

О.М. НЕДУХА

Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України
вул. Терещенківська, 2, Київ, 01601, Україна

ІМУНОЦИТОХІМІЧНЕ ВИВЧЕННЯ ПЕРОКСИДАЗИ У ЛИСТКАХ ПОВІТРЯНО-ВОДНОЇ ТА СУХОДІЛЬНОЇ ФОРМ *SIUM LATIFOLIUM* L.

Ключові слова: пероксидаза, листки, *Sium latifolium*, конфокальна мікроскопія

Відомо, що водний дефіцит залежно від тривалості дії та рівня водного потенціалу спричинює зміни листків на різних рівнях організації: тканинному, клітинному і молекулярному. Навіть помірний водний дефіцит призводить до появи ксероморфних ознак, збільшення вмісту целюлози в оболонках мезофілу та епідермісу, ущільнення воскового нальоту на адаксіальному епідермісі та старіння клітин мезофілу [5, 8]. Насамперед у хлоропластах виявлялися злипання тилакоїдів або ж розрихлення гран, втрата рибосом, збільшення вмісту ненасичених жирних кислот, зниження швидкості електронного транспорту в тилакоїдах та руйнування тилакоїдних мембран під впливом вільних радикалів, які формуються внаслідок блокування електронного транспорту, що спричинює протеоліз хлоропластів та втрату хлорофілу [8, 11, 17]. Такі зміни, на наш погляд, опосередковані активацією пероксидаз.

Рослинна пероксидаза (КФ. 1.11.1.7) — поліфункціональний фермент, представлений численними ізоферментами, які, каталізуючи окислення цілого ряду органічних та неорганічних речовин, беруть участь у процесах росту та розвитку рослини як за умов нормального метаболізму, так і окисного стресу [2, 6, 15]. Зокрема, в детоксикації перекису водню, утвореного у процесі дисмутації супероксиду кисню [10, 11], полімеризації монолігнолів і формуванні ковалентних зв'язків в оболонках [13, 16], окисленні фенолів вакуолей [18], синтезі та окисленні індолілоцтової кислоти, руйнуванні цитокінінів, а також у взаємодії фітогормонів [6, 7].

При адаптації рослин до несприятливих факторів, зокрема низьких температур та короткочасного водного дефіциту, збільшувалася активність основних пероксидаз у проростках озимої пшениці та мембранній фракції, та зменшувалась активність кислих пероксидаз у цитоплазматичній фракції [6, 7]. Крім цього, нещодавно виявлено зміни ізоферментного складу пероксидази у коренях рослин, які перебували в умовах помірного водного дефіциту [4]. Проте участь пероксидаз в адаптації повітряно-водних рослин до помірного водного дефіциту остаточно не з'ясована. Раніше ми показали, що помірний водний дефіцит у природних умовах призводить до появи ксероморфних ознак листкових пластинок повітряно-водних рослин, а також ознак старі-

© О.М. НЕДУХА, 2006

ння клітин [5]. Враховуючи дані літератури, ми припускаємо, що одним із механізмів появи ксероморфних ознак та ознак старіння клітин може бути активація пероксидази і посиленій синтез лігніну, який акумулюється в оболонках старіючих клітин [13, 15]. Ми наводимо результати біохімічного вивчення активності пероксидаз, вмісту лігніну та імуноцитохімічного дослідження локалізації пероксидази в листових пластинках *Sium latifolium* L. за умов водного дефіциту.

Матеріал і методи досліджень

Листки повітряно-водної та суходільної форм *Sium latifolium* L. збирали у фазі цвітіння (червень). Особини повітряно-водної форми зростали у воді (глибина становила 30—70 см) уздовж берега р. Псьол (м. Велика Багачка Полтавської обл.), суходільної форми — у лісі, на віддалі до 25 м від берега. Об'єктом дослідження були перша пара листочків першого складного листка повітряно-водних та першого листка суходільних рослин.

Для біохімічних аналізів вирізали серединну частину листочків завширшки до 2 см, — від краю до центральної жилки трьох рослин повітряно-водної та трьох листків суходільної форм; центральну жилку листків не досліджували. Активність гваякол- та аскорбатпероксидази в екстрактах зі свіжих листків визначали за методом Н.П. Ярош та співавт. [9] у присутності екзогенних субстратів окислення (гваяколу чи аскорбінової кислоти, відповідно). Кількість продуктів реакції визначали за оптичною щільністю: при 470 нм — для гваяколу, при 265 нм — для аскорбінової кислоти. Лігнін із листків *S. latifolium* екстрагували згідно з протоколом [3].

