

## ЛИТЕРАТУРА

1. Аминокислоты в медицине. Киев, 1982. 200 с.
2. Аринушкина С.В. Руководство по химическому анализу почв. М., 1970. 487 с.
3. Волкова Т.Г. Биотехнология. Новосибирск, 1999. 252 с.
4. Дахно И.С. Влияние иммуностимуляторов L-аргинина и РНК на иммунный статус коров при фасциозе // Вісник Полтавського державного сільськогосподарського інституту. 2000. № 5. С. 32–34.
5. Кибаленко А.П. Значение бора в метаболизме растительной клетки // Микроэлементы в обмене веществ растений. Киев, 1976. С. 93–125.
6. Кретович В.Л. Обмен азота в растениях. М., 1972. 528 с.
7. Левин Э.Д., Репях С.М. Переработка древесной зелени. М., 1984. 120 с.
8. Плешков Б.П. Практикум по биохимии растений. М., 1976. 256 с.
9. Рыбак К.В., Сливинская Е.А., Саврасова Е.А., Ахвердян В.З., Клячко Е.В., Машко С.В., Дорошенко В.Г., Айрих Л.Г., Леонова Т.В. Способ получения L-аминокислот с использованием бактерий, принадлежащих к роду *Escherichia* // Патент на изобретение № 2304615, РФ. 2005.
10. Чернобровкина Н.П. Экофизиологическая характеристика использования азота сосной обыкновенной. СПб., 2001. 175 с.
11. Чикина П.Ф. Азотный обмен // Физиолого-биохимические основы роста и адаптации сосны на Севере. Л., 1985. С. 57–82.
12. Ягодин В.И. Основы химии и технологии переработки древесной зелени. Л., 1981. 224 с.
13. Engvild K.C. The «Red» Decline of Norway Spruce or «Røde Rødgraner» – Is it Ammonium Overload or Top-Dying? // Risø National Laboratory. April, 2005. 16 p.
14. Gezelius K, Nasholm T. Free amino acids and protein in Scots pine seedlings cultivated at different nutrient availabilities // Tree Physiology. 1993. Vol. 13. № 1. P. 71–86.
15. Huhn B.G., Schulz H. Contents of free amino acids in Scots pine needles from field sites with different levels of nitrogen deposition // New Phytol. 1996. Vol. 134. P. 95–101.
16. Nasholm T., Ericsson A. Seasonal changes in amino acids, protein and total nitrogen in needles of fertilized Scots pine trees // Tree Physiology. 1990. Vol. 6. P. 267–281.
17. Warren C. R., Adams M.A. Phosphorus affects growth and partitioning of nitrogen to Rubisco in *Pinus pinaster* // Tree Physiology. 2002. Vol. 22. P. 11–19.

## EFFECT OF INTRASPECIFIC COMPETITION ON THE ACTIVITY OF ENZYMES INVOLVED IN THE METABOLISM OF GLUTAMIC ACID IN KAMBIAL ZONE OF PINUS SYLVESTRIS L.

*Deych K.O., Sudachkova N.E., Milyutina I.L.*

V.N. Sukachev Institut of forest SB RAS, 660036, Krasnoyarsk, Akademgorodok 50 – Institut of forest,  
8 (391) 2-49-46-14, E-mail: biochem@ksc.krasn.ru

Abstract. the 6–7 aged biogroups of pine trees (*Pinus sylvestris* L.) with density 1, 10 and 40 tree·m<sup>-2</sup> were investigated. It is shown that an increase of density of planting causes a decrease in the linear and radial sizes of trees and change dynamic and level of enzymes activity of  $\gamma$ -aminobutyric and glutamic acids metabolism. The revealed specific change of dynamic  $\gamma$ -aminobutyric acid can be used as biochemical indicator of phytocenotic stress.

