

На правах рукописи



**МОЩЕНСКАЯ Юлия Леонидовна**

**АКТИВНОСТЬ САХАРОЗОСИНТАЗЫ В ХОДЕ КСИЛОГЕНЕЗА ДВУХ ФОРМ  
*BETULA PENDULA* ROTH, РАЗЛИЧАЮЩИХСЯ ПО ТЕКСТУРЕ ДРЕВЕСИНЫ**

**03.01.05 – «Физиология и биохимия растений»**

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Санкт-Петербург – 2017

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте леса Карельского научного центра 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», заведующая кафедрой

**Гончарова Эльза Андреевна,**  
доктор биологических наук, профессор,  
Федеральное государственное бюджетное  
научное учреждение «Федеральный  
исследовательский центр Всероссийский  
институт генетических ресурсов растений  
имени В.И. Вавилова», главный научный  
сотрудник

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук.

Защита состоится 7 июня 2017 года в 14:00 на заседании диссертационного совета Д002.211.02 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Ботаническом институте им. В.Л. Комарова Российской академии наук по адресу: 197376, Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д. 2.

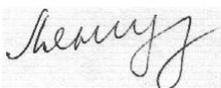
Тел. (812)372-54-42, факс (812)372-54-43, dissovet.d00221102@binran.ru

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

Автореферат разослан “ ” 2017 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,

доктор биологических наук



Лянгузова Ирина Владимировна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность работы.** В настоящее время одной из важных задач в области физиологии и биохимии растений является изучение механизмов ксилогенеза и продуктивности древесных растений. В основе ксилогенеза лежит процесс фиксации углерода в составе полимерных компонентов клеточных стенок ксилемы (целлюлозы, гемицеллюлоз, пектиновых веществ, лигнина). Главным источником углерода для биосинтеза полисахаридов является сахароза. Ее использование в метаболизме акцепторных тканей возможно лишь после предварительного расщепления инвертазой или сахарозосинтазой (Sturm, Tang, 1999; Winter, Huber, 2000; Koch, Zeng, 2002). У древесных растений при интенсивной дифференцировке ксилемных производных камбия сахарозосинтаза является основным ферментом, создающим акцепторную силу растущих тканей ствола (Hauch, Magel, 1998; Hertzberg et al., 2001; Coleman et al., 2009).

Несмотря на большое количество работ, посвященных изучению активности сахарозосинтазы (Winter, Huber, 2000; Hertzberg et al., 2001; Koch, Zeng, 2002; Coleman et al., 2008, 2009, 2010 и др.), существует очень мало данных о роли фермента в распределении углерода в акцепторных органах древесных растений. Малоизученным остается вопрос об активности фермента и экспрессии генов сахарозосинтазного ряда при разных сценариях ксилогенеза.

Одним из основных подходов к познанию закономерностей роста и развития растений является изучение отклонений от нормы. В этом отношении большой интерес для изучения камбиального роста древесных растений представляет форма березы повислой (*Betula pendula* Roth) – карельская береза (*B. pendula* Roth var. *carelica* (Mercl.) Hämet-Ahti), обладающая высокодекоративной, аномальной по строению древесиной. В зонах развития структурных аномалий не запускается программа гибели клеток, приводящая к формированию сосудов и трахеид ксилемы и ситовидных трубок флоэмы; дифференцирующиеся камбиальные производные сохраняют протопласт и превращаются в клетки запасующей паренхимы, которые накапливают большие количества липидов и таннинов (Novitskaya, Kushnir, 2006). Из всех древесных пород структурные аномалии тканей ствола у карельской березы выражены наиболее ярко, характеризуются большим разнообразием проявления в онтогенезе и высоким уровнем эндогенной изменчивости; их появление, развитие и затухание зависят от воздействия факторов среды. Естественный дискретный ареал карельской березы совпадает с участками относительно невысокого плодородия почвы (Новицкая, 2008). Исследования, проведенные на деревьях карельской березы, показали, что увеличение содержания экзогенных нитратов в почве приводит к нормализации строения древесины. Было выдвинуто предположение, что ограничение ареала карельской березы со стороны плодородных почв может быть обусловлено смещением зоны интенсивного апопластного усвоения сахарозы в сторону флоэмы под влиянием высоких доз азотного питания (Галибина и др., 2016).

Изучение активности сахарозосинтазы у форм березы повислой с нормальным и аномальным строением древесины может быть полезным с точки зрения познания механизмов ксилогенеза древесных растений. Наряду с этим, проведение таких исследований представляется важным для выявления причин развития морфогенетических аномалий карельской березы.

**Состояние исследований.** В литературе имеется большое количество данных о роли сахарозосинтазы в формировании компонентов клеточной стенки и накоплении запасных метаболитов (Coleman et al., 2010; An, 2014; Gerber et al., 2014 и др.). Изучение активности сахарозосинтазы и экспрессии кодирующих ее генов проводилось, главным образом, на травянистых растениях (Bieniawska et al., 2007; Barratt et al., 2009; Patrick et al., 2013 и др.). На древесных растениях такие исследования проводились в основном на растениях тополя (Zhang, 2011; Gerber, 2014). Показана специфичность экспрессии генов *SUS1*, *SUS2* и *SUS3* для ксилемы древесных растений (Geisler-Lee et al., 2006; Zhang, 2011; Gerber, 2014). На растениях гороха показано позитивное влияние нитратного азота на активность сахарозосинтазы в акцепторных тканях (Брускова и др., 2009; Никитин, Измайлов, 2016).

#### **Цель и задачи исследования:**

Целью данной работы является сравнительное изучение деятельности сахарозосинтазы, – ключевого фермента углеводного обмена, у растений обычной березы повислой (*B. pendula* var. *pendula*) с нормальным строением древесины и карельской березы (*B. pendula* var. *carelica*) с аномальной древесиной, для определения роли фермента в протекании ксилогенеза древесных растений.

Для достижения указанной цели были поставлены следующие задачи:

1. в период активного камбиального роста исследовать активность сахарозосинтазы в тканях ствола деревьев березы повислой с нормальным и аномальным строением древесины;
2. изучить активность сахарозосинтазы у взрослых деревьев обычной березы повислой и карельской березы с разной степенью узорчатости древесины на разных этапах вегетационного периода;
3. исследовать активность сахарозосинтазы в раннем онтогенезе березы повислой;
4. изучить уровень экспрессии кодирующих сахарозосинтазу генов у взрослых растений и сеянцев березы повислой.

**Научная новизна и практическая значимость работы.** Впервые выявлена обратная зависимость между активностью сахарозосинтазы и степенью проявления признаков аномального морфогенеза у деревьев березы повислой; показаны различия в активности сахарозосинтазы у растений, выращенных из семян обычной березы повислой и карельской березы, на ранних этапах онтогенеза; обнаружены различные уровни транскрипции генов *SUS1*, *SUS2* *SUS3* у деревьев, отличающихся по степени проявления признаков узорчатости древесины. Изучение деятельности основных сахарозорасщепляющих ферментов необходимо для понимания механизмов формирования древесины растений. Фермент сахарозосинтаза определяет включение сахарозы в метаболизм клеток камбиальной зоны древесных растений, влияя, тем самым, на строение и качество древесины. В диссертационной работе описаны биохимические механизмы регуляции метаболизма сахарозы в связи с образованием высокодекоративной древесины карельской березы. Полученные данные могут быть использованы при поиске путей управления этим процессом.

#### **Положения, выносимые на защиту:**

1. Деревья обычной березы повислой и карельской березы различаются по активности сахарозосинтазы в тканях ствола. Низкий уровень активности фермента в ксилеме коррелирует с проявлением признаков аномального морфогенеза проводящих тканей карельской березы.
2. Активность сахарозосинтазы в тканях ствола березы повислой коррелирует с интенсивностью камбиального роста. Наиболее высокая активность исследуемого

фермента наблюдается в тканях с высоким содержанием целлюлозы и поддерживается за счет высокой экспрессии гена *SUS1*

3. Различия активности сахарозосинтазы в тканях ствола обычной березы повислой и карельской березы проявляются в раннем онтогенезе и определяются не только эндогенными, но и экзогенными факторами, в частности, уровнем доступного азота.

**Апробация работы:** материалы диссертации были представлены на II (X) Международной Ботанической Конференции молодых ученых (С.-Петербург, 2012); 18-й Международной Пущинской школе-конференции «Биология - Наука XXI века» (Пущино, 2014); Международной конференции и школе молодых ученых «Физиология растений – теоретическая основа инновационных агро- и фитобиотехнологий» (Калининград, 2014); Всероссийской конференции с международным участием «Растения в условиях глобальных и локальных природно-климатических и антропогенных воздействий» (Петрозаводск, 2015); Научной конференции с международным участием и школе молодых ученых «Сигнальные системы растений: от рецептора до ответной реакции организма» (С.-Петербург, 2016); IV Российском симпозиуме с международным участием «Фитоиммунитет и клеточная сигнализация у растений» (Казань, 2016).

**Личный вклад автора в проведенные исследования.** Автором самостоятельно проведен анализ отечественной и зарубежной литературы по теме исследований. Автор лично принимала участие в разработке темы, планировании и постановке экспериментов, сборе экспериментальных данных и обработке полученных результатов, подготовке публикаций по теме диссертационной работы и представлении результатов на научных конференциях.

**Публикации:** по материалам диссертации опубликовано 12 работ, в том числе 4 статьи в рецензируемых журналах из списка ВАК (2 – Scopus и Web of Science).

**Структура и объем работы:** диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследования, результатов, обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Список литературы включает 200 наименований, из них 160 на иностранных языках. Диссертация изложена на 108 страницах машинописного текста, содержит 2 таблицы и 39 рисунков.

