

На правах рукописи

Тарелкина

Тарелкина Татьяна Владимировна

**ВЛИЯНИЕ САХАРОЗЫ НА КАМБИАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ И
ФОРМИРОВАНИЕ ПРОВОДЯЩИХ ТКАНЕЙ
БЕРЕЗЫ ПОВИСЛОЙ, ОЛЬХИ СЕРОЙ И ОСИНЫ**

03.02.01 – «Ботаника»

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Петрозаводск – 2019

Работа выполнена в Институте леса — обособленном подразделении Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра «Карельский научный центр Российской академии наук»

Научный руководитель доктор биологических наук
Новицкая Людмила Людвиговна

Официальные оппоненты: **Марковская Евгения Федоровна**,
доктор биологических наук, профессор,
Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего
образования «Петрозаводский государственный
университет», профессор

Котина Екатерина Леонидовна,
кандидат биологических наук,
Федеральное государственное бюджетное
учреждение науки Ботанический институт им.
В.Л. Комарова Российской академии наук,
старший научный сотрудник

Ведущая организация **Институт леса им. В.Н. Сукачева Сибирского
отделения Российской академии наук -
обособленное подразделение ФИЦ КНЦ СО
РАН**

Защита состоится 04 марта 2020 года в 14.00 часов на заседании диссертационного совета Д 002.211.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Ботаническом институте им. В.Л. Комарова Российской академии наук по адресу: 197376, г. Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д. 2. Тел. (812) 372-54-06, факс (812) 372-54-43; dissovet.d00221101@binran.ru.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального государственного бюджетного учреждения науки Ботанического института имени В.Л. Комарова Российской академии наук www.binran.ru.

Автореферат разослан « » 2019 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

 Сизоненко Ольга Юрьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Несмотря на обилие синтетических материалов, древесина в настоящее время приобретает все большую ценность. Особого внимания заслуживает узорчатая древесина некоторых видов древесных растений ввиду ее высокой коммерческой стоимости [Beals, Davis, 1977; Божок и др., 1985; Лаур, 2013].

Формирование древесины происходит в результате деятельности камбия. Число публикаций, посвященных регуляции камбиальной активности и формирования проводящих тканей, неуклонно растет, однако большой объем данных получен на травянистом растении *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh [Chaffey, 2001; Oh et al., 2003; Nieminen et al., 2004; Ragni, Hardtke, 2014 и др.]. Работ, выполненных в этом направлении на древесных растениях, сравнительно мало [Nieminen et al., 2008; Love et al., 2009; Sorce et al., 2013 и др.].

Образование узорчатой древесины связано с нарушением деятельности камбия и дифференциации камбиальных производных [Velling et al., 2000; Коровин и др., 2003 и др.]. Наиболее изучена в этом отношении карельская береза, являющаяся формой березы повислой (*Betula pendula* Roth var. *carelica* (Merckl.) Hämet-Ahti). Выдвинута гипотеза, согласно которой возможным индуктором аномального морфогенеза у карельской березы является высокий уровень сахарозы в камбиальной зоне [Новицкая, 1997, 2008; Novitskaya, Kushnir, 2006; Novitskaya et al., 2016]. В данной связи представляет интерес проследить влияние различных концентраций сахарозы на рост и развитие ксилемы и флоэмы у других древесных растений. Проведение таких исследований актуально с точки зрения познания механизмов нормального и аномального камбиального роста.

Степень разработанности. В литературе описано анатомическое строение узорчатой древесины карельской березы [Hintikka, 1941; Барильская, 1978; Коровин и др., 2003] и различных видов клена [Зуихина, 1976; Rioux et al., 2003]. Древесина с похожими признаками может встречаться у обычной березы повислой, ольхи серой, ясеня обыкновенного, ели европейской, сосны обыкновенной [Saarnijouki, 1961; Ziegler, Merz, 1961; Гольтраф, 1976; Коновалов, 1984; Коровин, Зуихина, 1985 и др.].

Предпринимались попытки индуцировать формирование узорчатой древесины с помощью различных методических приемов [Bailey, 1948; Lev-Yadun, Aloni, 1991]. Проведены опыты по введению растворов сахарозы в ствол обычной березы повислой с прямослойной древесиной [Novitskaya, Kushnir, 2006; Новицкая, 2008; Novitskaya, 2009], при этом ткани, сформировавшиеся в вариантах с высокой концентрацией дисахарида,

приобретали черты строения, характерные для аномальных проводящих тканей карельской березы.

Цели и задачи исследования. Целью работы было выявление особенностей влияния различных концентраций сахарозы на камбиальную активность и формирование структурных элементов ксилемы и флоэмы у трех видов лиственных древесных растений: *Betula pendula* Roth, *Alnus incana* (L.) Moench, *Populus tremula* L.

В задачи исследования входило изучение влияния различных концентраций сахарозы на:

- камбиальную активность в стволе обычной березы повислой;
- динамику формирования проводящих тканей ствола обычной березы повислой;
- структуру проводящих тканей обычной березы повислой, ольхи серой и осины;
- содержание растворимых сахаров в тканях ствола обычной березы повислой, ольхи серой и осины;
- активность расщепляющих сахарозу ферментов в тканях ствола обычной березы повислой;
- уровень экспрессии гена, кодирующего ИУК-глюкоза синтазу (фермент, катализирующий конъюгацию ауксина), в тканях ствола обычной березы повислой и дифференцирующейся ксилеме карельской березы.

Научная новизна. Впервые показано, что поступление дополнительной сахарозы со стороны проводящей флоэмы вызывает увеличение частоты и изменение локализации антиклинальных делений клеток камбиальной зоны.

Впервые дано подробное описание структуры проводящих тканей, сформированных у березы повислой, ольхи серой и осины под влиянием различных концентраций экзогенной сахарозы. У трех исследованных видов рассмотрены возможные пути утилизации избытка сахарозы в проводящей флоэме и камбиальной зоне.

Впервые продемонстрирован возможный механизм возникновения очагов каллусоподобной паренхимы в узорчатой древесине карельской березы. Показано, что у березы повислой высокие концентрации сахарозы способствуют локальному отмиранию ксилемных производных камбия, после чего образовавшиеся пустоты заполняются каллусной паренхимой в результате пролиферации клеток радиальных лучей.

Впервые установлена взаимосвязь между подавлением дифференцировки сосудов ксилемы и сверхэкспрессией гена, кодирующего фермент ИУК-

глюкоза синтазу. Предложена схема, допускающая участие в конъюгации гормона гексоз, образованных при расщеплении сахарозы с участием апопластной инвертазы.