## ВЛИЯНИЕ ВНУТРИВИДОВОЙ КОНКУРЕНЦИИ НА АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ, УЧАСТВУЮЩИХ В МЕТАБОЛИЗМЕ ГЛУТАМИНОВОЙ КИСЛОТЫ, В ПРИКАМБИАЛЬНОЙ ЗОНЕ СОСНЫ ОБЫКНОВЕННОЙ

*Дейч К.О., Судацкова Н.Е., Милютина И.Л.*

Институт леса им. В.Н.Сукачева СО РАН, 660036, г. Красноярск, Академгородок 50, строение 28 – Институт леса,  
(391) 2-49-46-14, E-mail: biochem@ksc.krasn.ru

Растительные сообщества, сформированные на территориях с нарушенным ландшафтом (гари, брошенные сельскохозяйственные угодья, урбанизированные и промышленные территории), приобре-

тают особое значение в связи с увеличением таких площадей. Особенно актуально это в лесостепной зоне Сибири. Поэтому весьма важным становится вопрос о восстановлении лесной растительности таких территорий лесообразующими древесными видами-эдификаторами, способными в дальнейшем дать полноценное лесное сообщество с ценными для лесовозобновления и лесозаготовки породами деревьев.

Рост древесных ценозов происходит на фоне разнообразных взаимодействий между растениями, основными из которых являются конкурентные отношения, в том числе внутривидовые. Степень и характер взаимодействий растений в сообществе зависит от густоты ценоза. [5]. Густота является определяющим фитоценотическим фактором в жизни лесных экосистем и имеет важное хозяйственное значение, она определяет структурный состав молодняков и продуктивность. Взаимное угнетение растений в высокополнотных насаждениях увеличивается в чистых, одновозрастных насаждениях, вследствие чего, всегда встречаются господствующие, угнетенные и переходные между ними растения. Состояние деревьев при такой усиленной внутривидовой конкуренции можно рассматривать как фитоценотический стресс.

В основе механизма ответных реакций растений на давление абиогенной и биогенной составляющих внешней среды лежат физиолого-биохимические процессы, детерминированные биологически (эволюционно и генетически) [1].

Важное место в ответных метаболических реакциях растений занимают превращения свободных аминокислот, среди которых ключевая роль принадлежит глутаминовой кислоте и её производным. Заманчивой представляется идея судить о состоянии растения по изменению активностей ферментов, контролирующих эти превращения.

В последнее время актуальным становится вопрос о биохимической индикации стрессового состояния на ранних стадиях роста и развития ценоза и появления в нем неконкурентоспособных особей. Такими индикаторами могут являться стрессовые метаболиты. К числу стрессовых метаболитов, являющихся производными глутаминовой кислоты, наряду с такими аминокислотами как пролин и аргинин [6], часто относят  $\gamma$ -аминомасляную кислоту (ГАМК) [7], которая является непротеиногенной аминокислотой и, очевидно, представляет собой менее доступный резерв аминного азота, так как она не используется непосредственно для синтеза белка. Глутаминовая кислота и ГАМК преобладают в составе свободных аминокислот сосны обыкновенной в некоторых тканях, например в камбии, где содержание этих двух кислот достигает 50–70 % от суммы свободных аминокислот [2, 3].

Увеличение содержания ГАМК наблюдается во многих растениях под влиянием разного рода стрессов: анаэробнозиса, затопления, недостатка воды или минеральных веществ, низкой температуры, радиации, физических воздействий, низких значений pH, раневого стресса [4, 5]. Показано, что ГАМК является модулятором ионного транспорта в растениях и участвует в передаче стрессовых сигналов [7].

Образование и взаимопревращения глутаминовой кислоты и ГАМК контролируется рядом ферментов, одни из которых участвуют в синтезе глутаминовой кислоты: глутаматсинтаза (глутамин + оксоглутаровая кислота  $\rightarrow$  глутаминовая кислота) (ЕС 1.4.1.14.) (ГС), глутаматдегидрогеназа ( $\alpha$ -кетоглутаровая кислота  $\rightarrow$  глутаминовая кислота) (ЕС 1.4.1.2.) (ГДГ), глутаминаза (глутамин  $\rightarrow$  глутаминовая кислота) (ЕС 3.5.1.2.) (ГА), другие обеспечивают ее дальнейшие метаболические превращения: глутаматдекарбоксилаза (катализирует реакцию глутаминовая кислота  $\rightarrow$   $\gamma$ -аминомасляная кислота) (4.1.1.15) (ГДК), глутаминсинтетаза (глутаминовая кислота  $\rightarrow$  глутамин) (ЕС 6.3.1.2.) (ГСТ), изоцитратдегидрогеназа (оксоглутарат  $\rightarrow$  изоцитрат) (ЕС 1.1.1.42) (ИДГ) [7, 8]. Благодаря совместному действию этих ферментов катализируется включение аминокрупп в состав аминокислот (схема).