**Благодарности.** Автор выражает благодарность научному руководителю д.б.н. Новицкой Л.Л. за поддержку и консультации на протяжении всех этапов выполнения работы, к.б.н. Галибиной Н.А. за неоценимую помощь в планировании лабораторных исследований и обсуждении полученных результатов. Автор хотел бы поблагодарить Софронову И.Н., Подгорную М.Н., Коржову М.А. и Никерову К.М. за помощь в сборе экспериментального материала и проведении биохимических исследований.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.

На основе имеющихся в литературных источниках данных описаны типы структурных элементов ксилемы, состав и строение их клеточных стенок, а также основные стадии ксилогенеза древесных растений. Рассматривается гистологический состав, особенности строения древесины и некоторые метаболические особенности разных форм березы повислой как ценного объекта для познания механизмов ксилогенеза древесных растений. Проанализированы данные о роли сахарозосинтазы в растительном организме, ее участии в ксилогенезе и возможных механизмах регуляции активности фермента и уровня экспрессии кодирующих генов.

## Глава 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для изучения роли сахарозосинтазы в ходе аномального морфогенеза карельской березы использовали:

1. **6-летние** растения обычной березы повислой с нормальным строением древесины (*Betula pendula* Roth var. *pendula*) и узорчатой карельской березы (*B. pendula* Roth var. *carelica* (Mercl.) Hämet-Ahti) – для определения активности сахарозосинтазы в период активного камбиального роста (3.07) и **10-летние** растения обычной березы и карельской березы с узорчатой и безузорчатой древесиной ствола – для определения в период активного камбиального роста (29.06) активности сахарозосинтазы и уровня экспрессии кодирующих генов.

2. **8-летние** узорчатые и безузорчатые деревья карельской березы и **40-летние** деревья обычной березы повислой и карельской березы с признаками узорчатости ствола – для определения активности сахарозосинтазы на разных этапах вегетационного периода. Отбор растительного материала для анализа проводили в мае (19.05), июне (20.06), июле (20.07) и октябре (12.10) 2010 года.

3. **47-летние** растения обычной березы повислой и карельской березы с признаками узорчатости ствола – для определения уровня экспрессии генов *SUS1* и *SUS2* в тканях ствола в период активного камбиального роста (15.06).

С внутренней стороны коры вырезали слой тканей, включающий проводящую флоэму и камбиальную зону (далее «флоэма»). С обнаженной поверхности древесины вырезали слой тканей, включающий зону деления, роста и дифференциации клеток ксилемы (далее «ксилема»). Отбор тканей контролировали под микроскопом. Взрослые растения, взятые для анализа, произрастали в одинаковых почвенно-климатических условиях на Агробиологической станции КарНЦ РАН в 2 км от г. Петрозаводска (61° 45' с.ш., 34° 20' в.д.).

4. **1,5- и 5-месячные** сеянцы обычной березы повислой и карельской березы, выращенные при нормальных условиях на питательном грунте Terra Vita (N – 0,91%, P – 0,2%, K – 0,094%) и 5-месячные сеянцы березы повислой, выращенные в условиях недостатка азотного питания на естественном почвогрунте (почвенный горизонт Vf), состава N – 0,095%, P – 0,051%, K – 0,065% – для определения активности сахарозосинтазы на ранних этапах онтогенеза в норме и в условиях низкой обеспеченности азотом. Сеянцы выращивали в камере при температуре 23°C, 16-часовом фотопериоде, освещенности 8 клк. 1,5-месячные растения использовали также для исследования уровня экспрессии генов *SUS1* и *SUS2*. Для анализа брали стебли и корни.

Сеянцы выращены из семян, полученных от контролируемого опыления (Forelia OY, Финляндия). Семена карельской березы получены от родительских деревьев с ярко выраженными признаками узорчатости древесины.

Для проведения биохимических исследований и проведения ПЦР ткани, взятые для анализа, сразу замораживали, а затем растирали в жидком азоте.

### Определение активности сахарозосинтазы.

Полученную навеску ткани гомогенизировали при 4°C в буфере следующего состава: 50 mM Hepes (pH = 7,5), 1mM ЭДТА, 1 mM ЭГТА, 3 mM ДТТ, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM PMSF. После 20-минутной экстракции гомогенат центрифугировали при 10000 g в течение 20 минут (центрифуга Sigma 2-16PK, Германия). Осадок трехкратно промывали буфером. Объединенный супернатант диализовали при 4°C в течение 18-20 часов против буфера для гомогенизации, разбавленного в 10 раз. Активность фермента определяли после инкубации полученного препарата при 30°C в течение 30

минут. Инкубационная среда для определения активности сахарозосинтазы в направлении распада сахарозы содержала: 200 мМ Hepes (pH 7,8), 65 мМ УДФ, 50 мМ НАДФ, 50 мМ РР, 210 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1 М сахарозу, 8U фосфоглюкомутазы, 4U глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы; для определения активности сахарозосинтазы в направлении синтеза сахарозы: 73 мМ трис-HCl (pH 7,5), 2,5 мМ УДФ-глюкоза, 20 мМ фруктоза, 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 3 мМ DTT. Активность фермента определяли спектрофотометрически, выражали в мкмоль сахарозы на мг белка за 30 мин (мкмоль сахарозы/мг белка·30мин). Содержание белка для пересчета активности фермента определяли по методу Бредфорда (Bradford, 1976) с использованием красителя Coomassie G250.

**Определение содержания растворимых углеводов.** Для определения сахаров весь растительный материал лиофильно высушивали. Экстракцию углеводов проводили при помощи стандартной методики (Галибина и др., 2012). Полученный экстракт пропускали через бумажные фильтры, а затем подвергали очистке методом твердофазной экстракции (ТФЭ). Содержание растворимых углеводов в экстракте анализировали на системе высокоэффективной жидкостной хроматографии серии «Стайер» (Аквилон, Россия). Содержание углеводов выражали в мг на г сырой ткани (мг/г сырой ткани).

**Определение содержания крахмала.** Крахмал экстрагировали из растительных тканей хлорной кислотой по методу Пьючера (Pucher et al., 1948). Содержание крахмала определяли глюкозооксидазным методом по количеству глюкозы, образовавшейся в результате кислотного гидролиза (Плешков, 1985).

**Определение содержания целлюлозы.** Целлюлозу выделяли по методу Кюршнера-Хоффера смесью концентрированной азотной кислоты и этилового спирта (Оболенская и др., 1991) в соотношении 1:4 (по объему). Содержание целлюлозы определяли гравиметрическим методом.

**Определение уровня экспрессии генов.** Накопление транскриптов генов анализировали при помощи полимеразной цепной реакции (ПЦР).

**Выделение тотальной РНК и синтез комплементарной ДНК (кДНК).** Процедуру выделения тРНК проводили с помощью реагента Extract RNA (Евроген, Россия) согласно протоколу производителя. кДНК синтезировали, используя набор реактивов для обратной транскрипции MMLV RT kit (Евроген, Россия).

**ПЦР в режиме реального времени.** Амплификацию образцов проводили в приборе iCycler с оптической приставкой iQ5 («Bio-Rad», США), используя наборы для амплификации с интеркалирующим красителем SYBR Green («Евроген», Россия). В качестве референсного гена для расчета относительной экспрессии *SUS* использовали ген  $\alpha$ -тубулина. Специфические праймеры для амплификации участков исследуемых генов конструировали с помощью программного обеспечения Primer Express Software (Applied Biosystems). Нуклеотидная последовательность праймеров для проведения ПЦР:  *$\alpha$ -TUBULIN* (FJ228477.1): прямой: 5'CTACCCAGAAATCCACTT, обратный: 5'TAGGCACAACATCACCCAC; *SUS1* (KC204973.1): прямой: 5'GTTCCCTCAACCGTCACCT, обратный: 5'GCATCAACCCCTGTCCT; *SUS2* (KC204974.1): прямой: 5'CTGCTAACCGCAACGAAAT, обратный: 5'ACCGCCAAGGCAACCCAC; *SUS3* (KC204975.1): прямой: 5'CAGTGGGTTTCTCGTTTC, обратный: 5'AGCGTGAGCAATAGTTCC. Эффективность ПЦР для праймеров для референсного и целевых генов определяли путем проведения ПЦР с последовательными

разбавлениями исследуемого образца кДНК (Ребриков и др., 2011). Относительный уровень транскриптов генов (RQ) вычисляли по формуле:

$$RQ = 2^{\Delta C_t},$$

где  $\Delta C_t$  – разница значений пороговых циклов для референсного и целевого генов, 2 – эффективность ПЦР. Уровень экспрессии специфических генов выражали в относительных единицах (отн. ед.), нормализованных к уровню экспрессии референсного гена.

Исследования выполнены на оборудовании ЦКП «Аналитическая лаборатория» ИЛ КарНЦ РАН.

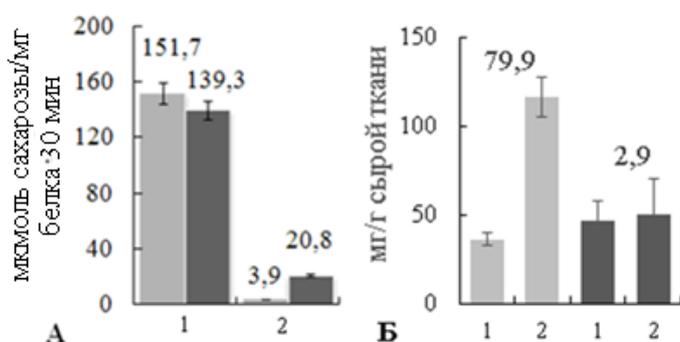
**Статистическая обработка данных.** Статистическую обработку результатов исследования проводили общепринятыми методами с использованием пакетов программ Microsoft Excel и StatGraphics для Windows. Данные представлены в виде средних арифметических значений по биологической повторности в количестве 5-10 деревьев каждой группы. Аналитическая повторность трехкратная. Различия в распределении показателей между группами растений определяли методом оценки значимости различий средних величин (t-критерий Стьюдента). Статистически значимыми считались различия при  $p < 0,05$ . Взаимосвязь показателей активности сахарозосинтазы и экспрессии кодирующих ее генов оценивали при помощи регрессионного и корреляционного анализа.

### Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ.

#### 3.1 Активность сахарозосинтазы в период камбиального роста

##### 3.1.1 Ксилема и флоэма ствола обычной березы повислой и карельской березы с признаками развития структурных аномалий

В ходе исследования показано, что у 6-летних деревьев обычной березы в период интенсивного камбиального роста активность сахарозосинтазы преобладала в ксилеме (Рис. 1А). Различие тканей ствола по активности сахарозосинтазы соответствовало высокому градиенту концентрации сахарозы между флоэмой и ксилемой (Рис. 1Б), что говорит об интенсивном оттоке сахарозы из флоэмы в ксилему, где она расходуется на ростовые процессы. О более интенсивном протекании ростовых процессов в ксилеме свидетельствует также высокое значение отношения содержания фруктозы и глюкозы (фру/глю) в данной ткани (3,3) по сравнению с флоэмой (1,1).



**Рис. 1.** Активность сахарозосинтазы (А) и содержание сахарозы (Б) в ксилеме (1) и флоэме (2) 6-ти летних деревьев *B. pendula var. pendula* (светлые столбики) и *var. carelica* (темные столбики). Бары – стандартное отклонение.

У 6-летних деревьев карельской березы активность сахарозосинтазы в ксилеме значимо не отличалась от деревьев обычной березы повислой. В то же время активность сахарозосинтазы во флоэме деревьев карельской березы значимо превышала данный показатель у обычной березы (Рис. 1А). У карельской березы

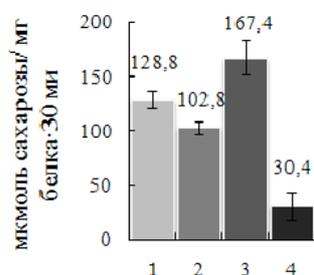
показаны низкие значения градиента концентрации сахарозы между флоэмой и ксилемой (Рис. 1Б) и отношения фру/глю в ксилеме (2,8).

В целом полученные данные указывают на (1) более слабое использование сахарозы в формировании клеточных стенок ксилемы карельской березы, по сравнению с обычной березой повислой, и активизацию этих процессов во флоэме, (2) замедление оттока сахарозы из флоэмы в ксилему, (3) некоторое ослабление ростовых процессов в ксилеме и их усиление во флоэме.

### 3.1.2 Ксилема ствола деревьев обычной березы повислой и карельской березы с разной степенью проявления узорчатости

#### Активность сахарозосинтазы

У обычной березы повислой в конце июня наблюдали высокую активность сахарозосинтазы в ксилеме (Рис. 2, столбец 1). У карельской березы в вариантах с обычным строением древесины активность фермента также была высокой (Рис. 2, столбцы 2,3).

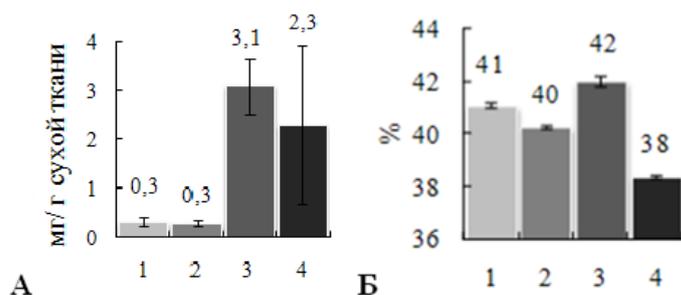


**Рис. 2.** Активность сахарозосинтазы в ксилеме 10-летних деревьев *Betula pendula* Roth: 1 – *B. pendula* var. *pendula*; 2-4 – *B. pendula* var. *carelica* (2 – безузорчатые деревья карельской березы; 3 – безузорчатая часть ствола узорчатых деревьев карельской березы; 4 – узорчатая часть ствола карельской березы). Бары – стандартное отклонение.

В ксилеме безузорчатых деревьев этот показатель был в 1,3 раза ниже, а в безузорчатой части ствола узорчатых деревьев в 1,3 раза выше, чем у обычной березы. В узорчатых участках ствола карельской березы активность сахарозосинтазы в ксилеме была самой низкой (Рис. 2, столбец 4).

#### Содержание крахмала

В период камбиального роста у обычной березы и безузорчатых растений карельской березы запасание крахмала в ксилеме происходит слабо (Рис. 3А, столбцы 1,2). Низкое содержание крахмала в ксилеме растений с нормальным строением древесины наблюдаются на фоне высокой активности сахарозосинтазы. В ксилеме узорчатых деревьев карельской березы накапливалось большое количество крахмала (Рис.3А, столбцы 3,4). Накопление крахмала в безузорчатой части ствола узорчатых деревьев карельской березы происходит на фоне высоких значений активности сахарозосинтазы; в узорчатой части, напротив, – на фоне низкой активности фермента.



**Рис. 3.** Содержание крахмала (А) и целлюлозы (Б) в зоне формирования ксилемы в стволах деревьев обычной березы повислой и карельской березы. Обозначения как на Рис. 2.

#### Содержание целлюлозы

В ксилеме деревьев обычной березы содержание целлюлозы составило 41%. У карельской березы в вариантах с обычной текстурой древесины (безузорчатые растения и безузорчатая часть ствола узорчатых растений) значения этого показателя отличались от обычной березы незначительно и составили 40 и 42%. Самые низкие значения (38%) были у карельской березы в ксилеме узорчатой части ствола (Рис. 3Б).

### 3.2 Активность сахарозосинтазы на разных этапах вегетационного периода

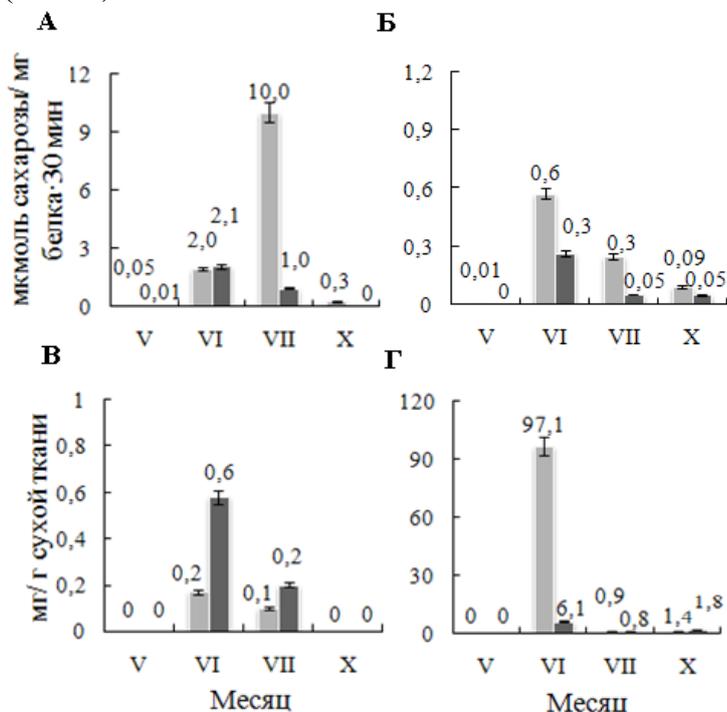
#### 3.2.1 Ксилема и флоэма ствола безузорчатых и узорчатых деревьев карельской березы

В ходе проведенной работы на разных этапах вегетационного периода была исследована активность сахарозосинтазы в тканях ствола 8-летних безузорчатых и узорчатых деревьев карельской березы.

##### Безузорчатые деревья

У безузорчатых растений в мае и октябре на фоне низкой активности сахарозосинтазы в тканях ствола наблюдается низкое содержание крахмала или его отсутствие (Рис. 4).

В июне в ксилеме значения активности сахарозосинтазы были низкими, а содержание крахмала составило 0,2 мг/г сухой ткани (Рис. 4). Во флоэме активность фермента была в 3,4 раза ниже, чем в ксилеме, в то же время для флоэмы это значение активности было самым высоким за весь исследуемый период и коррелировало с большим накоплением крахмала (Рис. 4). В июле активность сахарозосинтазы в ксилеме возросла в 5 раз, что сопровождалось снижением содержания крахмала (Рис. 4). Сильное увеличение в июле в ксилеме активности фермента сопровождалось снижением его активности во флоэме и резким падением здесь содержания крахмала (Рис. 4).



**Рис. 4.** Активность сахарозосинтазы (А, Б) и содержание крахмала (В, Г) в ксилеме (А, В) и флоэме (Б, В) 8-летних безузорчатых (светлые столбики) и узорчатых (темные столбики) деревьев карельской березы на разных этапах вегетационного периода. Бары – стандартное отклонение.