Локалізацію пероксидази виявляли за допомогою імуноцитохімічного методу за протоколом [19]. У польових умовах смужечки листочків шириною 1—2 і довжиною до 10—12 мм від краю листочка до середньої жилки фіксували у розчині 3,7 %-го параформальдегіду на фосфатно-сольовому буфері, промивали буфером протягом 10—15 год при + 4 °С. Подальші процедури здійснювали в лабораторії. Матеріал інкубували у блокуючому буфері для блокування неспецифічного зв'язування. Після цього смужки листочків обробляли в розчині первинних моноклональних антитіл (10 μг/мл), промивали та інкубували у розчині вторинних антитіл (25 μг/мл), прикріплених до молекули пероксидази (хрону), кон'югованої із флуоресцеїнізоціанатом (ФІТС-пероксидаза). Промитий матеріал вміщували у гліцерин. У контрольному варіанті замість вторинних антитіл, кон'югованих із ФІТС, брали буфер. Флуоресценцію ФІТС-пероксидази при цьому не виявлено.

Препарати вивчали у конфокальному лазерному мікроскопі LSM 5 PASCAL (Zeiss, Німеччина). Комплекс ФІТС-пероксидаза відзначався зеленою флуоресценцією при довжині хвилі збудження 494 нм, а емісії — 516 нм; використовували об'єктиви x10 та x20. Дані з розподілу пероксидази у клітинах, а також вимірювання інтенсивності флуоресценції комплексу ФІТС-пероксидаза отримано за допомогою програмного забезпечення

PASCAL. Згідно з цією програмою інтенсивність флуоресценції комплексу ФІТС-пероксидаза прямо корелювала з відносним вмістом ферменту, бо метод імуноцитохімії із застосуванням зв'язаного ферменту дає можливість виявляти мінімальну кількість антигену (пероксидази), який зв'язувався з антитілами [1]. Інтенсивність флуоресценції пероксидази в антиклінальних оболонках епідермісу, а також оболонках мезофілу, ширина яких становила 0,4–0,5 мкм, визначали за величиною інтенсивності, яка припадала на крок виміру завширшки 0,4–0,5 мкм, просканованого на відповідній клітинній оболонці за програмою PASCAL. Для встановлення наявності автофлуоресценції хлорофілу, паралельно з виявленням ФІТС-пероксидази, ми використали другий канал лазерного мікроскопа з довжиною хвилі збудження 440 нм, а емісії — 660 нм. У виборці з 450–500 клітин підраховували кількість клітин мезофілу, оболонки яких містили пероксидазу. Одержані дані обробляли статистично за програмою БІО-8. Для цитохімічних і біохімічних досліджень використано хімічні реагенти фірм Sigma та Fluka.

Результати досліджень та їх обговорення

1. **Повітряно-водна форма.** Вологість ґрунту становила $71,8 \pm 3,4$ %, сонячна освітленість над верхньою поверхнею перших листків — $1500\text{--}1570$ μmol квантів/ m^2 сек $^{-1}$.

Встановлено, що в перших листочках першого складного листка активність аскорбатпероксидази була майже у 5 разів вищою за активність гваяколпероксидази (табл. 1).

Вміст лігніну досліджуваних листків досягав $85,5 \pm 7,8$ мг/г сухої ваги. Лазерно-конфокальна мікроскопія листочків веху показала, що комплекс ФІТС-пероксидаза флуоресціював зеленим кольором і містився у зовнішніх й антиклінальних оболонках клітин верхньої та нижньої епідерми, оболонках замикаючих клітин продохів, палісадної та губчастої паренхіми (рис. 1, а, б; рис 2, а). У зовнішніх оболонках верхньої епідерми флуоресценція комплексу ФІТС-пероксидаза не була суцільною (рис. 1, а), а спостерігалася на невеликих ділянках до 0,5–0,7 мкм або ж мала крапкоподібний вигляд.

Таблиця 1. Вплив помірного водного дефіциту на активність пероксидази та вміст лігніну в листках *Sium latifolium*

Параметр	Екотип	
	водний	суходільний
Активність гваяколпероксидази, од/г сирої маси хв $^{-1}$	$3,989 \pm 0,366$	$5,781 \pm 0,347^*$
Активність аскорбатпероксидази, од/г сирої маси хв $^{-1}$	$20,318 \pm 2,718$	$38,974 \pm 4,028^*$
Вміст лігніну, мг/г сухої маси	$85,50 \pm 7,84$	$157,0 \pm 10,88^*$

Примітка: тут і в табл. 2 $*P \leq 0,05$.

