

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

лет. Все деревья произрастали в одинаковых почвенно-климатических условиях на Агробиологической станции Карельского научного центра РАН вблизи г. Петрозаводска. Отбор образцов вели в течение вегетационного периода:

- май – распускание листьев (активный ксилемный транспорт);
- июнь – интенсивный прирост ксилемы (активный флоэмный транспорт ассимилятов к камбиальной зоне и ксилеме);
- июль – в связи с отсутствием дождей и высокими температурами в это время имело место преждевременное торможение камбиального роста;
- октябрь – затухание всех ростовых процессов, подготовка растений к состоянию покоя.

На анализ брали почки или листья, из ствольной части препарировали ткани флоэмы и ксилемы. В ткани флоэмы входили клетки камбиальной зоны, материнские клетки флоэмы, проводящая флоэма, в ткани ксилемы – материнские клетки ксилемы и ксилема текущего года. Растительный материал растирали в жидком азоте до однородной массы и гомогенизировали при 4°C в буфере следующего состава: 50 мМ HEPES (pH 7,5), 1 мМ ЭДТА, 1 мМ ЭГТА, 3 мМ DTT, 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,5 мМ PMSF. После 20-минутной экстракции гомогенат центрифугировали при 10000 g в течение 20 минут. Осадок трехкратно промывали буфером. Объединенный супернатант диализовали при 4°C в течение 18–20 часов против буфера для гомогенизации, разбавленного в 10 раз. В полученном экстракте анализировали ферментативную активность. Активность пероксидазы определяли спектрофотометрически (СФ–2000, Россия) на примере окисления гваякола (орто-метоксифенола) и бензидина. Для определения активности пероксидазы в реакции окисления бензидина использовали реакционную смесь следующего состава: 60 мМ K, Na - фосфатный буфер (pH 7,8), 5,4 мМ перекись водорода и 33,6 мкМ бензидина. В ходе реакции пероксидазного окисления бензидина образуется промежуточное комплексное соединение – бензидиновый синий. Данное соединение является крайне неустойчивым и быстро разрушается. В связи с этим, определение активности пероксидазы производили по изменению концентрации исходного вещества – бензидина. Количество израсходованного бензидина определяли по градуировочной кривой ( $\lambda=282$  нм). Ферментативную активность пероксидазы выражали как: израсходовано мкмоль бензидина/ г сырой ткани. Состав реакционной смеси для определения активности пероксидазы в реакции окисления гваякола был следующий: 60 мМ K, Na - фосфатный буфер (pH 4,9), 2,7 мМ перекись водорода, 22 мМ гваякол. Ферментативную активность пероксидазы определяли по скорости образования продукта реакции тетрагваякола (с учетом коэффициента экстинкции  $\varepsilon_{470\text{нм}} = 0,0266\text{мкМ}^{-1}\text{см}^{-1}$ ) и выражали как: образовалось мкмоль тетрагваякола/ г сырой ткани. Крахмал извлекали из ткани флоэмы хлорной кислотой, его содержание определяли по количеству образованной в результате кислотного гидролиза глюкозы.

**Активность пероксидазы в тканях ствола карельской березы.** Индивидуальные пероксидазы различаются по субстратной специфичности, что связано с изменением заряда и конфигурации фермента и субстрата при разных значениях pH [3]. В нашей работе мы использовали два типа субстрата: бензидин, к которому более высокую специфичность имеют анионные пероксидазы, и гваякол, к нему более высокую специфичность имеют катионные пероксидазы.

У безузорчатых 40-летних растений во флоэме активность пероксидазы в мае была самой высокой, а к июлю наблюдалось снижение ее активности, как для анионных, так и для катионных пероксидаз. В ксилеме, наоборот, наибольшая активность пероксидазы отмечалась в конце июля. В этот период торможения деятельности камбия, вызванного погодными условиями, вероятно, усиливаются процессы дифференциации клеток ксилемы, и повышение активности пероксидазы может быть связано с ее непосредственным участием в лигнификации клеточных оболочек. В подтверждение этого, говорит тот факт, что у 8-летних безузорчатых растений, у которых не наблюдалось явного торможения активности камбия (растения дополнительно поливали в течение сезона) увеличения активности пероксидазы в конце июля не наблюдали. Следует отметить, что у безузорчатых 8-летних растений, активности катионных и анионных пероксидаз на протяжении периода роста (июнь, июль) были очень низкими (рис. 1, 2).