Теоретическая и практическая значимость работы. Постановка эксперимента *in arbor* без повреждения камбиальной зоны позволила исследовать влияние сахарозы на активность интактного камбия и дифференциацию его производных. Полученные данные способствуют углублению и расширению знаний о механизмах регуляции ксило- и флоэмогенеза у древесных растений.

Методология и методы исследования. Исследование проведено с использованием нескольких экспериментальных подходов, таких как: 1) введение в ткани ствола растворов экзогенной сахарозы разной концентрации; 2) создание в тканях ствола вертикального градиента уровня сахарозы в результате кольцевания ствола; 3) исследование тканей ствола у деревьев карельской березы с узорчатой и безузорчатой древесиной. Применяли современные методы анатомо-цитологического, биохимического и молекулярно-генетического анализов и статистической обработки данных.

Положения, выносимые на защиту:

1. У обычной березы повислой (*B. pendula* var. *pendula*) высокие концентрации сахарозы индуцируют отклонения от нормального роста и развития проводящих тканей ствола, имеющие большое сходство со структурными аномалиями аналогичных тканей карельской березы (*B. pendula* var. *carelica*). В обоих случаях аномальный морфогенез начинается с увеличения числа клеток камбиальной зоны, делящихся антиклинальными перегородками.

2. Повышение уровня сахарозы в камбиальной зоне обычной березы повислой подавляет дифференцировку сосудов ксилемы. Причиной этого может быть интенсивная инактивация ауксина в результате образования его конъюгата ИУК-глюкоза.

3. Формирование высокодекоративной узорчатой древесины по типу карельской березы связано с появлением в камбиальной зоне ствола большого избытка сахарозы. У березы повислой основным способом его утилизации является усиленная паренхиматизация проводящих тканей. У других видов древесных растений имеются иные механизмы поддержания уровня сахарозы в определенных пределах, поэтому данная модель морфогенеза у них не реализуется.

Степень достоверности и апробация результатов работы. Полученные результаты воспроизводимы и согласуются с литературными данными. Материалы диссертации были представлены на Международной конференции, посвященной 60-летию КарНЦ РАН (Петрозаводск, 2006); Международной конференции Annual Main Meeting of Society for Experimental Biology (Glasgow, 2007); Международной конференции «Структурные и функциональные отклонения от нормального роста и развития растений под воздействием факторов среды» (Петрозаводск, 2011); Всероссийской конференции с международным участием «Растения в условиях глобальных и локальных природно-климатических и антропогенных воздействий» (Петрозаводск, 2015); Всероссийской научной конференции с международным участием «Бореальные леса: состояние, динамика, экосистемные услуги» (Петрозаводск, 2017). Всероссийской научной конференции с международным участием "Физиология растений - основа создания растений будущего" (Казань, 2019).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 11 работ, в т. ч. 4 статьи в журналах из перечня ВАК (3 из них – Web of Science и Scopus).

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, 4 глав, заключения, выводов, списка литературы, включающего 351 наименование (из них 258 на иностранных языках), и приложения. Работа изложена на 195 страницах, содержит 15 таблиц и 57 рисунков.

Благодарности. Автор выражает благодарность научному руководителю д.б.н. Л.Л. Новицкой за всестороннюю поддержку и консультации при выполнении работы. Автор благодарит д.б.н. Н.А. Галибину, к.б.н. Ю.Л. Мошенскую, И.Н. Софронову, М.Н. Подгорную и К.М. Никерову за помощь в проведении биохимических и молекулярно-генетических исследований, к.б.н. Н.Н. Николаеву и Л.Л. Веселкову – в проведении полевых работ и сборе экспериментального материала. Отдельное спасибо Д.С. Ивановой за помощь при подготовке материала для микроскопических исследований.

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1. Обзор литературы

В главе дано подробное описание особенностей анатомического строения узорчатой древесины у различных древесных растений. Проанализированы факторы, влияющие на дифференциацию структурных элементов проводящих тканей ствола. Рассмотрены основные гипотезы о возможных физиологических

причинах развития структурных аномалий осевых органов. Проанализированы имеющиеся в литературе сведения о влиянии ауксина на формирование узорчатой древесины карельской березы. Рассмотрена роль сахаров в аномальном морфогенезе проводящих тканей ствола.

Глава 2. Объекты и методы исследования

2.1. Объекты исследования

Объектами исследования были 15-20-летние деревья березы повислой (*B. pendula* var. *pendula*), ольхи серой *A. incana* и осины *P. tremula*, произраставшие в 2 км от г. Петрозаводска в одинаковых почвенно-климатических условиях.

2.2. Эксперимент с введением растворов сахарозы различной концентрации в ткани ствола

Введение растворов сахарозы проводили в период активного камбиального роста в соответствии с методикой [Тарелкина, Новицкая, 2018]. Варианты эксперимента различались по концентрации опытного раствора: 1% (С1%), 2,5% (С2,5%), 5% (С5%), 10% (С10%), 20% (С20%).

В 2007 г. были задействованы деревья березы повислой (9 шт.), ольхи серой (3 шт.) и осины (3 шт.). Образцы для микроскопических исследований и анализа содержания сахаров отбирали через 17 и 28 дней после начала введения растворов (береза) и в конце вегетационного периода (береза, ольха, осина).

В 2009 г. в эксперименте участвовали только деревья березы повислой (3 шт.). Фиксацию тканей для определения активности ферментов проводили через 6 недель после начала введения растворов.

2.3. Эксперимент с кольцеванием ствола березы повислой

Были отобраны 8 деревьев березы повислой, росшие в одинаковых почвенно-климатических условиях в 2 км к югу от г. Петрозаводска. Возраст деревьев 20-22 года. На стволах 5 деревьев на высоте 125 см от земли удаляли кольцо коры шириной 5 см вплоть до формирующейся ксилемы. Через 10 дней после кольцевания фиксировали образцы для определения активности апопластной инвертазы и уровня экспрессии генов, кодирующих ИУК-глюкоза синтазу. Отбор тканей флоэмы и ксилемы проводили на 5 уровнях: непосредственно над кольцом (1 зона), и на 5, 10, 15 и 35 см выше границы кольца (2, 3, 4 и 5 зоны соответственно). Для контроля отбирали ткани с 3 интактных деревьев.