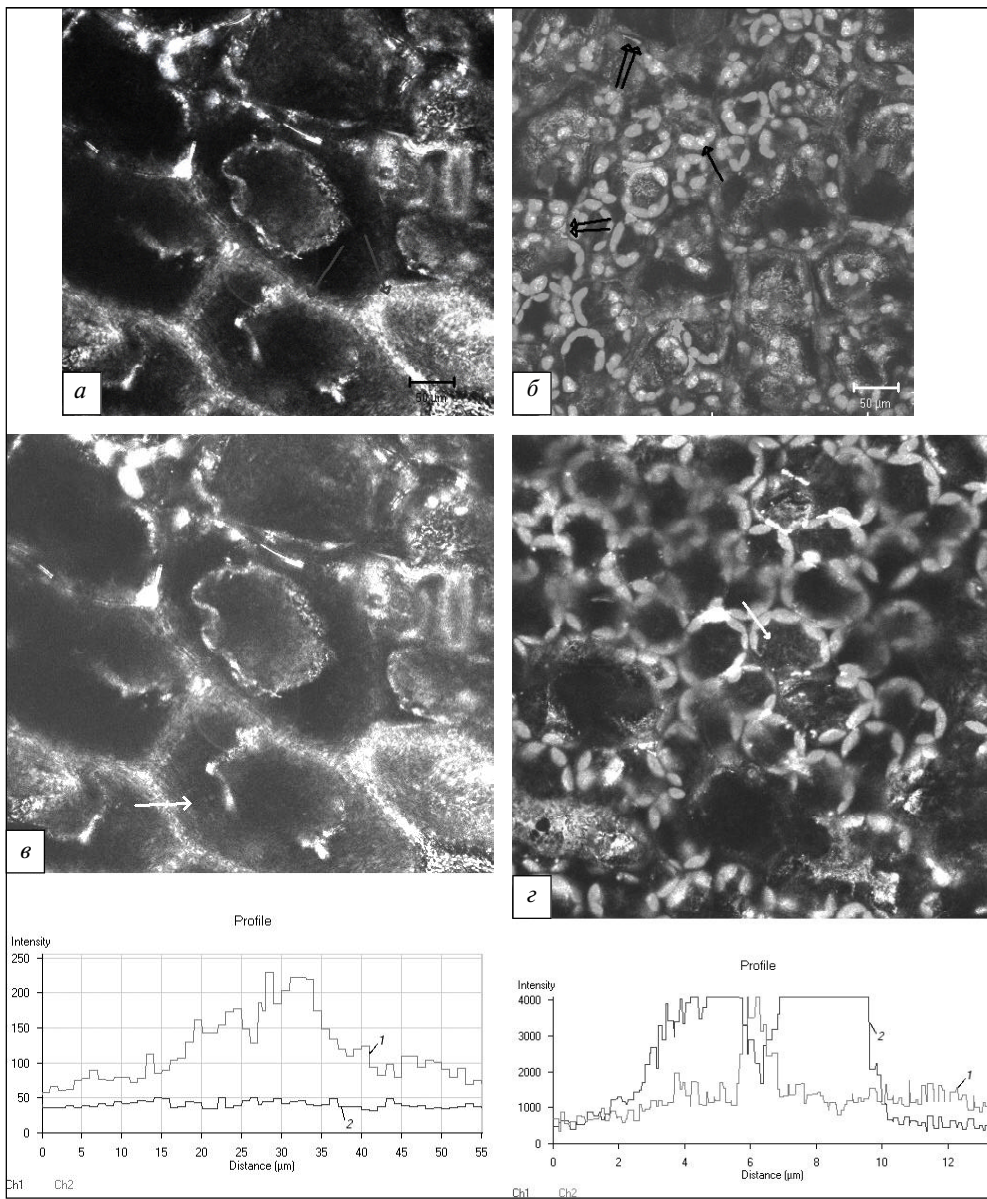


Рис. 1. Фрагменти клітин епідермісу та мезофілу *Sium latifolium* водної форми. Локалізація комплексу ФІТС-пероксидаза (стрілки) після імуноцитохімічної реакції у клітинах: *a, в* — верхньої епідерми, *б, з* — мезофілу; *в, з* — гістограми розподілу інтенсивності флуоресценції ФІТС-пероксидази (верхня крива лінія за номером 1) та автофлуоресценції хлорофілу (нижня крива лінія 2). Позначення осей на гістограмі: по вертикалі — інтенсивність флуоресценції у пікселях; по горизонталі — просканована відстань, мкм. Масштаб — 50 мкм