Цель данного исследования – сравнительное изучение активности ферментов, контролирующих метаболизм глутаминовой кислоты и ГАМК в камбиальной зоне сосны обыкновенной в условиях внутривидовой конкуренции разной степени напряженности.

Объектом исследования служил 6–7-летний естественный самосев сосны (*Pinus sylvestris* L.), растущий на площади, вышедшей из сельскохозяйственного пользования, на серой лесной почве в 45 км севернее Красноярска. Опытные экземпляры отбирали по положению в биогруппах: свободно растущие (1 экз·м<sup>-2</sup>), средне загущенные (10 экз·м<sup>-2</sup>), сильно загущенные (40 экз·м<sup>-2</sup>).

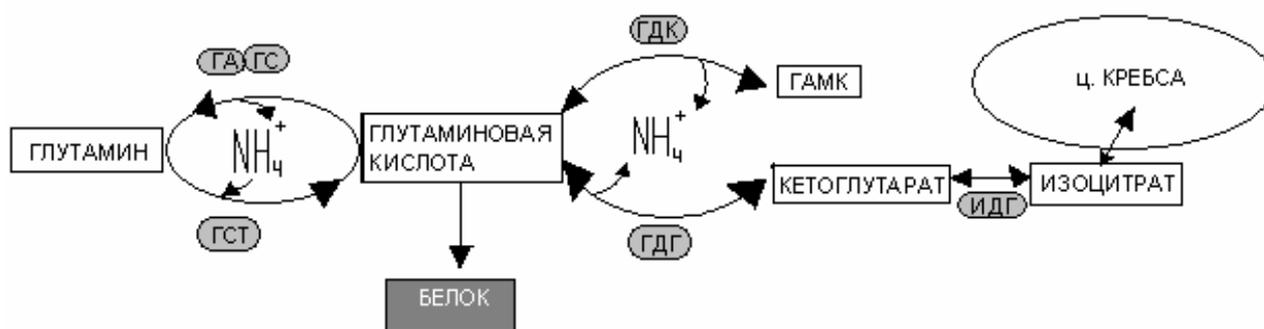


Схема. Метаболизм глутаминовой кислоты в тканях растений.

Для анализа в течение сезона вегетации 4 раза (июнь, июль, август, сентябрь) из разных биогрупп отбирали деревья, со стволиков которых удаляли кору с флоэмой, собирали слой камбия и недревесневшей ксилемы и немедленно замораживали при  $-80^{\circ}\text{C}$ . Для определения активности ферментов навеску образца (2 г) растирали с трис-буфером pH 7,5 (для ГСТ, ГС, ГДГ, ИДГ) и pH 8 (для ГА), и цитрат-фосфатным буфером pH 6,5 (для ГДК). Далее образец экстрагировали 30 мин. при температуре  $8^{\circ}\text{C}$ , затем центрифугировали 30 мин. при 8000 г и очищали ферментный экстракт на колонке с Сефадекс-50. Далее в полученных элюатах определяли активность ферментов спектрофотометрически по образованию продуктов реакции.

При определении активности глутаматдекарбоксилазы нами был модифицирован метод О. Хьюда с соавторами [9], в основу которого заложена реакция образования ГАМК из глутаминовой кислоты при помощи фермента ГДК.

Повторность измерений трехкратная. Достоверность различий полученных результатов оценивали по критерию Стьюдента.

Как показал анализ морфометрических характеристик деревьев, с ухудшением условий роста происходило снижение радиального и линейного годовых приростов (табл.), причем различия в диаметре ствола в выделенных группах разной густоты достигали пятикратной величины. При этом показатели плотности и влажности древесины увеличивались в 1,4 и 1,2 раза, соответственно.