2.4. Изучение особенностей дифференциации ксилемы карельской березы

Исследовали растения карельской березы (*B. pendula* Roth var. *carelica* (Merckl.) Hämet-Ahti) с узорчатой и безузорчатой древесиной, выращенные на лесосеменной плантации в Медвежьегорском р-не Республики Карелия. Возраст деревьев 28-29 лет. Отбор тканей проводили 5-7.07.2017 г. Образцы дифференцирующейся ксилемы для биохимического и молекулярно-генетического анализов отбирали с 13 безузорчатых и 27 узорчатых деревьев.

2.5. Микроскопические исследования

Образцы фиксировали глутаральдегидом и четырехокисью осмия с последующей заливкой в эпоксидную смолу эпон [Уикли, 1975]. На ультратоме LKB IV (LKB, Sweden) изготавливали срезы толщиной 2 мкм, которые окрашивали 1% водным раствором сафранина. Исследования осуществляли с помощью светового микроскопа Axiolmager A1 (Carl Zeiss, Germany) с камерой ProgRess C10^{plus} (Jenoptic, Germany) и программы ВидеоТест-Морфология 5.0 (ВидеоТест, Россия). Измерения проводили на микрофотографиях срезов методами имидж-анализа.

2.6. Биохимические исследования

Содержание растворимых сахаров определяли с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографической системы серии «Стайер» (Аквилон, Россия). Содержание сахаров выражали в мг на г сухой ткани.

Определение активности ферментов. Ткани гомогенизировали при 4°C в буфере в течение 20 мин. Полученный гомогенат центрифугировали при 10000 g в течение 20 мин (центрифуга 2–16PK, «Sigma», Германия), осадок трехкратно промывали буфером, супернатант объединяли и диализовали при 4°C в течение 18–20 ч против буфера для гомогенизации, разбавленного в 10 раз. В супернатанте определяли активность сахарозосинтазы (СС), вакуолярной и цитоплазматической инвертазы (ВаКИнв, ЦитИнв), в осадке – активность апопластной инвертазы (АпИнв). Активность ферментов определяли после инкубации полученного препарата при 30°C в течение 30 минут.

Активность сахарозосинтазы (СС) определяли в направлении распада сахарозы по восстановлению НАДФ при $\lambda = 340$ нм (спектрофотометр СФ-2000, Россия). Активность инвертазы определяли по количеству образовавшейся в процессе инкубации глюкозы глюкозооксидазным методом. Активность всех исследованных ферментов выражали в мкмоль распавшейся сахарозы на г сырой ткани.

Определение уровня экспрессии генов. Методами биоинформатики в геноме березы повислой осуществлен поиск генов, кодирующих фермент ИУК-глюкоза синтаза, участвующий в синтезе конъюгата ауксина ИУК-глюкоза. Накопление транскриптов генов анализировали при помощи полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени.

2.7. Статистический анализ

Анализ различий между группами проводили с использованием процедуры общих линейных моделей (GLM) и однофакторного дисперсионного анализа в программе Статистика (СтатСофт, Россия).

Данные в таблицах представлены как $M \pm SD$, где M – средняя величина, SD – стандартное отклонение.

Глава 3. Результаты

3.1. Строение проводящих тканей березы повислой, ольхи серой и осины в норме

В разделе приведены результаты исследования структуры проводящих тканей контрольных образцов, отобранных с деревьев, участвовавших в эксперименте.

3.2. Эксперимент с введением растворов сахарозы разной концентрации в ткани ствола березы, ольхи и осины

Основным объектом исследований являлась береза повислая, в связи с чем морфогенез проводящих тканей у этого вида был изучен более детально по сравнению с ольхой серой и осиной.

3.2.1. Частота и локализация антиклинальных делений клеток камбиальной зоны у березы повислой

В вариантах С10% и С20% частота антиклинальных делений была в 2-3 раза выше по сравнению с вариантами С1% - С5%. Концентрация сахарозы оказывала влияние на локализацию антиклинальных делений в пределах камбиальной зоны. В вариантах С10% и С20% зона, где происходили такие деления, расширялась в сторону ксилемы, и они наблюдались на большем удалении от лучей.

3.2.2. Строение тканей коры березы, ольхи и осины, сформированных в ходе эксперимента

Прирост поздней флоэмы (слои флоэмы, сформированные в ходе эксперимента). У исследованных видов различия по ширине этой зоны между

вариантами опыта отсутствовали (табл. 1). У ольхи приросты не превышали 100 мкм, у осины и березы они составляли 100-150 мкм.

Таблица 1. Параметры поздней флоэмы, сформировавшейся у исследованных видов в эксперименте с введением в ткани ствола растворов сахарозы

Вид	Параметр	Концентрация сахарозы в растворе					<i>p</i> -value
		1,0 %	2,5%	5,0%	10,0%	20,0%	
<i>Betula pendula</i>	W_{phl} , мкм	111,06 ± 45,27	110,26 ± 28,24	125,61 ± 11,32	116,74 ± 13,98	121,45 ± 10,71	0,188
	S_p , %	73,25 ± 12,03	66,44 ± 2,74	78,87 ± 7,86	80,85 ± 10,72	76,12 ± 11,23	0,571
	N_p , шт./мм ²	1742 ± 224	2081 ± 434	2035 ± 84	2271 ± 416	2545 ± 226	0,122
<i>Alnus incana</i>	W_{phl} , мкм	84,23 ± 20,81	84,03 ± 18,34	77,77 ± 21,36	85,43 ± 20,54	82,36 ± 15,82	0,588
	S_p , %	66,80 ± 14,93	50,27 ± 0,88	67,21 ± 19,25	61,73 ± 10,01	72,67 ± 1,23	0,377
	N_p , шт./мм ²	1920 ± 195	1437 ± 334	2074 ± 779	1733 ± 141	2069 ± 411	0,492
	R_v , %	68,08 ± 13,45	72,87 ± 2,49	58,73 ± 1,98	58,32 ± 3,61	60,79 ± 3,18	0,288
	S_{st} , %	21,55 ± 7,60	24,44 ± 6,43	24,47 ± 7,05	22,95 ± 6,05	26,55 ± 7,07	0,273
<i>Populus tremula</i>	W_{phl} , мкм	124,03 ± 37,58	116,37 ± 25,58	119,75 ± 35,02	116,20 ± 38,49	124,30 ± 35,67	0,078
	S_p , %	62,21 ± 6,42	58,54 ± 9,36	57,84 ± 9,09	63,73 ± 7,49	62,98 ± 11,15	0,258
	N_p , шт./мм ²	2419 ± 397	1955 ± 296	2061 ± 403	2773 ± 261	1987 ± 337	0,087
	R_v , %	37,46 ± 5,42	38,73 ± 1,93	38,54 ± 10,47	22,12 ± 13,01	53,27 ± 4,45	0,022
	S_{st} , %	20,36 ± 4,88	30,21 ± 7,07	37,52 ± 7,20	36,28 ± 6,57	40,89 ± 6,82	0,0001

Прим.: W_{phl} – прирост поздней флоэмы, S_p – относительная площадь паренхимы в поздней флоэме, N_p – число паренхимных клеток на единицу площади поздней флоэмы, R_v – доля клеток с крупной центральной вакуолью в общем числе паренхимных клеток, S_{st} – относительная площадь клетки луча поздней флоэмы, занятая крахмалом. Различия между вариантами эксперимента достоверны при p -value ≤ 0,05.