Fig. 1. The fragments of epidermal and mesophyll cells of *Sium latifolium* air-aquatic form are on figure 1. The localization of FITC-peroxidase complex (arrows) after the immunocytochemical reaction in the cells: *a, в* — adaxial epidermis, *б, з* — mesophyll; *в, з* — histogram of fluorescent intensity of FITC-peroxidase (upper curved line N 1) and of autofluorescence of chlorophyll (lower line N 2). Axle designation: Ordinate — Fluorescence intensity, pixels; Abscissa — Distance (μm), which was scanned on figure *в* and *з*. The scale — 50 μm

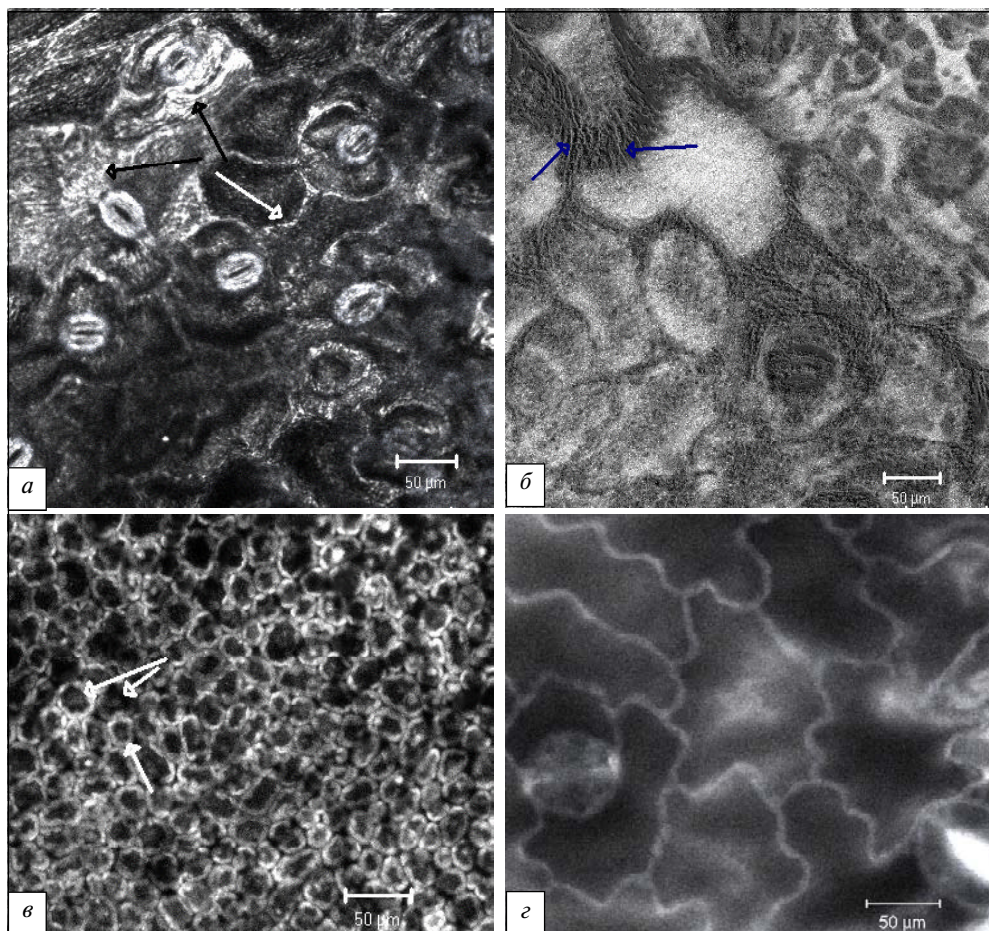


Рис. 2. Фрагменти клітин епідермісу та мезофілу водної і суходільної форм *S. latifolium*. Локалізація комплексу ФІТС-пероксидаза (стрілки) після імуноцитохімічної реакції у клітинах: *a, г* — нижня епідерма; *б* — верхня епідерма; *в* — мезофіл; *a* — епідерміс повітряно-водної форми; *б, в, г* — епідерміс та мезофіл суходільної форми; *б* — тривимірний вигляд (3D топографія) адаксіального епідермісу з пероксидазою (одержано із 12-серійних фотографій епідермісу, просканованих із кроком 1,2 мкм углиб клітини). Масштаб — 50 мкм

