 2007. - С.28-29.

18. Tissue-specific galactan in secondary cell wall of gelatinous type / О. Gurjanov, **T. Chernova**, S. Chemikosova et al. // XII Cell Wall Meeting: Abstract book. - Copenhagen, Denmark, 2007 / *Physiologia Plantarum*, 2007. – Vol. 130. 157.

19. Вариабельность состава тканеспецифичного галактана волокон льна / **Т.Е. Чернова**, О.П. Гурьянов, Н.Б. Брач и др. // Физиология растений. - 2007. - Т. 54, № 6. - С.876-884.

20. **Чернова, Т.Е.** Биогенез растительных волокон / Т.Е. Чернова, Т.А. Горшкова // Онтогенез. - 2007. - Т. 38, № 4. - С.271-284.