Паренхима в составе поздней флоэмы. У березы наблюдалась тенденция к усилению паренхиматизации поздней флоэмы с увеличением концентрации раствора (табл. 1). У осины при высокой концентрации сахарозы (20%) увеличивалась доля клеток с крупной центральной вакуолью (табл. 1). У ольхи во всех вариантах эксперимента > 58% паренхимных клеток имели крупную центральную вакуоль. Увеличение концентрации сахарозы в растворе стимулировало накопление крахмала в паренхимных клетках коры осины (табл. 1).

Склеренхима в составе поздней флоэмы. У березы введение сахарозы в концентрациях 1% - 5% вызвало склерификацию элементов флоэмы. Во флоэме ольхи в варианте С2,5% вблизи камбия были отмечены небольшие группы склереид. У отдельных деревьев осины в вариантах С1% и С2,5% закладывались дополнительные небольшие группы флоэмных волокон.

3.2.3. Строение древесины березы, ольхи и осины, сформированной в ходе эксперимента

В исследованных образцах в древесине можно выделить три зоны: нижнюю, среднюю и периферическую; две последние были сформированы в ходе эксперимента.

Средняя зона. У березы через 28 дней от начала эксперимента в вариантах С10% и С20% в зоне растяжения ксилемных производных камбия присутствовали очаги отмирания клеток. Образовавшиеся пустоты заполнялись каллусной паренхимой в результате пролиферации лучевых клеток.

В конце вегетационного периода, в средней зоне древесины березы объем паренхимы увеличивался с ростом концентрации сахарозы; в варианте С20% были обнаружены булавовидные расширения лучей. У ольхи во всех вариантах опыта в средней зоне присутствовал слой паренхимы толщиной 5-7 клеток. Средняя зона ксилемы осины состояла из сплюснутых в радиальном направлении волокон, среди которых располагались сосуды и отдельные клетки аксиальной паренхимы.

Периферическая зона.

Прирост ксилемы. У березы отмечено снижение ширины прироста с увеличением концентрации сахарозы в растворе. У ольхи и осины четкой зависимости прироста от концентрации раствора не выявлено (табл. 2).

Структурные особенности. У березы и ольхи сосуды присутствовали только в верхней подзоне периферической зоны (соответствует концу периода камбиального роста). У осины они были распределены равномерно по всей периферической зоне.

Таблица 2. Параметры ксилемы, сформировавшейся у исследованных видов в эксперименте с введением в ткани ствола растворов сахарозы

Вид	Параметр	Концентрация сахарозы в растворе					p-value
		1,0 %	2,5%	5,0%	10,0%	20,0%	
<i>Betula pendula</i>	W_{xyL} , мкм	567,85 ± 304,57	204,99 ± 74,25	338,48 ± 147,24	178,50 ± 150,32	100,38 ± 44,39	0,001
	N_V , шт./мм	4,50 ± 1,46	2,82 ± 1,87	2,41 ± 1,82	1,87 ± 1,19	0,53 ± 1,06	0,0001
	N_R , шт./мм	11,38± 3,33	10,82± 3,58	11,46 ± 2,86	14,23 ± 2,54	14,58 ± 1,91	0,057
	W_R 1-рядн., мкм	9,80± 2,72	10,55± 2,13	11,62 ± 3,21	11,98 ± 2,96	12,51 ± 3,61	0,0001
	W_R 2-рядн., мкм	20,88± 4,26	21,63± 4,15	21,81 ± 0,74	21,71 ± 2,71	23,30 ± 4,45	0,524
	N_p , шт./мм ²	581± 68	799± 21	689 ± 130	1089 ± 152	623 ± 67	0,001
<i>Alnus incana</i>	W_{xyL} , мкм	989,87 ± 429,11	693,41 ± 74,38	984,07 ± 141,98	984,84 ± 86,76	717,67 ± 300,75	0,001
	N_V , шт./мм	3,43 ± 1,24	4,88 ± 1,37	6,01 ± 0,73	4,75 ± 0,80	3,03 ± 1,35	0,0001
	N_R , шт./мм	16,36 ± 2,84	14,42 ± 2,30	15,11 ± 2,53	15,23 ± 2,64	16,75 ± 2,58	0,101
	W_R , мкм	7,95 ± 1,33	8,65 ± 1,48	8,09 ± 1,14	7,92 ± 1,16	8,38 ± 1,34	0,148
	N_p , шт./мм ²	449 ± 41	429 ± 57	328 ± 50	460 ± 104	435 ± 46	0,123
<i>Populus tremula</i>	W_{xyL} , мкм	618,75 ± 413,41	626,04 ± 572,16	649,45 ± 621,81	577,96 ± 409,60	890,46 ± 372,27	0,001
	N_V , шт./мм	8,73 ± 2,20	9,05 ± 2,66	8,41 ± 2,31	8,40 ± 2,20	7,30 ± 1,51	0,372
	N_R , шт./мм	12,01 ± 1,79	11,66 ± 1,38	11,47 ± 1,62	11,95 ± 1,74	12,18 ± 2,48	0,277
	W_R , мкм	7,47 ± 1,09	7,48 ± 1,08	7,49 ± 1,42	7,93 ± 1,03	7,37 ± 1,49	0,692

Прим.: W_{xyL} – прирост ксилемы в периферической зоне, N_V – число сосудов, N_R – число лучей, W_R – ширина лучей, N_p – число паренхимных клеток на единицу площади ксилемы. Различия между вариантами эксперимента достоверны при $p\text{-value} \leq 0,05$.

У березы число и размеры сосудов снижались с увеличением концентрации сахарозы в растворе (табл. 2). У ольхи максимальное число сосудов было зафиксировано в варианте С5% (табл. 2), размеры сосудов существенно не изменялись. У осины различия по числу и размеру сосудов между вариантами эксперимента отсутствовали (табл. 2).