##### Узорчатые деревья

В мае и октябре активность сахарозосинтазы в ксилеме и флоэме узорчатых деревьев практически отсутствовала (Рис. 4А). В июне активность фермента в ксилеме узорчатых растений была примерно такой же, как у безузорчатой карельской

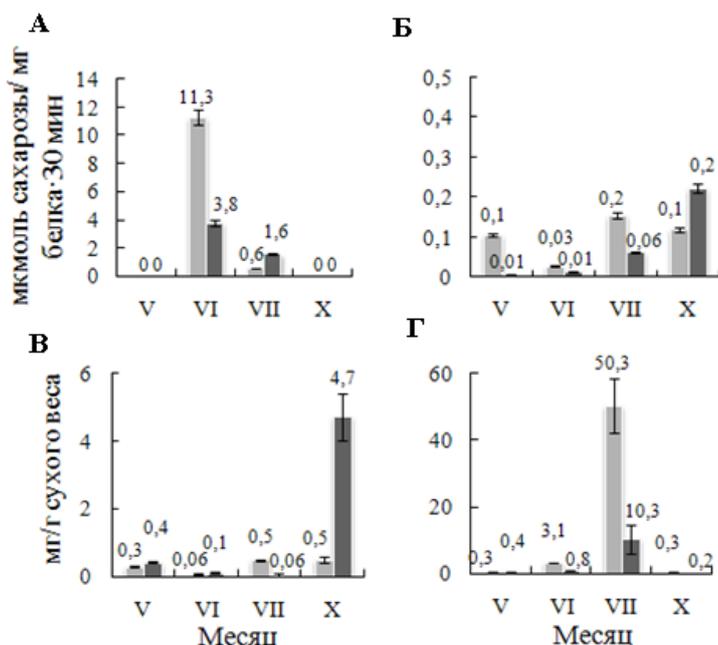
березы (Рис. 4А). Во флоэме активность сахарозосинтазы у узорчатых растений была в 2 раза ниже по сравнению с безузорчатыми (Рис. 4Б). В июле активность сахарозосинтазы узорчатых деревьев ниже, чем у безузорчатых (Рис. 4): в ксилеме в 10 раз, во флоэме в 5 раз. В ксилеме узорчатых растений активность сахарозосинтазы в июле, по сравнению с июнем, была ниже в 2 раза, что сопровождалось снижением количества крахмала в 3 раза (Рис. 4). Во флоэме у данной группы растений падение активности сахарозосинтазы сопровождалось резким снижением содержания крахмала в паренхимных клетках флоэмы (Рис. 4).

### 3.2.2 Ксилема и флоэма ствола обычной березы повислой и узорчатых деревьев карельской березы

Активность сахарозосинтазы исследовали в ксилеме и флоэме 40-летних деревьев обычной березы повислой и узорчатых деревьев карельской березы в мае, июне, июле и октябре.

#### Обычная береза повислая

В мае до начала ростовых процессов у деревьев обычной березы активность сахарозосинтазы в ксилеме полностью отсутствует, во флоэме ее значения были низкими (Рис. 5А). По сравнению с 8-летними безузорчатыми растениями карельской березы у 40-летних деревьев березы повислой в конце июня активность сахарозосинтазы в ксилеме (Рис. 5А) существенно выше. На фоне высокой активности сахарозосинтазы в ксилеме, во флоэме активность фермента была в 19 раз ниже, по сравнению с 8-летними безузорчатыми деревьями. В июле активность сахарозосинтазы в ксилеме не только не увеличилась, как это наблюдали у 8-летних растений, но резко, в 21 раз, снизилась. При этом во флоэме активность сахарозосинтазы возросла в 5 раз (Рис. 5Б). Октябрьский срок фиксации растительного материала соответствовал этапу подготовки березы к периоду покоя. В это время активности сахарозосинтазы в ксилеме, также как и у 8-летних растений, не наблюдалось, во флоэме этот показатель значимо не изменился (Рис. 5А, Б).



**Рис. 5.** Активность сахарозосинтазы (А, Б) и содержание крахмала (В, Г) в ксилеме (А, В) и флоэме (Б, В) 40-летних деревьев обычной березы повислой (светлые столбики) и узорчатых деревьев карельской березы (темные столбики) деревьев карельской березы на разных этапах вегетационного периода. Бары – стандартное отклонение.

Содержание крахмала в июне при высокой активности сахарозосинтазы в ксилеме и низкой во флоэме, было низким в обеих тканях (Рис. 5) (в 2,8 и 31 раз ниже по сравнению с 8-летними безузорчатыми деревьями). В июле в ксилеме на фоне низкой активности сахарозосинтазы наблюдалось повышение содержания крахмала в 8 раз,

во флоэме при возрастании активности фермента содержание крахмала увеличилось в 16 раз. Таким образом, во флоэме накопление крахмала происходило намного интенсивнее (Рис. 5). Максимальное значение отношения фру/глю наблюдали в июне в ксилеме (1,3). Что касается флоэмы, то здесь в июне было отмечено минимальное для этой ткани отношение фру/глю (0,9). В целом это предполагает концентрацию ростовых процессов в ксилеме в данный период и их отсутствие или очень низкий уровень во флоэме. Величина градиента концентрации сахарозы между флоэмой и ксилемой в июне составила 74,5 мг/г сырой ткани, что свидетельствует об активном расщеплении сахарозы в ксилеме. В июле в ксилеме наблюдается существенное снижение отношения фру/глю (1,3 → 0,90). Во флоэме этот показатель, по сравнению с июнем, практически не меняется (0,9 → 1,0). В мае и октябре значения отношения фру/глю в ксилеме самые низкие за все сроки взятия образцов (0,7 и 0,3 соответственно). Это наблюдается на фоне полного отсутствия активности сахарозосинтазы и высокого содержания крахмала (Рис. 5) в ткани. Во флоэме значение отношения фру/глю в мае составило 1,0, в октябре 1,3.

#### *Карельская береза*

В ксилеме 40-летних деревьев карельской березы в мае активность сахарозосинтазы, так же как и у обычной березы отсутствует. Во флоэме в этот период активность сахарозосинтазы была минимальной (Рис. 5А). В июне в ксилеме карельской березы активность сахарозосинтазы была в 3 раза ниже, чем у обычной березы повислой. В июле активность сахарозосинтазы в ксилеме снизилась в 2,4 раза (Рис. 5А). Также как и для 8-летних безузорчатых растений карельской березы, для 40-летней узорчатой карельской березы в июне характерна более низкая активность сахарозосинтазы во флоэме, по сравнению с ксилемой (Рис. 5А). По сравнению с обычной березой в июне активность сахарозосинтазы во флоэме карельской березы была в 2 раза ниже. В июле ее значения возрастали (Рис. 5А). В октябре активность сахарозосинтазы в ксилеме карельской березы отсутствует (Рис. 5А), так же, как это наблюдалось у обычной березы повислой (Рис. 5А). Во флоэме в этот период у узорчатых растений активность сахарозосинтазы была выше, по сравнению с обычной березой повислой.

Содержание крахмала в тканях ствола карельской березы в мае так же, как у обычной березы повислой, было низким (Рис. 5Б). В июне содержание крахмала в ксилеме карельской березы при снижении метаболизации сахарозы сахарозосинтазой не увеличилось, как у обычной березы, а, наоборот, снизилось (Рис. 5Б). Во флоэме карельской березы содержание крахмала в июне было ниже, по сравнению с обычной березой повислой. В июле повышение активности сахарозосинтазы во флоэме сопровождалось накоплением крахмала (Рис. 5Б). Однако у карельской березы накопление крахмала во флоэме происходило менее интенсивно, чем это наблюдалось у растений с нормальной структурой древесины (Рис. 5Б).

Значения отношения фру/глю в ксилеме узорчатых растений карельской березы было низким на протяжении всего вегетационного периода (не более 1,1). Наиболее высокие значения отношения фру/глю у карельской березы наблюдали во флоэме в июне (1,4) и до начала ростовых процессов – в мае (1,2) (у обычной березы повислой отношение фру/глю в июне больше в ксилеме). Величина градиента концентрации сахарозы между флоэмой и ксилемой в период активного роста (июнь) у карельской березы (23,1 мг/г сырой ткани) в 3 раза ниже, чем у обычной березы повислой.

### 3.3 Активность сахарозосинтазы в раннем онтогенезе березы повислой

#### 3.3.1 Активность сахарозосинтазы в акцепторных органах 1,5-месячных сеянцев березы повислой

У сеянцев *B. pendula* var. *pendula* активность фермента в стебле была низкой. Притекающая из листьев сахароза, расщеплялась преимущественно в корнях, о чем говорит высокая активность здесь сахарозосинтазы (Рис. 7). У сеянцев *B. pendula* var. *carelica* метаболизация сахарозы также проходила преимущественно в корнях. Активность сахарозосинтазы здесь (Рис. 7) была в 2,4 раза больше, чем в стебле. По сравнению с сеянцами обычной березы повислой, растения, выращенные из семян карельской березы, имели более высокую активность сахарозосинтазы, как в стебле (в 1,5 раза), так и в корне (в 2 раза).

#### 3.3.2 Активность сахарозосинтазы 5-месячных сеянцев березы повислой

У 5-месячных сеянцев *B. pendula* var. *pendula* возрастает метаболизация сахарозы, особенно в надземной части. Так, в стебле 5-месячных сеянцев активность сахарозосинтазы в 7 раз выше по сравнению с 1,5-месячными растениями. В корнях к 5-месяцам также возрастает активность сахарозосинтазы (в 2,5 раза) (Рис. 6). У 5-месячных сеянцев *B. pendula* var. *carelica*, по сравнению с 1,5-месячными растениями в стебле незначительно возрастает активность сахарозосинтазы (Рис. 6). В корнях, наоборот, отмечается снижение активности сахарозосинтазы (Рис. 6).