Fig. 2. The fragments of epidermal and mesophyll cells of *S. latifolium* air-aquatic and terrestrial form. The localization of FITC-peroxidase complex (arrows) after the immunocytochemical reaction in the cells: *a, г* — abaxial epidermis, *б* — adaxial epidermis and *в* — mesophyll. *a* — epidermis of the leaf of *S. latifolium* air-aquatic form; *б, в, г* — epidermis and mesophyll of the leaves of *S. latifolium* terrestrial form. On fig *б* is presented 3D topography of adaxial surface received from 12 serial scanning micrographs (by the using of the step of 1,2 μm deep into of the cell). The scale — 50 μm

Нерівномірність флуоресценції відзначено в оболонках й інших клітин: в одних — інтенсивне свічення певних ділянок, в інших — знижене. Рівні інтенсивності флуоресценції комплексу ФІТС-пероксидаза представлені в табл. 2 і на рис. 1, *в* (гістограма). Згідно з отриманими даними інтенсивність флуоресценції відрізнялась у різних оболонках верхньої епідерми: на зовнішній поверхні оболонки вона становила $59,01 \pm 2,11$ пікселей (відносних одиниць);

на антиклінальних оболонках була майже втричі вищою (табл. 2; рис. 1, *в* — гістограма).

В оболонках мезофілу локалізація пероксидази зафіксована не по всьому периметру, а лише в окремих ділянках та/або у міжклітинниках (рис. 1, *б*, подвійні стрілки). Загалом вона виявлена в $7,5 \pm 0,2$ % клітин мезофілу. Інтенсивність флуоресценції ФІТС-пероксидази в оболонках мезофілу була майже у 5 разів вищою, ніж в антиклінальних оболонках верхньої епідерми (табл. 2; рис. 1, *г* — гістограма). В оболонках нижньої епідерми флуоресціювали лише окремі ділянки (розміром близько 0,5 мкм), щільність флуоресціюючих ділянок була гетерогенною: у деяких клітин вони розміщувалися рихло, в інших — групувалися у стрічкоподібні структури, спрямовані паралельно антиклінальним оболонкам (рис. 2, *а*). Флуоресценція пероксидази також виявлена в оболонках замикаючих клітин продихів. Інтенсивність флуоресценції комплексу ФІТС-пероксидаза у зовнішніх оболонках основних епідермальних клітин нижньої епідерми та замикаючих клітин була достовірно вищою, ніж верхньої епідерми (табл. 2).

Крапкоподібна флуоресценція комплексу ФІТС-пероксидаза виявлена також у хлоропластах мезофілу (рис. 1, *б*, одинарна стрілка). Інтенсивність флуоресценції пероксидази у хлоропластах палісадної паренхіми була гетерогенна. Тому ми умовно розділили хлоропласти на два типи: в одних пластидах вона досить висока і становила 2000—3800 пікселей (табл. 2; рис. 1, *г* — гістограма), в інших — 1000—2000 пікселей. Інтенсивність люмінесценції пероксидази у хлоропластах губчастої паренхіми зафіксована нижчою, ніж у хлоропластах палісади (табл. 2). Інтенсивність автофлуоресценції хлорофілу в клітинах палісади коливалась від 2000 до 4000 пікселей.

2. Суходільна форма *S. latifolium*. За умов помірного водного дефіциту вологість ґрунту, на якому росли особини суходільної форми веху, знижувалася на $38,1 \pm 2,3$ % порівняно з екотипом водних рослин. Сонячна освітленість верхнього боку перших листків є нижчою, ніж у повітряно-водних рослин, і становить $290 \mu\text{mol}$ квантів/м² сек⁻¹.

Активність гваяколпероксидази у листових пластинках була вищою у 1,5 раза, аскорбатпероксидази — вдвічі порівняно з активністю пероксидази у листках повітряно-водних рослин. Також удвічі вищим, ніж у листках повітряно-водних рослин, є вміст лігніну (табл. 1).

Вивчення локалізації пероксидази у клітинах листків суходільного еко-типу веху показало спільні та відмінні особливості щодо листків водного еко-типу. Спільною рисою є локалізація ферменту в оболонках і хлоропластах епідерми та мезофілу (рис. 2, *б-г*). Відмінності полягали у зміні інтенсивності флуоресценції комплексу ФІТС-пероксидази у клітинах; наявності пероксидази у вакуолях клітин мезофілу; збільшенні кількості клітин мезофілу, в оболонках яких виявлено пероксидазу.