Результаты морфометрических измерений, позволившие четко разделить деревья по биогруппам, указывают на замедление радиального роста при усилении конкуренции. Наибольшее влияние стресс оказал на диаметр корневой шейки из-за уменьшения ширины годовичного кольца под давлением конкуренции.

Таблица. Морфометрические параметры модельных деревьев

Параметр	Густота, экз·м <sup>-2</sup>		
	1	10	40
Высота, см	257 ± 11	230 ± 5	95 ± 3
Диаметр корневой шейки, см	6,1 ± 0,1	4,1 ± 0,3	1,2 ± 0,1
Ширина годовичного кольца, мм	3,3 ± 0,2	1,9 ± 0,1	0,9 ± 0,1
Длина верхушечного побега, см	68,5 ± 5,0	54,5 ± 1,7	34,0 ± 1,6
Длина хвои, см	8,4 ± 0,1	6,4 ± 0,1	5,5 ± 0,1
Влажность древесины, %	38,7 ± 0,2	38,9 ± 0,2	46,9 ± 0,1
Плотность древесины, г·см <sup>-3</sup>	0,32 ± 0,02	0,38 ± 0,03	0,44 ± 0,09

Изучение активности ферментов при разной степени загущения насаждений показало, что пик активности глутаматдегидрогеназы за сезон приходится на середину июля у всех групп деревьев, причем у сильно загущенных деревьев активность в 2 раза ниже, чем у двух остальных групп. У среднее загущенных деревьев активность ГДГ выше, чем у свободно растущих в 2 раза в июне и в 1,3 раза в июле, а к августу эта разница исчезает (рис. 1А). К середине сентября значения активности у выделенных групп деревьев различаются незначительно между собой, при этом происходит снижение активности в 1,2, 3,3 и 3 раза от начальной активности с усилением конкуренции между деревьями.

Для глутаматсинтазы пик активности приходится также на середину июля во всех исследованных биогруппах, при этом деревья со средней степенью угнетенности отличаются повышенной в 1,5 раза, а у самых загущенных пониженной в 1,5 раза активностью фермента в сравнении со свободно растущими деревьями (рис. 1Б). К концу сезона вегетации активность фермента значительно снижается – от стартового значения в начале сезона у свободно растущих и средне загущенных биогрупп деревьев (в 3,3 раза) и практически до нуля у самых загущенных деревьев.

Показатели активности глутаминазы по сезону различаются значительно и в крайних точках достигают 8-10-кратных перепадов значений с характерным пиком в середине вегетационного периода и резким снижением активности фермента к концу вегетации (рис. 1В).