В отличие от ольхи и осины у березы наблюдалась явно выраженная тенденция к увеличению числа лучей в вариантах С10% и С20%, при этом возрастала ширина однорядных лучей (табл. 2). Число клеток аксиальной паренхимы у березы увеличивалось с ростом концентрации сахарозы (табл. 2); у ольхи различий между вариантами не было, у осины аксиальная паренхима в ксилеме периферической зоны отсутствовала.

У березы в вариантах С10% и С20% выявлены участки свилеватой древесины. В ксилеме ольхи и осины во всех случаях сохранялась нормальная ориентация элементов.

3.2.4. Содержание растворимых сахаров в тканях ствола

У березы содержание сахаров в тканях во все даты отбора увеличивалось по мере роста концентрации раствора. В конце вегетации содержание сахаров у нее было в 2-4 раза выше по сравнению с тканями ольхи и осины. В тканях березы накапливались значительные количества сахарозы, у ольхи и осины присутствовала преимущественно фруктоза.

3.2.5. Активность расщепляющих сахарозу ферментов в зоне экспериментального воздействия на стволах березы повислой

Из всех исследованных ферментов наибольшей активностью обладала АпИнв. У опытных деревьев активность фермента была в 2-5,5 раз выше по сравнению с контрольными (49-112 и 21,4 мкмоль/г соответственно).

3.3. Метаболизация сахарозы и экспрессия гена ИУК-глюкоза синтазы в дифференцирующейся ксилеме карельской березы и над зоной кольцевания ствола обычной березы повислой

У узорчатых деревьев карельской березы активность АпИнв была в 3,5 раза выше, а уровень экспрессии гена, кодирующего ИУК-глюкоза синтазу, в 2,7 раза выше по сравнению с безузорчатыми деревьями.

В эксперименте с кольцеванием ствола березы повислой наибольшая активность АпИнв была отмечена в 1 зоне: во флоэме она была в 6,8 раза выше по сравнению с контролем, в ксилеме - в 20,7 раза выше; по мере удаления от кольца активность снижалась. Уровень экспрессии гена ИУК-глюкоза синтазы у окольцованных деревьев также был выше по сравнению с контролем: в слое

тканей, включавшем проводящую флоэму и камбий в 2-3 раза, в дифференцирующейся ксилеме в 1,2 раза. Со стороны флоэмы уровень экспрессии в зонах 1 и 2 был в 1,5 раза выше, чем в зонах, расположенных вверх по стволу.

Глава 4. Обсуждение результатов

4.1. Поступление растворов сахарозы в ткани ствола в эксперименте с введением экзогенных растворов

В тканях ствола березы расщепление сахарозы происходило в основном с участием апопластной инвертазы. Рост активности фермента при повышении концентрации раствора свидетельствует о поступлении экзогенной сахарозы внутрь тканей по апопласту. Известно, что сахара из экзогенных растворов быстро попадают в апопласт, из которого затем поступают внутрь клетки [Туркина 1961; Peel, Ford 1968].

4.2. Содержание растворимых сахаров в тканях ствола березы, ольхи и осины в эксперименте с введением экзогенной сахарозы

У всех трех видов наибольшее содержание сахаров было отмечено в слое, включающем проводящую флоэму и камбиальную зону. Накопление сахарозы происходило только в тканях березы; у ольхи и осины она практически отсутствовала, что может быть связано как с ее интенсивной утилизацией, так и с оттоком в другие органы. Показано, что корень ольхи обладает высокой аттрагирующей способностью к сахарам, где они используются азотфиксирующими симбионтами [Huss-Danell et al., 1982].

4.3. Влияние экзогенной сахарозы на частоту и локализацию антиклинальных делений камбиальных клеток у березы повислой

Увеличение частоты антиклинальных делений в вариантах С10% и С20% вызвало усиление паренхиматизации ксилемы и флоэмы. Высокие концентрации сахарозы стимулировали деление веретеновидных клеток камбия наклонными перегородками, в результате чего дифференцировались тяжи аксиальной паренхимы. Аналогичные деления происходят в стволе карельской березы при формировании узорчатой древесины [Барильская, 1978].

На тополе показано участие ауксина в регуляции локализации антиклинальных делений в пределах камбиальной зоны [Schrader et al., 2004]. Исходя из влияния глюкозы на полярный транспорт ауксина [Mishra et al., 2009], расширение зоны антиклинальных делений в сторону ксилемы в вариантах с высокими концентрациями сахарозы может быть связано с повышением активности АпИInv.

4.4. Приросты флоэмы во время эксперимента с введением экзогенной сахарозы

У всех исследованных видов отсутствовали различия по ширине приростов поздней флоэмы между вариантами эксперимента. При этом у березы при повышении концентрации сахарозы в растворе происходило уменьшение приростов ксилемы. Данный факт свидетельствует о различной чувствительности материнских клеток ксилемы и флоэмы к повышению концентрации сахарозы, что соответствует литературным данным [Krabel, 2000; Sundberg et al., 2000].

4.5. Влияние экзогенной сахарозы на количество и функциональное состояние паренхимных клеток поздней флоэмы

Важнейшей функцией паренхимы является накопление запасных соединений [Spicer, 2014; Morris, 2016]. Увеличение числа паренхимных клеток в проводящей флоэме березы при высоких концентрациях сахарозы указывает на значительное усиление в ткани функции запасаения.

Обращает на себя внимание разница в запасаемых метаболитах у исследованных видов. Если у ольхи и осины при введении высоких концентраций сахарозы накапливались фруктоза [Тарелкина и др., 2015] и крахмал, то у березы имел место более субстрато- и энергозатратный синтез липидов [Шуляковская и др., 2014] и танинов [Novitskaya, Kushnir, 2006], что свидетельствует о значительном повышении у нее содержания сахарозы в клетках.

По-видимому, у ольхи и осины имеются механизмы, способствующие быстрому освобождению проводящей флоэмы от избытка сахарозы. У березы, очевидно, концентрация сахарозы поднимается выше некоторого порогового значения, биохимические механизмы регуляции ее уровня (синтез запасных соединений) в рамках существующих клеток паренхимы оказываются недостаточно эффективными, и происходит образование новых запасяющих клеток.

4.6. Влияние экзогенной сахарозы на склерификацию клеток поздней флоэмы

У осины в поздней флоэме закладывались волокна, у ольхи и березы – склереиды. В наибольшей степени процесс склерификации был выражен у березы, что совпадает с результатами предыдущих экспериментов [Novitskaya, 2009]. Если у осины и ольхи наличие склеренхимы в проводящей флоэме является типичным для вида [Косиченко, 1969; Косиченко,

Лисичка, 1978; Trockenbrodt, 1991], то у березы в норме склериды здесь не образуются [Trockenbrodt, 1991; Еремин, Нитченко, 1996].