Другая картина наблюдалась в тканях ствола узорчатых деревьев, в них обнаружена высокая активность фермента. Между активностью пероксидазы и интенсивностью камбиального роста получены отрицательные корреляции. Так, к июню, когда в ствольной части начинаются ростовые

процессы, активность пероксидазы существенно снижалась по сравнению с маем, когда камбий еще не активен. В конце июля при торможении камбиальной активности в ксилеме и во флоэме наблюдалось увеличение пероксидазной активности, как для кислых, так и для основных форм фермента (рис. 1, 2). На протяжении вегетационного периода активность фермента в тканях флоэмы была выше по сравнению с тканями ксилемы.

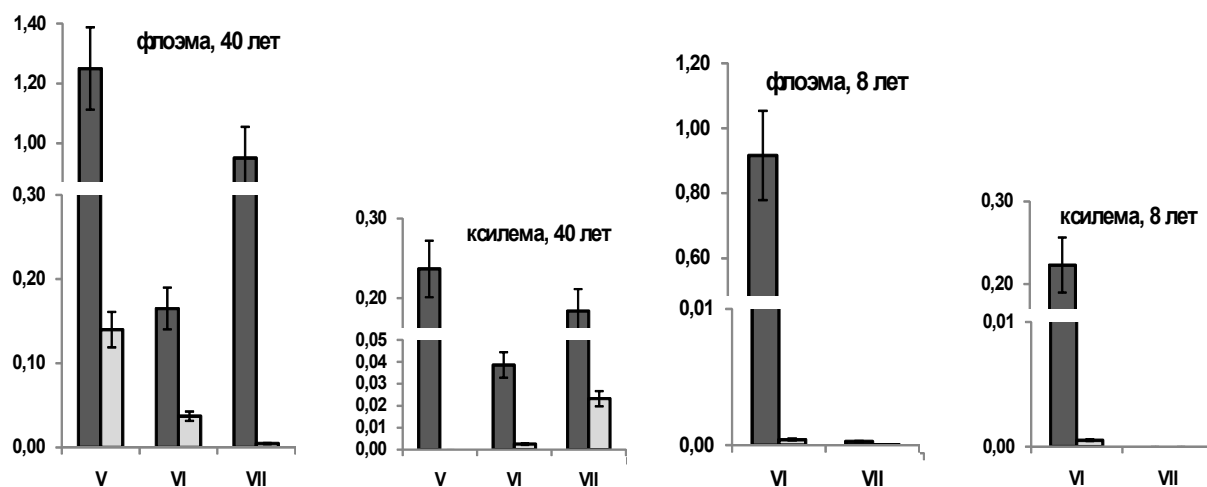


Рисунок 1. Активность пероксидазы (мкмоль образовавшегося тетрагваякола / г сырой ткани) в течение вегетационного периода в тканях ствола карельской березы.

Темные столбики – узорчатые растения, светлые – безузорчатые. По оси абсцисс – дата взятия образцов (месяц), по оси ординат – активность фермента.