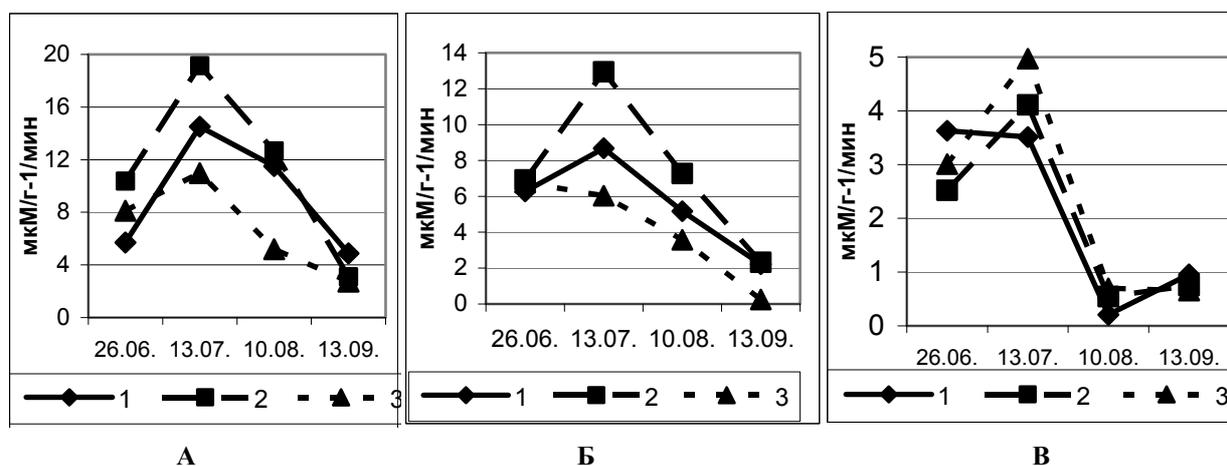


Рисунок 1. Активность глутаматдегидрогеназы (А), глутаматсинтазы (Б) и глутаминазы (В) в камбиальной зоне ствола в течение сезона.

(1 – свободно растущие, 2 – средне загущенные, 3 – сильно загущенные).

Таким образом, пик активности глутаматдегидрогеназы, глутаматсинтазы и глутаминазы, ответственных за синтез глутаминовой кислоты, приходится на период активной вегетации в июле у всех деревьев. Причем, если в камбиальной зоне деревьев с минимальной и средней густотой в биогруппах активности ГДГ и ГС существенно выше чем в условиях максимальной густоты, то для последних более существенным становится путь образования глутаминовой кислоты с участием глутаминазы.

Активность глутаминсинтетазы в конце июня у самых угнетенных деревьев превышена в 6 раз и на протяжении всего сезона остается выше, чем у остальных биогрупп деревьев (рис. 2А). При этом значения активности фермента у менее загущенных биогрупп различаются незначительно по сезону, и у всех деревьев происходит снижение активности ГСТ к концу сезона вегетации. Повышенная активность глутаминсинтетазы у наиболее угнетенных особей, катализирующая образование глутамина, свидетельствует об усиленном депонировании аминного азота в течение всего сезона. Источником свободных аминокрупп, освобождающихся в процессе лигнификации, является фенилаланин, к ним добавляются и неиспользованные для синтеза белка аминокруппы.

Активность глутаматдекарбоксилазы у свободно растущих и слабо загущенных деревьев различается незначительно за сезон. Пик активности фермента при любой густоте приходится на середину августа. У сильно загущенных деревьев минимальные отличия от двух предыдущих групп наблюдаются в июне и августе в 1,7 и 2 раза, максимальные – в июле в 3–4 раза от слабо загущенных и свободно растущих деревьев, соответственно (рис. 2Б.). К концу вегетационного периода активность фермента у свободно растущих и слабо загущенных деревьев возвращается на стартовый уровень начала сезона, а у сильно загущенных падает практически до нуля, что, по-видимому, объясняется более ранним завершением лигнификации и переходом в состояние покоя.

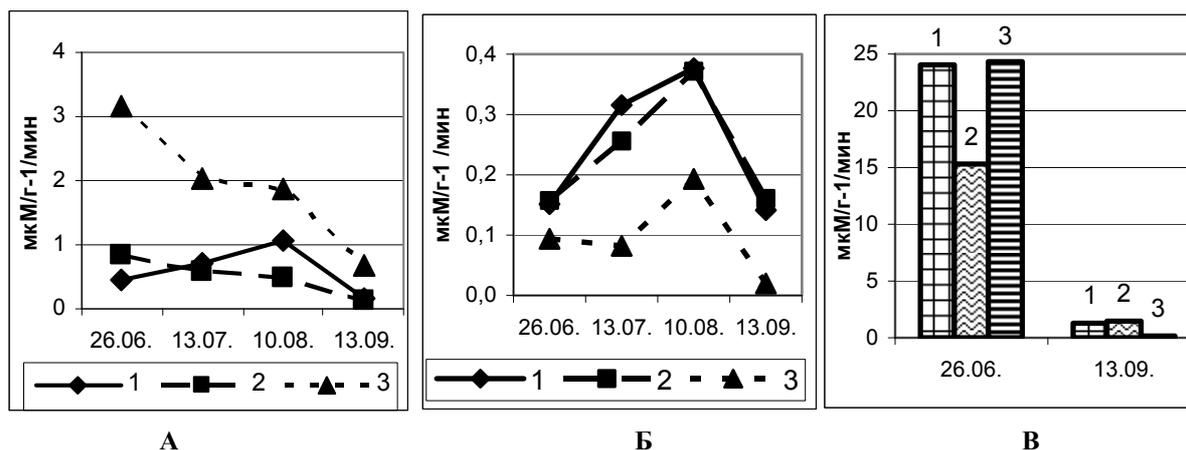


Рисунок 2. Активность глутаминсинтетазы (А), глутаматдекарбоксилазы (Б) и изоцитратдегидрогеназы (В) в камбиальной зоне ствола в течение сезона.