Считают, что склерификация клеток, заключающаяся в отложении толстых целлюлозных лигнифицированных оболочек, представляет собой способ выведения из обмена излишка сахаров [Новицкая, 2008; Novitskaya, 2009]. Исходя из наших данных, склерификация, очевидно, является механизмом, обеспечивающим выведение из обмена излишков сахарозы, но в определенных пределах ее концентрации. В этом случае сохранение структуры ткани у ольхи и осины в вариантах С10% и С20% свидетельствует о том, что у них количество сахарозы в проводящей флоэме не поднималось выше уровня, допускающего образование нетипичной склеренхимы. В период камбиального роста проводящая флоэма березы, по-видимому, функционирует в условиях повышенной загруженности сахарами в связи с высокой продуктивностью фотосинтеза у этого вида [Цельникер, Малкина, 1986]. Поэтому появление во флоэме дополнительной сахарозы может индуцировать развитие структурных аномалий, призванных утилизировать большие излишки дисахарида.

4.7. Особенности структуры ксилемы, сформированной в ходе эксперимента с введением экзогенной сахарозы

Локализация и клеточный состав средней зоны позволяют классифицировать ее как барьерную зону [Mullick, 1977; Shigo, Dudzik, 1985]. Увеличение ширины барьерной зоны у березы с ростом концентрации раствора согласуется с мнением, что интенсивность защитных реакций определяется поступлением воды и питательных веществ [Deflorio et al., 2009]. Структурные особенности паренхимных клеток средней зоны аналогичны клеткам аномальных скоплений паренхимы в узорчатой древесине карельской березы [Барильская, 1978; Любавская, 1978; Коровин и др., 2003]. Все авторы отмечают важную роль лучей в развитии аномалий. Полученные результаты впервые показывают возможный механизм формирования такого рода структурных аномалий.

Между средней и камбиальной зонами располагается периферическая зона ксилемы. У березы и ольхи важным ее отличием является отсутствие сосудов в нижней подзоне и их появление в верхней подзоне. Причиной указанных различий может быть замедление поступления растворов во второй половине эксперимента в связи с заживлением раневой поверхности коры. Исходя из этого, восстановление дифференциации сосудов является следствием некоторого понижения уровня сахарозы в тканях. У осины структура ксилемы в периферической зоне однородная, что указывает на высокую потенциальную

способность тканей ствола осины к утилизации больших количеств сахарозы в рамках типичного для вида камбиального роста.

4.8. Приросты ксилемы во время эксперимента с введением экзогенной сахарозы

Причинами снижения прироста у березы в вариантах С10% и С20%, по-видимому, были: 1) замена части периклиналильных делений клеток камбиальной зоны на антиклиналильные; 2) замедление роста клеток растяжением. Те же причины вызывают уменьшение прироста ксилемы в зоне структурных аномалий у карельской березы [Барильская, 1978; Коровин и др., 2003].

У ольхи во всех вариантах эксперимента приросты были намного шире, по сравнению с березой, что можно объяснить способностью этого вида к азотфиксации [Huss-Danell et al., 1982]. У осины высокий уровень изменчивости между отдельными деревьями по ширине прироста может быть связан с повреждением ксилемы неустановленным вредителем у двух деревьев в предыдущем вегетационном периоде. Введение раствора С20% оказало стимулирующее действие на камбий этих деревьев и не повлияло на камбиальную активность третьего дерева.

4.9. Влияние экзогенной сахарозы на ориентацию элементов ксилемы

Изменение ориентации проводящих элементов обычно связывают с нарушением полярного транспорта ауксина [Sachs, Cohen, 1982; Kurczyńska, Hejnowicz, 1991]. Учитывая это, формирование свилеватой древесины у березы в вариантах С10% и С20% можно рассматривать как показатель нарушения полярного транспорта гормона.

4.10. Влияние экзогенной сахарозы на дифференциацию лучевой и аксиальной паренхимы в ксилеме

У всех трех видов образованная в эксперименте ксилема содержала больше лучей по сравнению с нормой, что, очевидно, обусловлено эффектом ранения [Bhat, 1980; Rademacher et al., 1984; Arbellay et al., 2012]. Основной функцией лучей является радиальный транспорт и запасание питательных веществ [van Bel, 1990; Sokolowska, Zagórska-Marek, 2007, 2012 и др.]. Тенденция к увеличению числа и размеров лучей у березы с ростом концентрации сахарозы, очевидно, является следствием интенсификации этих процессов в эксперименте. Увеличение объема аксиальной паренхимы в ксилеме березы, по нашему мнению, также связано с утилизацией избытка сахаров. Ранее стимулирующее влияние сахарозы на дифференциацию клеток

паренхимы было показано на травянистых растениях [Horacio, Martinez-Noel, 2013].

4.11. Влияние экзогенной сахарозы на дифференциацию сосудов ксилемы

Строение узорчатой древесины березы и ольхи [Любавская, 1978; Коровин и др., 2003; Rioux et al., 2003; Novitskaya et al., 2016] имеет много общего с древесиной, сформированной под влиянием высоких концентраций сахарозы (10% и 20%). Сходство заключается в формировании аномальных лучей, увеличении числа клеток паренхимы, нарушении пространственной ориентации структурных элементов, уменьшении количества и размеров сосудов, появлении зон без сосудов.

Для дифференциации сосудов необходим свободный (физиологически активный) ауксин [Doley, Leyton, 1968; Aloni, Zimmermann, 1983; Junghans et al., 2004; Aloni, 2010, 2015]. Подавление этого процесса в эксперименте могло быть следствием инактивации гормона.

4.12. Инактивация ауксина через образование его конъюгата ИУК-глюкоза

Сосудистые растения способны к синтезу конъюгата ауксина ИУК-глюкоза [Sztejn et al., 1995; Ludwig-Müller, 2011] в результате взаимодействия ИУК и УДФ-глюкозы при участии ИУК-глюкоза синтазы [Michalczuk, Bandurski, 1982]. Установлена высокая корреляция между активностью данного фермента и экспрессией кодирующего его гена [Ostrowski, Jakubowska, 2014].