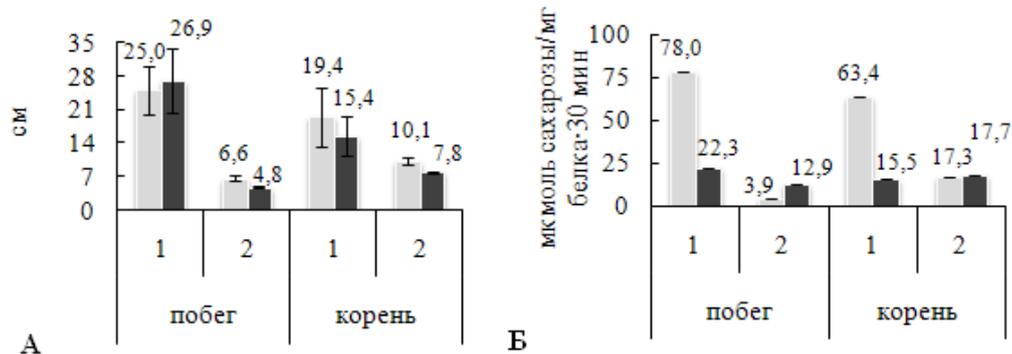


Рис. 6. Активность сахарозосинтазы в акцепторных органах 1,5 и 5-месячных сеянцев обычной березы повислой (светлые столбики) и карельской березы (темные столбики). Бары – стандартное отклонение.

Таким образом, при достижении 5-месячного возраста, активность сахарозосинтазы в стебле начинает преобладать у растений, выращенных из семян обычной березы повислой по сравнению с сеянцами карельской березы, т.е. наблюдаются различия в активности сахарозосинтазы между двумя формами березы повислой, показанные ранее на взрослых растениях. Высокие значения активности сахарозорасщепляющих ферментов в стебле свидетельствуют, что у 5-месячных сеянцев он становится основным аттрагирующим органом.

#### 3.3.3 Влияние низкой обеспеченности азотом на активность сахарозосинтазы и морфометрические показатели у сеянцев березы повислой

Активность сахарозосинтазы исследовали в акцепторных органах сеянцев разных форм березы повислой, выращенных в условиях нормального азотного питания и условиях дефицита азота.



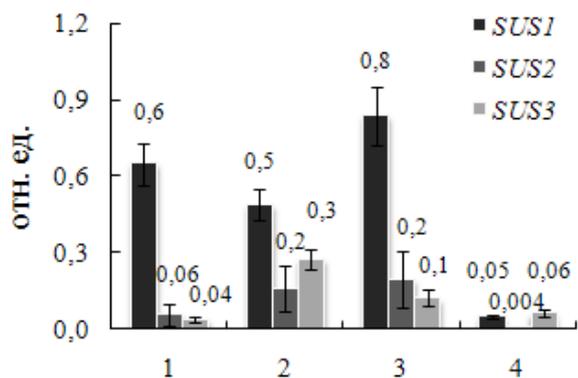
**Рис. 7.** Длина побега и корней (А) и активность сахарозосинтазы (Б) в акценторных органах 5-месячных сеянцев обычной березы повислой (светлые столбики) и карельской березы (темные столбики), выращенных при нормальном (1) и недостаточном (2) уровне азота.

У растений, выращенных на бедных почвах, по сравнению с нормой, существенно снизилась длина побега (в 4 и 6 раз у обычной и карельской березы соответственно). При этом длина корней у обеих форм березы повислой уменьшилась всего в 2 раза (Рис. 7А). У сеянцев *B. pendula* var. *pendula*, выращенных на почвах с низким содержанием доступного азота, по сравнению с нормой, снижалась метаболизация сахарозы за счет активности сахарозосинтазы в стебле и в корнях (Рис. 7Б). Так, в стебле активность сахарозосинтазы снизилась в 20 раз, а в корне активность фермента уменьшилась в 4 раза. У растений карельской березы также снижалась метаболизация сахарозы в стебле, в корне существенного изменения активности сахарозосинтазы не наблюдали (Рис. 7Б). При этом у растений карельской березы, выращенных при дефиците азота, активность сахарозосинтазы в стебле была в 3,5 раза выше, чем у таких же растений обычной березы.

### 3.4 Экспрессия генов, кодирующих изоформы сахарозосинтазы

#### 3.4.1 Экспрессия генов сахарозосинтазного ряда в ксилеме 10-летних деревьев разных форм *Betula pendula*

В период активного камбиального роста содержание транскрипта гена *SUS1* в ксилеме деревьев обычной березы повислой более чем в 10 раз выше, по сравнению с уровнем транскрипта генов *SUS2* и *SUS3* (Рис. 8). У растений безузорчатой карельской березы, по сравнению с обычной березой, наблюдали более низкий уровень мРНК гена *SUS1* и более высокий - генов *SUS2* и *SUS3*. У безузорчатых растений, как и у обычной березы, в дифференцирующейся ксилеме содержание транскрипта *SUS1* было выше, чем *SUS2* и *SUS3* (Рис. 8). Появление узорчатой древесины у карельской березы сопровождалось резким снижением количества транскрипта генов *SUS1* и *SUS2* (Рис. 8). Снижение уровня экспрессии генов *SUS1* и *SUS2* у карельской березы наблюдалось только в части ствола с узорчатой древесиной. В безузорчатой части ствола транскриптов генов *SUS1*, *SUS2* и *SUS3* было значительно больше, как относительно узорчатой части того же дерева, так и по сравнению с обычной березой. Уровень мРНК гена *SUS1* был в 17 раз выше, чем в узорчатой части, и в 1,3 раза выше, чем у обычной березы. Уровень мРНК гена *SUS2* – в 90 раз выше, чем в узорчатой части, и в 3 раза выше, чем у обычной березы. Количество мРНК гена *SUS3* – в 2 раза выше, чем в узорчатой части, и в 3 раза выше, чем у обычной березы (Рис. 8).

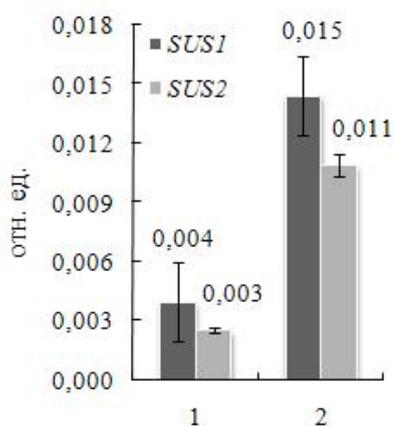


**Рис. 8.** Экспрессия генов *SUS1*, *SUS2*, *SUS3* в ксилеме 10-летних деревьев березы повислой в период активного камбиального роста. 1 – обычная береза повислая; 2-4 – карельская береза (2 – безузорчатые деревья; 3,4 – узорчатые деревья: 3 – безузорчатая часть ствола, 4 – узорчатая часть ствола). Бары – стандартное отклонение.

В ходе проведенной работы было показано, что уровень мРНК генов *SUS1*, *SUS2*, *SUS3* в период камбиального роста определяет активность сахарозосинтазы в зоне формирования ксилемы исследуемых берез. Для определения вклада каждого гена в регуляцию активности сахарозосинтазы был проведен корреляционный анализ. Установлено, что в наибольшей степени активность сахарозосинтазы коррелировала с уровнем экспрессии гена *SUS1* ( $R=0,9$ ), в меньшей степени с экспрессией гена *SUS2* ( $R=0,7$ ), в случае гена *SUS3* – корреляции не наблюдалось.

#### 3.4.2 Экспрессия генов *SUS1* и *SUS2* в стебле березы повислой на ранних этапах онтогенеза

Как и у взрослых растений березы повислой, у 1,5-месячных сенцев более высокий уровень экспрессии был характерен для гена *SUS1* по сравнению с *SUS2*. У 1,5-месячных растений обычной березы повислой, в стебле активность генов *SUS1* и *SUS2* была очень низкой и не превышала 0,004 отн.ед. (Рис. 9).



**Рис. 9.** Экспрессия генов *SUS1* и *SUS2* в стебле 1,5-месячных растений *B. pendula* 1 – var. *pendula*; 2 – var. *carelica* (Б). Бары – стандартное отклонение.

В стебле растений карельской березы относительная экспрессия генов сахарозосинтазного семейства была выше, чем у растений обычной березы повислой. Уровень транскрипции гена *SUS1* составил 0,015 отн. ед., гена *SUS2* 0,011 отн. ед. (Рис. 9). Такое соотношение по уровню экспрессии изучаемых генов согласуется с данными по активности сахарозосинтазы.

## Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ

### 4.1 Активность сахарозосинтазы на разных этапах вегетационного периода.

В ходе исследования активности сахарозосинтазы на 8 и 40-летних деревьях березы повислой было установлено, что активность фермента в тканях ствола сильно изменяется в течение вегетационного периода (Рис. 4А, 5А).

В мае основная масса сахарозы расходуется на рост и развитие листьев, ее отток в ствол не происходит. Это согласуется с практическим отсутствием активности сахарозосинтазы в мае, как в ксилеме, так и во флоэме (Рис. 4А, 5А). В третьей декаде июня и июле фотосинтезирующие листья деревьев березы являлись донорами сахарозы, обеспечивающей рост и развитие ксилемы и флоэмы. В этот период мы обнаружили наибольшие для каждой из указанных тканей значения активности сахарозосинтазы. Октябрьский срок взятия образцов приходился на период подготовки растений к состоянию покоя. Среднесуточная температура воздуха в этот день приблизилась к нулю градусов, поэтому метаболические процессы в тканях были сильно заторможены. Это соответствовало отсутствию или низкой активности сахарозосинтазы в ксилеме и флоэме ствола деревьев березы повислой. Наиболее высокие значения активности сахарозосинтазы в тканях ствола деревьев березы повислой во время камбиального роста свидетельствуют о том, что работа фермента связана с деятельностью камбия и формированием проводящих тканей – ксилемы и флоэмы.