Зокрема, відзначено трикратне збільшення інтенсивності флуоресценції у зовнішній оболонці клітин верхньої епідерми, двократне — в антикліналь-

них оболонках нижньої епідерми, а також зниження майже на порядок у хлоропластах палісади (табл. 2). У вакуолях клітин палісади та губчастого мезофілу спостерігалася флуоресценція пероксидази (рис. 2, в), хоча інтенсивність флуоресценції комплексу ФІТС-пероксидази була слабкою (табл. 2). Крім того, утричі збільшилася кількість клітин мезофілу ($23,9 \pm 2,1 \%$), в оболонках яких виявлена пероксидаза.

У клітинах мезофілу як палісади, так і губчастого мезофілу інтенсивність автофлуоресценції хлорофілу є нижчою, ніж у рослин водного екотипу (80—200 пікселей). Останнє, можливо, пов'язане зі зниженням вмісту хлорофілів у листках за умов водного дефіциту [5].

Таким чином, під впливом помірного водного дефіциту в листках *S. latifolium* у фазі цвітіння значно вищою є активність гваяколпероксидази та аскорбатпероксидази, рівень якої залежить від кількості білка, вмісту субстратів та експресії відповідних генів [1]. Ці питання поки є відкритими і потребують подальшого дослідження.

Імуноцитохімічний аналіз листків *S. latifolium* засвідчив, що, незалежно від екотипу, пероксидаза містилася в клітинних оболонках та хлоропластах мезофілу. Ми не виключаємо, що вона є також у пероксисомах, які через малий розмір (0,2—0,4 мкм) неможливо ідентифікувати у світловому лазерноконфокальному мікроскопі. Аналогічна присутність пероксидази в оболонках епідермісу і мезофілу, а також у хлоропластах мезофілу листків веху виявлена в оболонках клітин паренхіми, субепідермісу та ксилеми провідних

Таблиця 2. Інтенсивність флуоресценції ФІТС-пероксидази у клітинах різних тканин листків повітряно-водної та суходільної форм *S. latifolium* у фазі цвітіння (пікселі)

Клітини різних тканин, їх органели	Екотип	
	водний	суходільний
<i>Верхня епідерма</i>		
зовнішня оболонка основних клітин епідермісу	53 ± 2	$157 \pm 8^*$
антиклінальна оболонка	142 ± 4	$65 \pm 3^*$
<i>Палісадний мезофіл</i>		
оболонка	637 ± 42	$124 \pm 17^*$
хлоропласт 1-го типу	2054 ± 42	$240 \pm 13^*$
хлоропласт 2-го типу	1602 ± 77	
вакуоль	не виявлено	68 ± 6
<i>Губчастий мезофіл</i>		
оболонка	1411 ± 106	$965 \pm 89^*$
хлоропласт	1507 ± 109	1862 ± 172
вакуоль	не виявлено	51 ± 3
<i>Нижня епідерма</i>		
зовнішня оболонка основних клітин епідермісу	2893 ± 148	2761 ± 100
антиклінальна оболонка	999 ± 29	$1965 \pm 205^*$
оболонка замикаючих клітин продохів	2428 ± 142	2420 ± 101

пучків луб'яних волокон *Stipa tenacissima* [14] та хлоропластах мезофілу листків *Spinacia oleracea* [10, 11]. Відомо, що пероксидаза хлоропластів відіграє важливу роль в оксигеназній реакції, у процесі якої кисень відновлюється до H_2O електронами за фотосинтетичним електрон-транспортним шляхом з наступним перетворенням H_2O_2 на H_2O за аскорбатпероксидазним шляхом [10, 15]. Окрім того, встановлена ціла родина ізоферментів аскорбатпероксидази, локалізованих у стромі та/або тилакоїдах строми [15]. Враховуючи ці дані і результати наших експериментів щодо локалізації та інтенсивності флуоресценції комплексу ФІТС-пероксидази, можна зробити два припущення: пероксидаза хлоропластів бере активну участь у функціонуванні мезофілу незалежно від водного статусу веху; вміст пероксидази в окремих хлоропластах листків суходільного екотопу веху є нижчим порівняно з хлоропластами листків водних рослин.