(1 – свободно растущие, 2 – средне загущенные, 3 – сильно загущенные).

Активность изоцитратдегидрогеназы в камбиальной зоне ствола резко снижена в конце сезона (рис. 2В), причем крайние по густоте биогруппы дают сходные значения, а промежуточная между ними биогруппа отличается пониженным в 1,6 раза показателем активности фермента в начале сезона вегетации. Высокий показатель активности изоцитратдегидрогеназы в начале сезона вегетации свидетельствует об активной выработке кетоглутарата – предшественника глутаминовой кислоты.

Все полученные особенности динамик ферментативных реакций могут рассматриваться как результат реакции растений на стрессовое воздействие внутривидовой конкуренции.

Разные по густоте биогруппы деревьев на метаболическом уровне адаптируются к возникшим условиям среды. Между биогруппами существует четкая градация, как по морфометрическим характеристикам, так и по степени активности ферментов глутаминового цикла в зависимости от давления конкуренции.

Для средне угнетенных деревьев активность ферментов в основном выше, чем у свободно растущих. Это может объяснять начальные этапы развития стресса, когда растение активно адаптируется к условиям стесненного роста. У сильно угнетенных деревьев основная ферментативная активность направлена на выживание в экстремальных условиях повышенной конкуренции путем связывания токсичного аминного азота, образовавшегося при синтезе лигнина и не использованного в синтезе белка. При этом наблюдаются разные пути аккумуляции аминокрупп: через глутамин при максимальной густоте и через ГАМК при среднем и минимальном загущении.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Бузыкин А.И., Пшеничникова Л.С., Собачкин Д.С., Собачкин Р.С. Естественное изреживание разногустотных молодняков в экспериментальных посадках сосны. // Хвойные бореальной зоны. 2008. Вып. 25. № 3–4. С. 244–249.
2. Романова Л.И., Ермолаева М.В. Содержание свободных аминокислот в тканях сосны обыкновенной в зависимости от условий аэрации на верховом болоте // Лесоведение. 1999. № 4. С. 46–51.
3. Судацкова Н.Е., Милютин И.Л., Семенова Г.П. Влияние раневого стресса на состав свободных аминокислот и белков в тканях ствола сосны обыкновенной // Лесоведение. 2001. № 1. С. 32–37.
4. Судацкова Н.Е., Милютин И.Л., Семенова Г.П. Состав свободных аминокислот различных органов и тканей *Pinus sylvestris*, *Larix sibirica* и *Larix gmelinii* // Растительные ресурсы. 2003. Т.39. Вып.1. С.19–31
5. Сукачев В.Н. Основы лесной биогеоценологии. М.: Наука, 1964. 574 с.
6. Шевякова Н.И. Метаболизм и физиологическая роль пролина при водном и солевом стрессе // Физиология растений. 1983. № 30. С. 768–783.
7. Bown, A.W. and Shelp, B.J. The metabolism and functions of g-aminobutyric acid // Plant Physiol. 1997. 115. P. 1–5.

8. *Bowsher C.G., Lacey A.E., Hanke G.T., Clarkson D.T., Saker L.R., Stulen I., Emes M.J.* The effect of Glc6P uptake and its subsequent oxidation within pea root plastids on nitrite reduction and glutamate synthesis // *Journal of Experimental Botany*. 2007. Vol. 58. №. 5. P. 1109–1118.

9. *Hude O., Wu J.-Y.* A rapid method for assaying enzymes whose substrates and products differ by charge. Application to brain L-glutamate decarboxylase // *Journal of Neurochemistry*. 1976. Vol. 21. P. 83–86.