#### **4.2 Различия в активности сахарозосинтазы между ксилемой и флоэмой ствола деревьев березы повислой**

Мы провели сравнительный анализ активности сахарозосинтазы в ксилеме и флоэме ствола деревьев березы повислой в период деятельности камбия. У обычной березы повислой активность фермента в ксилеме превосходила данный показатель во флоэме у 6-летних деревьев в 39 раз, 8-летних (июнь) в 3 раза, 8-летних (июль) в 40 раз, 40-летних (июнь) в 377 раз. У узорчатых растений карельской березы сахарозосинтазная активность в ксилеме превышала активность фермента во флоэме у 6-летних деревьев – в 7 раз (Рис.1 А), 8-летних (июнь) – в 8 раз (Рис.4 А), 8-летних (июль) – в 19 раз (Рис.4 А), 40-летних (июнь) – в 379 раз (Рис. 5 А).

Таким образом, во всех исследованных вариантах активность сахарозосинтазы была значимо выше в ксилеме, по сравнению с флоэмой.

#### **4.3 Различия в активности сахарозосинтазы при нормальном и аномальном ксилогенезе у деревьев березы повислой**

Сопоставление активности сахарозосинтазы в ходе формирования древесины нормального строения и древесины с хорошо выраженными структурными аномалиями выявило существенную разницу между ними.

Среди изученных групп деревьев наиболее насыщенная узорчатая текстура древесины наблюдалась у 10-ти и 40-летних деревьев карельской березы. На данных растениях показано, что в ксилеме обычной березы, безузорчатой карельской березы и безузорчатых участков ствола узорчатых деревьев карельской березы активность сахарозосинтазы была выше в 3-5,5, чем в узорчатой древесине карельской березы (Рис. 2, 5А). Таким образом, у березы повислой формирование древесины нормального строения происходит на фоне высокой активности сахарозосинтазы, а рост и развитие древесины с насыщенной узорчатой текстурой связано с резким снижением активности фермента.

Активность сахарозосинтазы исследовали также у растений на начальной стадии формирования структурных аномалий (6, 8 лет). У 6-ти и 8-летних растений начало камбиального роста (июнь) характеризовалось близкими значениями активности сахарозосинтазы в ксилеме обычной и карельской березы (Рис. 1, 4А). В конце июля (последняя декада активности камбия) активность фермента в ксилеме 8-летних деревьев карельской березы была в 10,4 раза ниже, по сравнению с обычной

березой (Рис. 4А). В работах авторов, занимающихся изучением карельской березы, указывается, что развитие структурных аномалий ксилемы у этого древесного растения имеет пульсирующий характер: обычно в начале вегетационного периода камбий откладывает древесину нормального строения, а во второй половине вегетации возобновляется развитие аномалий (Любавская, 1978; Новицкая, 2008). С этой точки зрения резкое снижение активности сахарозосинтазы в ксилеме карельской березы во второй половине июля находится в соответствии с выводом о взаимосвязи между падением активности фермента и формированием узорчатой древесины. У молодых деревьев (6 и 8 лет) в начале сезона период нормального камбиального роста был более продолжительным по сравнению с 10-ти и 40-летними деревьями.

#### 4.4 Участие сахарозосинтазы в синтезе целлюлозы

Включение сахарозосинтазы в метаболизм клеток в ходе ксилогенеза происходит на стадии отложения вторичной клеточной стенки, данный этап является очень важным, поскольку именно вторичные клеточные стенки имеют наибольшую массовую долю в древесине (Dinwoodie, 1975). Участие сахарозосинтазы в формировании клеточной стенки обеспечивается за счет образования комплексов ее мембраносвязанной формы с целлюлозосинтазой (Koch, 2004). Образующаяся в ходе сахарозосинтазной реакции, УДФ-глюкоза, служит субстратом для синтеза микрофибрилл целлюлозы – основного структурного компонента клеточных стенок (Coleman, 2006; Ruan, 2014). Наши данные также показывают важную роль сахарозосинтазы в синтезе целлюлозы клеточных стенок ксилемы. На 10-летних деревьях обычной березы повислой и карельской березы выявлена корреляция между активностью фермента (Рис. 2) и содержанием этого структурного полисахарида (Рис. 3 Б): чем выше активность сахарозосинтазы, тем выше содержание целлюлозы.

В последнее время появляется все больше работ, в которых участие сахарозосинтазы в синтезе целлюлозы демонстрируется с помощью данных молекулярно-генетического анализа. На взрослых деревьях тополя (Andersson-Gunneras et al., 2006) и сеянцах его гибридных линий (Song et al., 2010, Gerber et al., 2014) выявлена корреляция между уровнем экспрессии генов, кодирующих сахарозосинтазу, и количеством содержащейся в древесине целлюлозы. Наиболее высокая экспрессия в ксилеме тополя установлена для гена *SUS1*. Известно, что гены *SUS1* и *SUS2* кодируют изоформы сахарозосинтазы SuSy1 и SuSy2, которые у древесных растений имеют перекрывающиеся биологические функции, основной из которых является поставка углерода к месту синтеза клеточных стенок ксилемы (Geisler-Lee et al., 2006). Наши исследования древесины ствола деревьев березы повислой в период камбиального роста, наряду с корреляцией между активностью сахарозосинтазы и содержанием целлюлозы, выявили высокий коэффициент корреляции между активностью сахарозосинтазы и уровнем экспрессии гена *SUS1*.

#### 4.5 Активность сахарозосинтазы и структурные особенности ксилемы березы повислой

Структурную основу нормальной древесины березы повислой составляют волокна и сосуды, в зрелом состоянии представленные исключительно клеточными оболочками, основную массу которых образуют микрофибриллы целлюлозы (Барильская, 1978). Сопоставление структурных особенностей нормальной древесины березы повислой и результатов наших исследований позволяет заключить, что формирование древесины березы повислой, в которой преобладают волокна и

сосуды, связано с высокой активностью сахарозосинтазы. По сравнению с нормальной древесиной, в зонах структурных аномалий древесины карельской березы содержание волокон меньше в 3 раза, сосудов меньше в 12 раз, а клеток паренхимы больше в 5 раз (Любавская, 1978). Исследования Л.А. Барильской (1978) показали, что в ксилеме березы повислой толщина клеточных стенок у клеток паренхимы в 1,5 раза меньше, чем у сосудов, и в 2 раза меньше, чем у волокнистых элементов. Наши исследования показали, что увеличение числа паренхимных клеток у карельской березы коррелирует со снижением сахарозосинтазной активности (Рис. 2, 4А, 5А) в ксилеме и уменьшением содержания целлюлозы (Рис. 3 Б). Полученные данные указывают на то, что при проведении сравнительного анализа образцов древесины березы повислой, различающихся по насыщенности текстуры древесины, значения активности сахарозосинтазы могут служить показателем степени аномальности строения древесины.

#### **4.6 Деятельность камбия в сторону ксилемы и флоэмы**

У древесных растений активность камбия, как правило, в большей степени направлена в сторону формирования ксилемы, что объясняет большую ее массовую и объемную долю по сравнению с флоэмой (Plomion et al., 2001). Мы провели сравнительный анализ деятельности камбия в сторону ксилемы и флоэмы у 6-ти и 40-летних деревьев березы повислой. В качестве показателя интенсивности ростовых процессов использовали значение отношения фруктоза/глюкоза. Данный подход основан на том, что глюкоза быстро включается в метаболические реакции, в то время как фруктоза медленнее вовлекается в метаболизм, поэтому в активно растущих тканях при расщеплении сахарозы наблюдается увеличение концентрации фруктозы (Новицкая, Галибина, 2011). Полученные значения отношения фру/глю свидетельствуют о преобладании ростовых процессов со стороны ксилемы (1,3), по сравнению с флоэмой (0,9) у деревьев березы повислой (40 лет). У 40-летних деревьев карельской березы с ярко выраженной узорчатой древесиной ростовые процессы более активно шли со стороны флоэмы (1,4), чем со стороны ксилемы (1,0). В целом представленные данные указывают на важное отличие деятельности камбия у деревьев обычной березы повислой и карельской березы: у обычной березы активность камбия была направлена, главным образом, на формирование ксилемы, тогда как у узорчатых деревьев карельской березы имела место переориентация камбиального роста в сторону флоэмы. Данный вывод согласуется с известным фактом, что деревья карельской березы с насыщенной текстурой древесины имеют меньший диаметр ствола, по сравнению с одновозрастными деревьями обычной березы повислой, и толщина коры у них в 4-6 и более раз больше, чем у обычной березы повислой (Новицкая, 2008).

#### **4.7 Роль сахарозосинтазы в создании акцепторной силы ксилемы**

Активность сахарозосинтазы должна играть важную роль в создании акцепторной силы ксилемы. В качестве показателя этой силы можно рассматривать градиент концентрации сахарозы между ксилемой и флоэмой. Мы провели анализ содержания сахарозы в проводящих тканях ствола 6-летних и 40-летних деревьев березы повислой в период активности камбия.

На 40-летних деревьях было показано, что высокие значения градиента концентрации сахарозы между флоэмой и ксилемой (74,5) у обычной березы повислой наблюдаются на фоне высокой активности сахарозосинтазы (Рис. 5А), а падение данного показателя у узорчатых деревьев карельской березы (23,1) – на фоне

низкой активности фермента (Рис. 5А). Таким образом, в период формирования ксилемы активность сахарозосинтазы в ткани является одним из основных факторов, создающих ее акцепторную силу, падение активности сахарозосинтазы при формировании узорчатой древесины карельской березы ведет к сильному ослаблению потока сахарозы из флоэмы в ксилему, т.е. оказывает негативное влияние на разгрузку флоэмы. У 6-летних растений обычной березы повислой наблюдалась картина, аналогичная 40-летним деревьям: высокая активность сахарозосинтазы в ксилеме соответствовала высокому градиенту концентрации сахарозы между ксилемой и флоэмой. У 6-летней карельской березы активность сахарозосинтазы в ксилеме значимо не отличалась от растений березы повислой (Рис. 1А). В то же время градиент концентрации сахарозы между проводящими тканями составил всего 2, 9 мг/сырой ткани. В этой ситуации обращает на себя внимание 5-кратный рост активности фермента во флоэме карельской березы. Можно предположить, что у молодых деревьев карельской березы мы застали перестройку метаболизма ксилемы и флоэмы, связанную с самым началом сезонного возобновления развития структурных аномалий тканей ствола.