Ми встановили підвищення інтенсивності флуоресценції ФІТС-пероксидази у зовнішніх оболонках основних клітин епідермісу верхньої епідерми і в антиклінальних оболонках нижньої епідерми під впливом помірного водного дефіциту, а також збільшення кількості клітин мезофілу, оболонки яких містили пероксидазу. Окрім цього, ми виявили пероксидазу не по всьому периметру оболонки клітин мезофілу, а лише у міжклітинниках та/або у «куточках» оболонок — аналогічно такому у клітинах мезофілу деяких рослин [14]. Відомо, що функціонування пероксидази оболонок клітин, які закінчили ріст розтягом, пов'язане як з синтезом лігніну шляхом окислення монолігнолів [15, 16], так і зі зміцненням оболонки за рахунок формування стабілізуючих поперечних зв'язків між полісахаридами та білками [13]. Зважаючи на це та результати біохімічного аналізу вмісту лігніну у листках суходільної форми веху, можна припустити, що однією з причин збільшення вмісту пероксидази в оболонках клітин було посилення синтезу в них лігніну за помірного водного дефіциту.

Локалізацію пероксидази у вакуолях клітин мезофілу листків веху за умов помірного водного дефіциту можна пояснити тим, що у процесі онтогенезу рослини вакуолі клітин акумулюють феноли, в окисленні яких бере участь пероксидаза [7, 12]. Нещодавно встановлено, що при зневодненні *Ramonda serbica* вміст фенолів у листках збільшується й змінюється активність фенолпероксидази [18]. А.М. Силаєва [9] та І.М. Савич [6] вказують на ознаки прискореної руйнації клітин мезофілу листків культурних та дикорослих рослин за дії водного дефіциту. Очевидно, в умовах помірного природного водного дефіциту прискорене старіння листків повітряно-водних рослин супроводжується акумуляцією у вакуолях фенолів, в окисленні яких бере участь пероксидаза.

Висновки

1. Внаслідок помірного водного дефіциту підвищувалася активність гваяколта аскорбатпероксидази, пероксидаза з'являлася у вакуолях клітин мезофілу листків *S. latifolium*.

2. Імуноцитохімічним методом на рівні світлової мікроскопії пероксидаза виявлена у клітинних оболонках епідермісу та мезофілу, а також у хлоропластах незалежно від водного статусу *S. latifolium*.

Автор висловлює щире подяку чл.-кор. НАНУ Є.Л. Кордюм за критичні зауваження та цінні поради при обговоренні результатів експериментів.

1. Альбертс Б., Брей Д., Льюис Дж. *И др.* Молекулярная биология клетки. Том. 1. — М.: Мир, 1994. — 515 с.
2. Андреева В.А. Фермент пероксидаза. — М.: Наука, 1988. — 128 с.
3. Арасимович В.В., Ермаков А.И. Определение полисахаридов и лигнина // Методы биохим. исслед. раст., изд 3-е / Под ред. А.И. Ермакова. — Л.: Агропромиздат, 1987. — С. 143—172.
4. Козеко Л.Е., Кордюм Е.Л., Глазко В.И. Использование молекулярно-генетических маркеров для сравнительной характеристики суходольного и воздушно-водного экотипов *Sium latifolium* L. // Докл. АН Украины. — 2003. — № 1. — С. 188—191.
5. Кордюм Е.Л., Сытник К.М., Бараненко В.В. *и др.* Клеточные механизмы адаптации растений к неблагоприятным воздействиям экологических факторов в естественных условиях. — Киев: Наук. думка, 2003. — 273 с.
6. Савич И.М. Пероксидазы — стрессовые белки растений // Успехи совр. биол. — 1989. — **107**, вып. 3. — С. 406—417.
7. Садвакасова Г.Г., Кунаева Р.М. Некоторые физико-химические и физиологические свойства пероксидазы растений // Физиол. и биохим. раст. — 1987. — **19**, № 2. — С. 107—119.
8. Силаева А.М. Структура хлоропластов и факторы среды. — Киев: Наук. думка, 1978. — 202 с.
9. Ярош Н.П., Ермаков А.И., Арасимович В.В. Определение активности ферментов // Методы биохим. исслед. раст., изд 3-е. / Под ред. А.И. Ермакова. — Л.: Агропромиздат, 1987. — С. 41—86.
10. Asada K. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. — 1992. — **50**. — P. 601—639.
11. Asada K., Takahashi M. Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis // Photoinhibition Eds. Kyle D., Osmond C., and Arntzen C. — Amsterdam: Elsevier Science Publ., 1987. — P. 227—287.
12. Croteau R., Kutchan T.M., Lewis N.G. Natural Products (Secondary metabolites) // Biochem. and Mol. Biol. of Plants / Eds. Buchanan B., Griseem W., and Jones W.R. — 2000. — P. 1250—1300.
13. Fry S.C. Feruloylated pectins from the primary cell wall: their structure and possible functions // Planta. — 1983. — **157**, N 2. — P. 111—123.
14. Harche M. Localisation structurale et ultrastructurale d'activites peroxydasiques dans les parois du mesophylle et des fibres en cours de lignification chez l'alfa (*Stipa tenacissima*) // Can. J. Bot. — 1984. — **62**, N 12. — P. 2644—2649.
15. Hiraga S., Sasaki K., Ito H. *et al.* A large family of class III plant peroxydases // Plant Cell Physiol. — 2001. — **42**, N 5. — P. 462—468.
16. Li Y., Kajita S., Kawai S., Katayama Y., Morohashi N. Down-regulation of an anionic peroxidase in transgenic aspen and its effect on lignin characteristics // J. Plant Res. — 2003. — **116**, N 3. — P. 175—182.
17. Monk L.S., Fagerstedl K.V., Crawford R.M. Superoxide dismutase as an anaerobic polypeptide. A key factor in recovery from oxygen deprivation in *Iris pseudacorus*? // Plant Physiol. — 1987. — **85**. — P. 1016—1020.
18. Sgherri C., Stevanonic B., Navari-Izzo F. Role of phenolics in the antioxydative status of the resurrection plant *Ramonda serbica* during dehydration and rehydration // Physiol. Plantarum. — 2004. — **122**, N 4. — P. 478—485.