В наших экспериментах с введением экзогенных растворов и с кольцеванием ствола обычной березы повислой повышение уровня сахарозы вызвало рост активности АпИнв. Эта взаимосвязь отмечается многими авторами [Roitsch et al., 2003; Ruan et al., 2010]. Высокая активность АпИнв также имела место в случае формирования структурных аномалий тканей ствола карельской березы. У карельской березы и в зонах над кольцом у обычной березы выявлена сверхэкспрессия гена, кодирующего ИУК-глюкоза-синтазу, что свидетельствует об инактивации ауксина через синтез ИУК-глюкозы. Недавно было показано, что в образование УДФ-глюкозы, участвующей в этой реакции, могут вовлекаться гексозы, появляющиеся при инвертазном расщеплении сахарозы [Barratt et al., 2009]. Результатом обобщения наших и литературных данных явилась схема, демонстрирующая возможный путь инактивации ауксина при высокой активности апопластной инвертазы в камбиальной зоне (рис. 1).

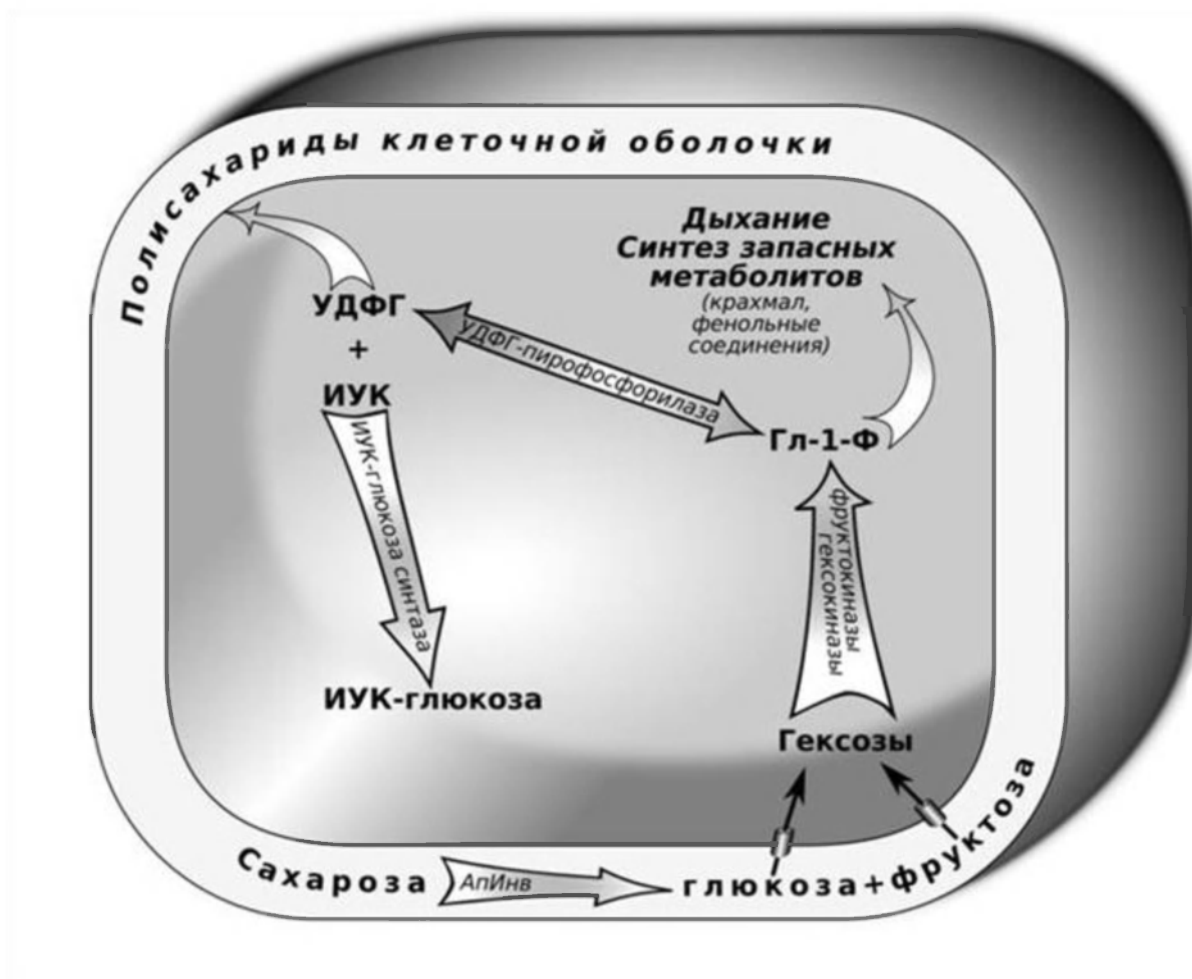


Рисунок 1. Схема инактивации ауксина в тканях с высокой активностью апопластной инвертазы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Введение сахарозы в ткани ствола березы повислой, ольхи серой и осины оказало влияние на формирование их проводящих тканей, но характер и степень проявления этого влияния у разных видов различались. У березы при высоких концентрациях экзогенной сахарозы формировались проводящие ткани, имеющие явное сходство с ксилемой и флоэмой карельской березы. Сильная паренхиматизация тканей и появление в ксилеме крупных прослоек паренхимы свидетельствуют о том, что у березы в зонах эксперимента накапливался значительный избыток сахарозы, утилизация которой шла за счет усиления функции запасаения. Дополнительным подтверждением наличия избытка сахарозы является повышение активности АпИнв в тканях. Сопоставление данных по частоте и локализации антиклинальных делений клеток камбиальной зоны указывает на сходство начальных этапов аномального морфогенеза в эксперименте и у карельской березы.

Сравнительный анализ тканей ствола карельской березы и тканей, сформированных в зонах искусственного повышения уровня сахарозы у березы повислой, позволил продемонстрировать взаимосвязь между высокой активностью апопластной инвертазы и инактивацией ауксина путем образования его конъюгата ИУК-глюкоза. Последнее, очевидно, оказывает подавляющее действие на дифференцировку сосудов ксилемы.

В отличие от березы, у ольхи и осины введение экзогенной сахарозы не вызвало существенных изменений в строении проводящих тканей. Наличие в паренхимных клетках проводящей флоэмы крупной центральной вакуоли и крахмала, а не липидов, свидетельствует об отсутствии большого избытка сахаров. В целом это дает основание считать, что у ольхи и осины имеются механизмы, сохраняющие уровень сахарозы в пределах, необходимых для поддержания типичных для этих видов моделей морфогенеза.

ВЫВОДЫ

1. В экспериментах с введением растворов сахарозы разной концентрации в ткани ствола березы повислой, ольхи серой и осины экзогенная сахароза достигала камбиальной зоны и оказывала влияние на формирование флоэмы и ксилемы.