#### **4.8 Активность сахарозосинтазы и содержание крахмала**

Накопление крахмала является одним из наиболее лабильных способов утилизации излишка сахарозы в тканях растения (Курсанов, 1976).

В наших исследованиях, высокая активность сахарозосинтазы в ксилеме деревьев обычной березы повислой в период камбиального роста способствует активному расщеплению сахарозы в ксилеме, при этом продукты реакции расходуются на образование клеточных стенок сосудов и волокнистых трахеид, о чем свидетельствует высокое содержание целлюлозы в ксилеме обычной березы повислой, в связи с чем, запасание крахмала в ксилеме деревьев березы повислой в период камбиального роста происходит слабо.

Показано, что содержание крахмала во флоэме обычной березы повислой и карельской березы выше по сравнению с ксилемой (Рис. 4В, Г, 5В, Г). У обычной березы накопление крахмала во флоэме идет более интенсивно по сравнению с карельской березой (Рис. 4Г, 5Г). На примере сахарной свеклы показано, что после повышения содержания сахарозы выше некоего уровня, в клетках вместо крахмала начинается синтез более энергоемких соединений – липидов (Курсанов, 1976). Высокая активность инвертазы во флоэме карельской березы (Галибина и др, 2015) свидетельствует о появлении в ткани большого количества сахарозы. В этой связи можно ожидать, что синтез крахмала здесь будет замещаться синтезом липидов. И действительно, имеющиеся данные свидетельствуют о том, что во флоэме карельской березы, в отличие от флоэмы обычной березы повислой, накапливается большое количество липидных соединений (Новицкая, 2008). Таким образом, результаты наших исследований, показавшие меньшее количество крахмала во флоэме карельской березы, очевидно, отражают переключение обменных процессов на синтез липидных соединений.

Отдельного внимания заслуживают данные, полученные в период торможения камбиального роста погодными условиями. Данное явление наблюдалось в июле у 40-летних деревьев. Исследования Г.Ф. Антоновой (1999) показывают, что в наиболее теплом месяце вегетационного сезона (в наших условиях – июль) имеется некий максимум среднесуточных температур, выше которого интенсивность деления клеток камбия падает. Ведущий ограничивающий фактор в этот период – количество атмосферных осадков, являющихся основным источником влаги в почве. Период

длительного отсутствия осадков на фоне высоких температур, предшествовавший взятию нами образцов в июле, способствовал развитию водного дефицита тканей ствола, результатом чего стало подавление активности камбия. В этот период у 40-летних деревьев обычной березы повислой наблюдалось с резкое падение активности сахарозосинтазы в ксилеме (Рис. 5А), что сопровождалось накоплением крахмала. Особенно большое его количество было показано во флоэме (Рис. 5Г). Во флоэме 40-летних деревьев обычной березы повислой, в отличие от ксилемы, увеличение содержания крахмала в июле сопровождалось увеличением активности сахарозосинтазы (Рис. 5Б). У 40-летних узорчатых деревьев карельской березы активность сахарозосинтазы в ксилеме в июле упала в 2,4 раза, при этом ее значения во флоэме значимо возросли, это также сопровождалось накоплением крахмала во флоэме (Рис. 5). Однако содержание крахмала здесь было существенно ниже, чем во флоэме обычной березы. В литературе имеются многочисленные данные о том, что помимо формирования вторичной клеточной стенки сахарозосинтаза участвует в биосинтезе крахмала (Kladnik, 2005; Patrick et al., 2013).

Представляет интерес сопоставление активности сахарозосинтазы и содержания целлюлозы и крахмала в образцах ксилемы 10-летних деревьев обычной березы и карельской березы. Наибольшая активность фермента (Рис. 2) и наибольшие уровни крахмала и целлюлозы (Рис. 3) были характерны для ксилемы безузорчатых участков ствола узорчатых деревьев. Накопление крахмала в этих условиях указывает на следующее: несмотря на то, что сахарозосинтаза очень активно вовлекает сахарозу в синтез целлюлозы, в ткани остается избыток дисахарида, который утилизируется через синтез крахмала. Это дает основание заключить, что поддержание нормальной структуры древесины в безузорчатой части ствола карельской березы осуществляется на границе верхнего предела активности сахарозосинтазы.

#### **4.9 Изоформы сахарозосинтазы при нормальном и аномальном ксилогенезе березы повислой**

В ксилеме обычной березы повислой и карельской березы мы исследовали уровень экспрессии генов *SUS1*, *SUS2* и *SUS3*, кодирующих изоформы сахарозосинтазы - SuSy1, SuSy2, SuSy3. Во всех исследованных образцах ксилемы были обнаружены транскрипты всех трех генов (Рис. 8). В то же время уровень экспрессии генов существенно различался. Главной отличительной чертой является высокий уровень экспрессии гена *SUS1* в древесине нормального строения (ксилема обычной березы, безузорчатой карельской березы, безузорчатых участков ствола узорчатой карельской березы) (Рис. 8, столбцы 1, 2, 3) и его резкое падение в узорчатой древесине карельской березы (Рис. 8, столбец 4). Учитывая корреляцию между экспрессией гена *SUS1*, синтезом целлюлозы и дифференцировкой волокон и сосудов ксилемы, снижение уровня транскриптов этого гена в узорчатой древесине, для которой характерно уменьшение доли волокон и сосудов и увеличение содержания клеток паренхимы, вполне объяснимо.

Необходимо отметить сравнительно высокий уровень экспрессии генов *SUS2* и *SUS3* в нормальной древесине карельской березы (Рис. 8, столбцы 2, 3). Ген *SUS2* может участвовать в синтезе целлюлозы при низком уровне транскрипции *SUS1* или пониженной активности SuSy1, в частности, при избыточном накоплении в тканях фруктозы, высокие концентрации которой сильно ингибируют или инактивируют SuSy1 (Matic et al., 2004). В образцах древесины безузорчатых участков ствола узорчатой карельской березы рост экспрессии *SUS2* мы наблюдали на фоне максимального уровня транскриптов гена *SUS1* (Рис. 8, столбец 3). Следует отметить,

что эти данные находятся в соответствии с нашим предположением о том, что в ксилеме безузорчатой части ствола узорчатой карельской березы сахарозосинтаза работает на верхнем пределе своего ресурса по поддержанию нормального строения древесины. Ген *SUS3* имеет широкий диапазон транскрипции в органах и тканях древесных растений и рассматривается как ген общего метаболизма (Geisler-Lee et al., 2006). Повышенная экспрессия гена *SUS3* в нормальной древесине карельской березы может быть связана с увеличением в ее составе количества паренхимных клеток лучей.

В узорчатой древесине карельской березы мы наблюдали очень низкие уровни экспрессии всех исследованных генов сахарозосинтазного семейства. Это хорошо согласуется с данными о резком снижении активности сахарозосинтазы при переходе к формированию ее характерных структурных аномалий.

#### **4.10 Активность сахарозосинтазы на ранних этапах онтогенеза березы повислой**

В ходе исследования было показано, что активность сахарозосинтазы в ксилеме безузорчатых растений карельской березы отличается от активности фермента в ксилеме обычной березы повислой. Мы выдвинули предположение, что нарушение функционирования ферментных систем углеводного обмена у карельской березы начинаются еще в ходе раннего онтогенеза, до начала формирования аномальной древесины. В связи с этим была изучена активность сахарозосинтазы в акцепторных органах сеянцев обычной березы повислой и карельской березы еще не имеющих видимых отклонений в структуре древесины.

На 1,5-месячных растениях березы повислой показано, что основным потребляющим органом в данном возрасте является корень, о чем свидетельствует преобладание активности сахарозосинтазы в корне по сравнению со стеблем как у растений обычной березы повислой, так и у карельской березы (Рис. 6). В молодых растущих тканях интенсивно протекает биосинтез целлюлозы и основного предшественника гемицеллюлоз и пектинов – УДФ-глюкуроновой кислоты. Субстратом этих процессов является УДФ-глюкоза, наработка, которой обеспечивается за счет деятельности сахарозосинтазы (Никитин, Измайлов, 2016).

У 1,5-месячных сеянцев карельской березы, по сравнению с растениями обычной березы, активность сахарозосинтазы выше, как в корне, так и в стебле (Рис. 6), что может свидетельствовать о более интенсивном протекании у нее на ранних этапах развития процессов структурообразования. Различия в активности сахарозосинтазы сеянцев обычной березы повислой и карельской березы также как и у взрослых растений обусловлены разным уровнем экспрессии генов *SUS1*, *SUS2*.

У 5-месячных растений, по сравнению с 1,5-месячными, основным акцептором ассимилятов становится стебель. Атрагирующая способность ксилемы стебля возрастает по мере роста и развития древесных растений, при этом клеточные стенки ксилемы становятся основными аккумуляторами биомассы (Антонова, 2011). У 5-месячных сеянцев в акцепторных органах было показано преобладание активности сахарозосинтазы у растений обычной березы повислой по сравнению с карельской березой (Рис. 6), то есть они имели различия в распределении активности сахарозосинтазы, характерные для взрослых деревьев. Таким образом, уже на ранних этапах развития между двумя формами березы повислой закладываются различия в путях метаболизации дисахарида.