19. Wymer C.L., Beven A.F., Boundonck K., Lloyd C.W. Confocal microscopy of plant cells // Methods in Molecular Biology. Confocal Microscopy / Ed. Paddock S.W. — Totowa, New Jersey: Humana Press, 1999. — Vol. 122. — P. 103–129.

Рекомендує до друку
Л.І. Мусатенко

Надійшла 08.06.2005

Е.М. Недуха

Институт ботаники им. Н.Г. Холодного
НАН Украины, г. Киев

ИММУНОЦИТОХИМИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ
ПЕРОКСИДАЗЫ В ЛИСТЬЯХ ВОЗДУШНО-ВОДНОЙ
И СУХОДОЛЬНОЙ ФОРМ *SIUM LATIFOLIUM* L.

Проведено изучение активности и локализации пероксидазы (EC. 1.11.1.7) в листьях воздушно-водной и сухопутной форм *Sium latifolium* биохимическими и иммуноцитохимическим методами с использованием пероксидазы, конъюгированной с флуоресцеин-изоцианатом (ФИТС). Иммуноцитохимическое исследование проводили на конфокальном лазерном сканирующем микроскопе LSM 5 PASCAL (Zeiss, Germany). Пероксидаза выявлена в клеточных оболочках эпидермиса и мезофилла, а также в хлоропластах мезофилла. Обнаружено, что умеренный водный дефицит влиял на увеличение активности пероксидазы, изменения в интенсивности флуоресценции комплекса ФИТС-пероксидаза в исследованных клетках, появление пероксидазы в вакуолях клеток мезофилла и увеличение количества клеток мезофилла, в которых выявлена пероксидаза.

Ключевые слова: пероксидаза, листки, *Sium latifolium*, конфокальная микроскопия

О.М. Nedukha

M.G. Kholodny Institute of Botany,
National Academy of Sciences, Kyiv

AN IMMUNE CYTOCHEMICAL STUDY
OF PEROXYDASE IN LEAVES OF AERIAL-AQUATIC AND
TERRESTRIAL FORMS OF *SIUM LATIFOLIUM* L.

The study of peroxydase (EC. 1.11.1.7) activity and localization in cells of epidermis and mesophyll in leaves of aerial-aquatic and terrestrial forms of *Sium latifolium* L. have been revealed using the immune cytochemical method and biochemical methods. Peroxydase conjugated with fluorescein isocyanate (FITC) was used in the experiments. The study was performed on a LSM 5 PASCAL (Zeiss, Germany) confocal-laser microscope. It is established that peroxydase is localized both in the walls of epidermis and mesophyll, and in mesophyll's chloroplasts. A moderate water deficit provoked the increase of peroxidase activity, the changes of intensity of fluorescence of the FITC-peroxydase complex in the investigated cells, the presence of peroxydase in vacuoles of mesophyll cells, and the increase of the number of mesophyll cells, in walls of which peroxidase has been revealed.

Key words: peroxydase, leaves, *Sium latifolium*, confocal-laser microscope