## PEROXIDASE ACTIVITY IN ORGANS AND TISSUES OF TREES OF GENUS BETULA

*Galibina N.A.<sup>1</sup>, Tselischeva U.L.<sup>2</sup>, Andreev V.P.<sup>2</sup>, Sofronova I.N.<sup>1</sup>, Fedorova A.P.<sup>2</sup>*

<sup>1</sup> Forest Research Institute of Karelian Research Center of RAS, Petrozavodsk, E-mail: ngalibina@sampo.ru

<sup>2</sup> Petrozavodsk State University, Petrozavodsk

Abstract. Curly birch trees with different degrees of manifestation of wood grain figure were studied for the activity of acid and alkaline peroxidases in the phloem and xylem parts of the cambial zone during the growing season. Peroxidase activity in phloem tissues was higher than in xylem tissues in both forms of silver birch. Correlations between peroxidase activity and the intensity of cambial growth were negative. By June, when growth processes commence in the trunk, peroxidase activity dropped significantly compared with May, when cambium was not yet active. Late in July, the prolonged high temperature period resulted in substantial inhibition of cambial activity. The activity of peroxidase, both acid and alkaline forms of the enzyme, rose in this period both in the xylem and in the phloem. High enzyme activity was found only in the tissues of curly-grained trunks. Peroxidase activity in straight-grained plants did not change. Possible pathways of peroxidase involvement in the processes of abnormal morphogeny of woody plants are discussed.

## АКТИВНОСТЬ ПЕРОКСИДАЗЫ В ОРГАНАХ И ТКАНЯХ ДЕРЕВЬЕВ РОДА BETULA

*Галибина Н.А.<sup>1</sup>, Целищева Ю.Л.<sup>2</sup>, Андреев В.П.<sup>2</sup>, Софронова И.Н.<sup>1</sup>, Федорова А.П.<sup>2</sup>*

<sup>1</sup> Учреждение Российской академии наук Институт леса Карельского научного центра РАН, Петрозаводск, Пушкинская 11, 185910, Факс: (8142)768160, тел. (8142)768160, E-mail: ngalibina@sampo.ru

<sup>2</sup> Петрозаводский государственный университет, Петрозаводск, пр.Ленина, 33

Исследования механизмов формирования тканей ствола древесных растений, выполненные в лаборатории физиологии и цитологии древесных растений Института леса Карельского научного центра РАН, показали, что формирование структурных аномалий древесины и коры происходит под воздействием повышенных концентраций транспортных сахаров в тканях [6]. Известно, что у карельской березы при любом варианте скрещивания родительских форм в потомстве всегда имеют место особи как с узорчатой, так и обычной (безузорчатой) текстурой древесины. Для диагностики узорчатой древесины в потомстве карельской березы был разработан метод, основанный на определении активности пероксидазы лубяной ткани в однолетних сеянцах потомства карельской березы в фазе глубокого покоя [7]. О наличии признаков узорчатой древесины судят по скорости проявления активности пероксидазы, которая находится в обратно пропорциональной зависимости с признаком узорчатости. Пероксидаза (1.11.1.7) – это фермент, способный выполнять многообразные функции в живых организмах. Ему принадлежит ключевая роль в процессе лигнификации [2, 9, 12]. Пероксидаза, наряду с супероксиддисмутазой и каталазой, участвует в защите организма от окислительного стресса [1], контролирует рост растений, их дифференциацию и развитие [10]. Поскольку субстратами пероксидазы могут быть фитогормоны (абсцизовая кислота, гибберелловая кислота, ауксин), фермент может регулировать состав физиологически активных веществ в тканях растения [8, 11]. Несмотря на полифункциональность пероксидаз в растительном организме, исследования пероксидазной активности у взрослых растений карельской березы при формировании структурных аномалий ствола ранее не проводились. В связи с этим целью работы было: изучить активность пероксидазы в тканях ксилемы деревьев карельской березы с разной степенью узорчатости древесины.

Основными объектами исследования являлись деревья карельской березы с узорчатым строением древесины ствола и растения без признаков структурных аномалий. Возраст растений – 40 и 8