2. Анатомо-морфологические особенности ксилемы и флоэмы обычной березы повислой, формирующихся на фоне высоких концентраций сахарозы, имеют явное сходство с аномальными по структуре проводящими тканями «узорчатых» деревьев карельской березы. В обоих случаях наблюдается блокировка/нарушение дифференциации сосудов ксилемы, изменение пространственной ориентации структурных элементов, формирование крупных прослоек паренхимы, склерификация клеток проводящей флоэмы.

3. При формировании структурных аномалий ствола карельской березы и при введении высоких концентраций сахарозы в ствол обычной березы повислой имеют место однотипные изменения ориентации плоскости деления клеток камбиальной зоны: значительно увеличивается частота антиклинальных делений.

4. У березы повислой уменьшение числа и размеров сосудов ксилемы, наблюдаемое на фоне высокой концентрации сахарозы, сопровождается повышением активности апопластной инвертазы и сверхэкспрессией гена, участвующего в инактивации ауксина (необходим для дифференцировки сосудов) путем образования его конъюгата ИУК-глюкоза. Предложена схема, демонстрирующая взаимосвязь между расщеплением сахарозы апопластной инвертазой и конъюгацией гормона.

5. Отсутствие существенных изменений в строении проводящих тканей у ольхи серой и осины при воздействии высоких концентраций сахарозы является следствием наличия у них эффективных механизмов утилизации избытка дисахарида в рамках присущего этим видам морфогенеза тканей ствола, включая образование толстостенных структурных элементов в проводящей флоэме (склереиды, волокна).

6. Развитие структурных аномалий, ведущих к формированию узорчатой древесины по типу карельской березы, связано с сильным повышением уровня сахарозы в камбиальной зоне ствола и утилизацией ее избытка, главным образом, через дифференцировку клеток запасяющей паренхимы. Сочетание этих процессов является особенностью березы повислой и не присуще другим древесным видам, поэтому данный тип текстуры древесины у них не образуется.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ:

Статьи в изданиях, рекомендованных ВАК РФ:

1. **Тарелкина Т.В.**, Новицкая Л.Л., Галибина Н.А. Содержание растворимых сахаров в тканях ствола березы, ольхи и осины в эксперименте с введением экзогенной сахарозы // Труды КарНЦ РАН. **2015**. № 12. Сер. Экспериментальная биология. С. 135-141.

2. **Tarelkina T.V.**, Novitskaya L.L., Nikolaeva N.N. Effect of sucrose exposure on the xylem anatomy of three temperate species // IAWA Journal. **2018**. V. 39. № 2. Pp. 156-176. (Web of Science, Scopus)

3. **Тарелкина Т.В.**, Новицкая Л.Л. Изменение частоты и локализации антиклинальных делений в камбиальной зоне березы повислой под влиянием сахарозы // Онтогенез. **2018**. Т. 49. № 4. С. 242-250. (Web of Science)

4. Novitskaya L.L., **Tarelkina T.V.**, Galibina N.A., Moshchenskaya Yu.L., Nikolaeva N.N., Nikerova K.M. Podgornaya M.N., Sofronova I.N., Semenova L.I. The formation of structural abnormalities in Karelian birch wood is associated with auxin inactivation and disrupted basipetal auxin transport // J. Plant Growth Regul. **2019**. DOI:10.1007/s00344-019-09989-8 (Web of Science, Scopus)

Материалы научных конференций:

1. Новицкая Л.Л., **Карелина Т.В. (Тарелкина Т.В.)**, Запечалова Д.С., Николаева Н.Н., Веселкова Л.Л. Моно- и дисахара как регуляторы ксилогенеза карельской березы // Мат. Междунар. конф. «Северная Европа в XXI веке: природа, культура, экономика». Петрозаводск, 24-27 октября 2006 г. Петрозаводск: КарНЦ РАН, **2006**. Т. 1. С. 161-163.

2. Novitskaya L.L., Nikolaeva N.N., **Karelina T.V. (Tarelkina T.V.)**, Zapevalova D.S. Regulation of woody plant cambial growth by sucrose level and C/N ratio // Proceedings of Society for Experimental Biology Annual Main Meeting «Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology». Glasgow, 31st March – 4th April 2007. Elsevier, **2007**. Vol. 146. P. S238.

3. **Карелина Т.В. (Тарелкина Т.В.)**, Новицкая Л.Л. Влияние различных концентраций сахарозы и продуктов ее расщепления на морфогенез проводящих тканей осины, ольхи и березы // Мат. Междунар. конф. «Структурные и функциональные отклонения от нормального роста и развития растений под воздействием факторов среды». Петрозаводск, 20-24 июня 2011 г. Петрозаводск: КарНЦ РАН, **2011**. С. 107-112.

4. **Карелина Т.В. (Тарелкина Т.В.)**, Новицкая Л.Л., Галибина Н.А. Влияние экзогенной сахарозы на содержание моно- и дисахаров в тканях ствола березы, ольхи и осины в период подготовки к состоянию покоя // Мат. Междунар. конф. «Структурные и функциональные отклонения от нормального роста и развития растений под воздействием факторов среды». Петрозаводск, 20-24 июня 2011 г. Петрозаводск: КарНЦ РАН, **2011**. С. 112-116.

5. **Тарелкина Т.В.**, Новицкая Л.Л., Галибина Н.А. Влияние экзогенной сахарозы на камбиальный рост осины, ольхи и березы // Тез. докл. Всеросс. науч. конф. с междунар. участием «Растения в условиях глобальных и локальных природно-климатических и антропогенных воздействий». Петрозаводск, 21-26 сентября 2015 г. Петрозаводск: КарНЦ РАН, **2015**. С. 520.

6. Новицкая Л.Л., Галибина Н.А., Мощенская Ю.Л., Николаева Н.Н., Никерова К.М., **Тарелкина Т.В.** Регуляция продуктивности древесных растений через изменение углеводного и гормонального статусов камбиальной зоны // Тез. докл. Всеросс. науч. конф. с междунар. участием «Бореальные леса: состояние, динамика, экосистемные услуги». Петрозаводск, 11–15 сентября 2017 г. Петрозаводск: КарНЦ РАН, **2017**. С. 202-204.

7. Новицкая Л.Л., Галибина Н.А., Мощенская Ю.Л., **Тарелкина Т.В.**, Николаева Н.Н., Никерова К.М. Изменение программы дифференцировки производных камбия в градиенте сахарозы и ауксина // Тез. докл. Всеросс. конф. с междунар. участием "Физиология растений - основа создания растений будущего". Казань, 18-24 сентября 2019 г. Казань. **2019**. С. 317.