#### **4.11 Особенности активности сахарозосинтазы на фоне дефицита азота**

Наряду с эндогенными механизмами, определяющими преимущественное использование ассимилятов в растении, баланс между развитием различных акцепторных органов определяется внешними факторами среды, плодородием почвы. Выращивание растений двух форм березы повислой на субстрате с низким содержанием доступного азота привело к сокращению темпов роста надземной биомассы, при этом они имели тонкие, но длинные корни. У сеянцев обычной березы, выращенных при дефиците минеральных элементов, наблюдалось резкое снижение ферментативной активности сахарозосинтазы. Особенно сильно снизилась активность сахарозосинтазы в стебле (Рис. 7Б). Большее падение сахарозосинтазной активности в стебле, по сравнению с корнем, привело и к большей потере надземной биомассы (Рис. 7А). На горохе посевном показано, что даже низкие (1 мМ) концентрации нитратов могут увеличивать активность сахарозосинтазы и приводить к накоплению вегетативной биомассы растений (Никитин, Измайлов, 2016). Таким образом, при недостатке азотного питания у сеянцев березы повислой происходит подавление ксилогенеза и все ресурсы тратятся на поддержание биомассы корней.

У растений карельской березы при недостаточном азотном питании активность сахарозосинтазы в стебле снижается всего в 2 раза (Рис. 7Б). Более высокая активность сахарозосинтазы в стебле карельской березы по сравнению с обычной березой повислой на фоне снижения морфометрических показателей говорит о том, что у растений карельской березы в условиях недостатка азота снижение метаболизма сахарозы в акцепторных тканях обусловлено подавлением активности других сахарозорасщепляющих ферментов.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное исследование показало, что наибольшая активность сахарозосинтазы в тканях ствола березы повислой наблюдается в период камбиального роста и связана с формированием проводящих тканей – ксилемы и флоэмы. В период деятельности камбия активность сахарозосинтазы в ксилеме березы повислой значительно превышала данный показатель во флоэме. Известно, что в ходе ксилогенеза сахарозосинтаза играет существенную роль в отложении вторичной клеточной стенки, поставляя субстрат для синтеза ее структурных элементов. Формирование нормальной по строению древесины обычной березы повислой, в составе которой преобладают проводящие элементы ксилемы – сосуды и волокна происходит на фоне высокой активности сахарозосинтазы под контролем гена *SUS1* и сопровождается активным синтезом структурных элементов клеточных стенок. Дифференциация производных камбия в паренхимные клетки, являющиеся основными анатомическими элементами структурных аномалий узорчатой древесины карельской березы, происходит на фоне низкой активности сахарозосинтазы в связи со снижением экспрессии генов *SUS1* и *SUS2* и сопровождается уменьшением содержания целлюлозы на единицу массы ксилемы. В этом случае высокая акцепторная сила ксилемы поддерживается за счет синтеза запасных метаболитов, в частности крахмала. Снижение по сравнению с обычной березой повислой значений активности сахарозосинтазы, экспрессии гена *SUS1* и содержания целлюлозы у безузорчатых растений карельской березы говорит о том, что уменьшение утилизации углерода через синтез компонентов клеточных стенок ксилемы у карельской березы происходит еще до начала формирования аномальной по строению древесины. В нашей работе впервые показаны различия в активности сахарозосинтазы у растений обычной березы повислой и карельской березы на ранних этапах онтогенеза.

Таким образом, в ходе проведенной работы установлена важная роль сахарозосинтазы в ксилогенезе древесных растений и выявлена обратная корреляция активности изучаемого фермента и уровня транскрипции некоторых генов сахарозосинтазного ряда (*SUS1*, *SUS2*) с проявлением признаков аномального ксилогенеза карельской березы. Полученные в ходе проведения работы данные могут быть использованы в поиске путей управления ксилогенезом древесных растений и получения высокодекоративной древесины карельской березы.

### ВЫВОДЫ

1. Активность сахарозосинтазы в тканях ствола *Betula pendula* Roth изменяется в течение вегетационного периода и имеет возрастную динамику. Наиболее высокие значения активности сахарозосинтазы наблюдаются в ксилеме в период активного камбиального роста.
2. Активность сахарозосинтазы при формировании нормальной (типичной для вида) древесины *B. pendula* в 3-5 раз выше, чем при формировании аномальной узорчатой древесины. Падение активности фермента в зонах формирования узорчатой древесины обусловлено снижением экспрессии генов сахарозосинтазного семейства.
3. Основной функцией сахарозосинтазы в ходе ксилогенеза *B. pendula* является ее участие в синтезе целлюлозы. Об этом свидетельствует корреляция между активностью фермента, уровнями экспрессии генов *SUS1*, *SUS2* и содержанием целлюлозы при разных сценариях ксилогенеза.
4. Основную роль в поддержании высокой активности сахарозосинтазы у *B. pendula* var. *pendula* играет высокая экспрессия гена *SUS1*. У *B. pendula* var. *carelica* заметное участие в этом принимают также гены *SUS2* и *SUS3*.
5. Различия в активности сахарозосинтазы у *B. pendula* var. *pendula* и *B. pendula* var. *carelica* начинают проявляться на ранних стадиях онтогенеза.
6. Низкий уровень доступного азота приводит к снижению активности сахарозосинтазы в акцепторных органах сенцев *B. pendula*.

### СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

#### Статьи в изданиях, рекомендованных ВАК РФ

1. Галибина Н.А., Целищева Ю.Л., Андреев В.П., Софронова И.Н., Никерова К.М. Активность пероксидазы в органах и тканях деревьев березы повислой // Ученые записки ПетрГУ. № 4 (133). 2013. С. 7-13.
2. Галибина Н.А., Новицкая Л.Л., Красавина М.С., Мощенская (Целищева) Ю.Л. Активность сахарозосинтазы в тканях ствола карельской березы в период камбиального роста // Физиология растений. Т. 62, № 3. 2015. С. 410 — 419.
3. Галибина Н.А., Новицкая Л.Л., Красавина М.С., Мощенская (Целищева) Ю.Л. Активность инвертазы в тканях ствола карельской березы // Физиология растений. Т. 62, № 6. 2015 С. 804— 813.
4. Мощенская (Целищева) Ю.Л., Галибина Н.А., Никерова К.М., Новицкая Л.Л. Активность ферментов диссимиляции сахарозы в раннем онтогенезе разных форм березы повислой // Труды Карельского научного центра РАН. № 11. 2016. С. 78–87.

#### Материалы научных конференций

5. Целищева Ю.Л., Галибина Н.А. Динамика активности пероксидазы в органах и тканях деревьев березы повислой// Тезисы II(X) Международ. ботанической конф. молодых ученых в Санкт-Петербурге (Санкт-Петербург, 11-16 ноября 2012 г.). СПб, 2012. С. 72-73.

6. Мощенская (Целищева) Ю.Л., Галибина Н.А. Активность сахарозосинтазы в тканях ствола деревьев карельской березы, произрастающих на разных по плодородию почвах // Биология - наука XXI века: 18-я Междунар. Пушчинская школа-конф. молодых ученых (Пушино, 21-25 апреля 2014 г.). Сб. тезисов. Пушино, 2014. С. 392-393.
7. Мощенская (Целищева) Ю.Л., Галибина Н.А., Подгорная М.Н. Активность сахарозосинтазы в тканях ствола деревьев карельской березы, произрастающих на разных по плодородию почвах // Междун. науч. конф. и школа молодых ученых «Физиология растений – теоретическая основа инновационных агро- и фитобиотехнологий» (Россия, Калининград, 2014): материалы: в 2-х ч. Ч. II. Калининград: Аксиос, 2014. С. 318-320.
8. Мощенская (Целищева) Ю.Л., Галибина Н.А., Топчиева Л.В. Активности сахарозосинтазы карельской березы на разных этапах онтогенеза // Растения в условиях глобальных и локальных природно-климатических и антропогенных воздействий: Тез. докл. Всерос. науч. конф. с международным участием и школы для мол. ученых (Петрозаводск, 21-26 сент. 2015 г.). Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 2015. С. 365.
9. Мощенская (Целищева) Ю.Л., Галибина Н.А. Активность ферментов диссимиляции сахарозы в раннем онтогенезе разных форм березы повислой // Годичное собрание общества физиологов растений России. Сигнальные системы растений: от рецептора до ответной реакции организма. 21–24 июня 2016, С.-Петербург, Россия / Медведев С.С. С.-Петербург: Изд-во Санкт-Петербургского государственного университета. 2016. С. 64-65.
10. Галибина Н.А., Новицкая Л.Л., Мощенская (Целищева) Ю.Л., Никерова К.М. Аномальный морфогенез камбиальной зоны карельской березы (*Betula pendula* Roth var. *carelica*) // Годичное собрание общества физиологов растений России. Сигнальные системы растений: от рецептора до ответной реакции организма. 21–24 июня 2016, С.-Петербург, Россия / Медведев С.С. С.-Петербург: Изд-во Санкт-Петербургского государственного университета. 2016. С. 37-38.
11. Мощенская (Целищева) Ю.Л., Галибина Н.А., Новицкая Л.Л., Никерова К.М. Дифференциальная экспрессия генов сахарозосинтазного и инвертазного семейства у семян *Betula pendula* Roth // IV Российский симпозиум с международным участием «Фитоиммунитет и клеточная сигнализация у растений». Казань, 2016. С. 101-102.
12. Галибина Н.А., Новицкая Л.Л., Мощенская (Целищева) Ю.Л., Никерова К.М. Влияние эндогенной сахарозы на соотношение активностей апопластной инвертазы и сахарозосинтазы при нарушении камбиального роста древесных растений // IV Российский симпозиум с международным участием «Фитоиммунитет и клеточная сигнализация у растений». Казань, 2016. С. 32-33.