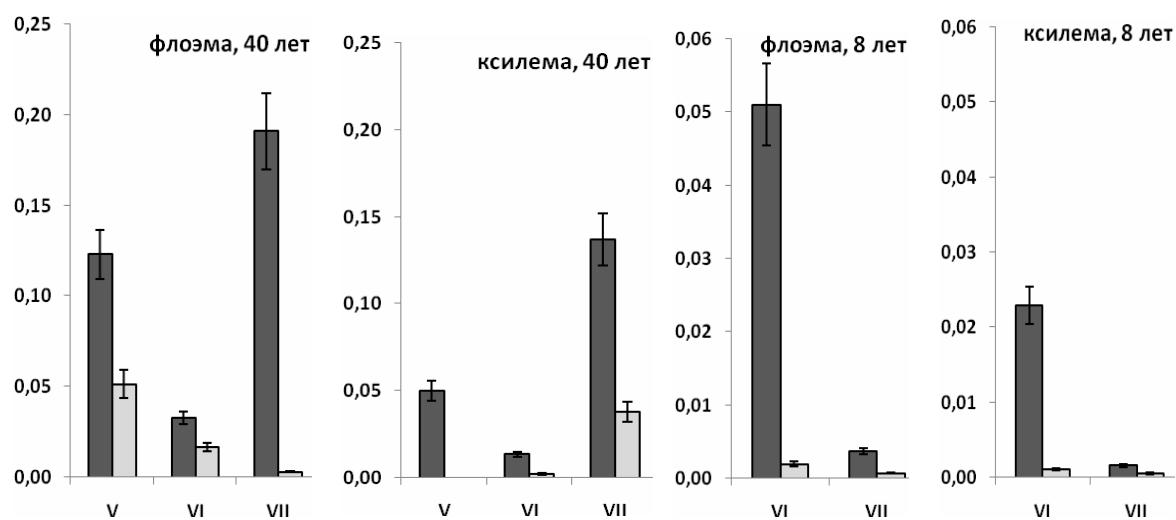


Рисунок 2. Активность пероксидазы (мкмоль израсходованного бензидина / г сырой ткани) в течение вегетационного периода в тканях ствола карельской березы.

Обозначения, как на рис. 1.

Активность пероксидаз сильно зависит от присутствия субстратов. Резкое повышение активности гваяколпероксидазы при торможении камбиальной активности в конце июля у узорчатых растений может быть связано с возрастанием содержания соединений фенольной природы. При изучении физико-химических свойств клеточных стенок тканей ствола было установлено, что у карельской березы с аномальной, узорчатой древесиной, жесткость структуры клеточной стенки выше по сравнению с обычной березой, что обусловлено как большей степенью лигнификации клеток ксилемы, так и увеличением доли поперечных диферуловых мостиков [4].

В опытах с каллюсной тканью табака было показано, что активность изопероксидаз в ней гораздо выше, чем в уже дифференцированных тканях, тогда как в процессе роста и дифференциации клеток гороха происходило увеличение количества изопероксидаз, особенно щелочных [2]. Таким образом, во флоэме у безузорчатых растений к концу июля реакции с участием пероксидаз, вероятно, практически снижаются, а избыток притекающих из листьев метаболитов временно откладывается в виде крахмала (рис. 3). У узорчатых растений, наоборот, высокая пероксидазная активность во флоэме может свидетельствовать об интенсивно идущих процессах роста и дифференциации клеток, об активном фенольном метаболизме и об интенсивном дыхании.

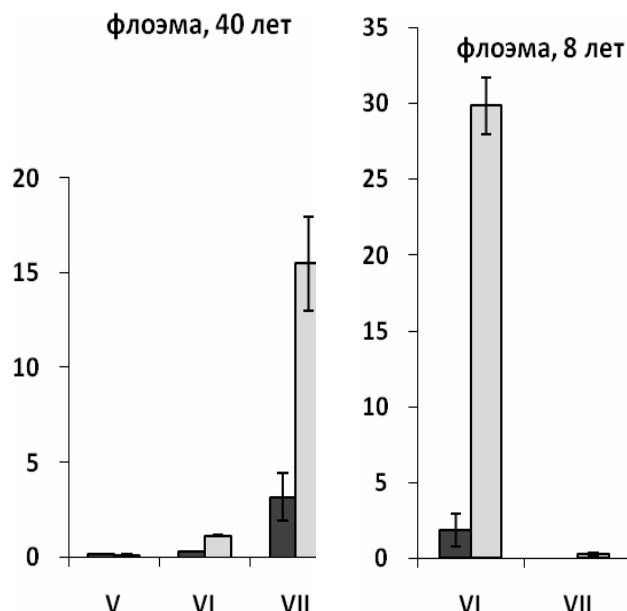


Рисунок 3. Динамика содержания крахмала в течение вегетационного периода во флоэме деревьев карельской березы.

Темные столбики – узорчатые растения, светлые – безузорчатые. По оси абсцисс – дата взятия образцов (месяц), по оси ординат – содержание крахмала (мг/г)

При снижении камбиальной активности у 40-летних растений во флоэме происходит накопление крахмала, причем количество его у безузорчатых растений было в 3,5 раза больше, чем у узорчатых форм.

У 8-летних растений существенное накопление крахмала отмечено только у безузорчатых деревьев в конце июня в период, когда у узорчатых деревьев наблюдалась высокая активность пероксидазы в ствольной части (рис. 3).

**Активность пероксидазы в листьях карельской березы.** У 40-летних деревьев наибольшая пероксидазная активность была в листьях в мае, в период роста листовой пластинки, и в почках в октябре, когда идет подготовка к состоянию глубокого покоя (рис. 4А). В периоды роста и дифференциации тканей ствола (июнь, июль), когда лист выступает в качестве донора вновь синтезированных органических веществ, активность фермента снижалась. В это время наблюдалось увеличение содержания крахмала (рис. 5А), что может свидетельствовать об интенсивном фотосинтезе. Отличия между двумя формами растений наблюдались только в период торможения камбиальной деятельности, у узорчатых деревьев была выше активность пероксидазы, и больше накапливалось крахмала в листьях.

У 8-летних растений динамика активности пероксидазы в листьях была схожей с таковой у взрослых деревьев (рис. 4Б). Следует отметить, что активность пероксидазы в листьях 8-летних и 40-летних растений была значительно ниже, чем в тканях ствола. В июне, в период предшествующий активному синтезу вторичной клеточной стенки в тканях ксилемы 8-летних растений, происходило существенное накопление в листьях крахмала, причем у узорчатых форм количество его было выше (рис. 5Б). Таким образом, можно заключить, что накопление сахаров в листьях сопровождалось снижением пероксидазной активности.

Известно, что на процесс дифференциации и рост клеток существенное влияние оказывают фитогормоны. Для развития проводящих элементов ксилемы необходим ауксин, а проводящих эле-

ментов флоэмы гиббереллин [13]. С одной стороны, ауксин, как регулятор многих физиологических процессов, является индуктором пероксидазы [5]. С другой стороны, ауксин относят к специфическим субстратам пероксидаз растений, и может подвергаться окислению кислородом, которое катализируется пероксидазой [8]. Окисление ауксина пероксидазой способствует генерации свободных радикалов, и, как следствие, активизации перекисного окисления липидов. В семенах эти процессы сопровождаются возрастанием дыхания, повышением общего уровня метаболизма [2, 8].

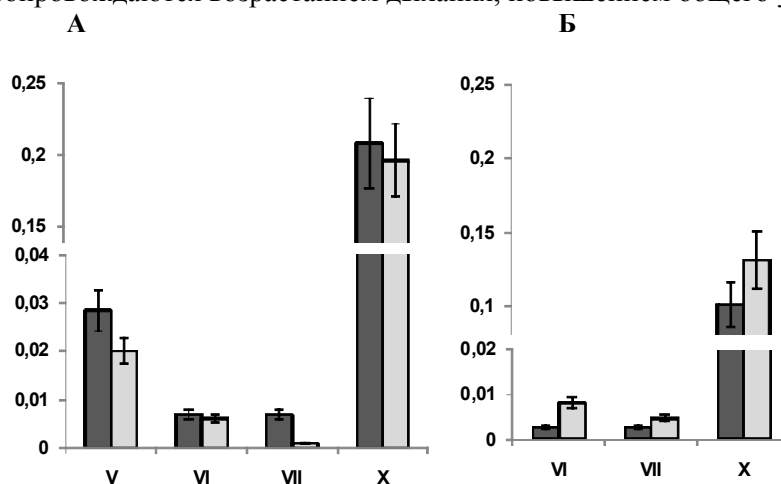


Рисунок 4. Активность пероксидазы (мкмоль образовавшегося тетрагваякола / г сырой ткани) в течение вегетационного периода в листьях 40-летних (А) и 8-летних (Б) деревьев карельской березы.

Обозначения, как на рис. 1.

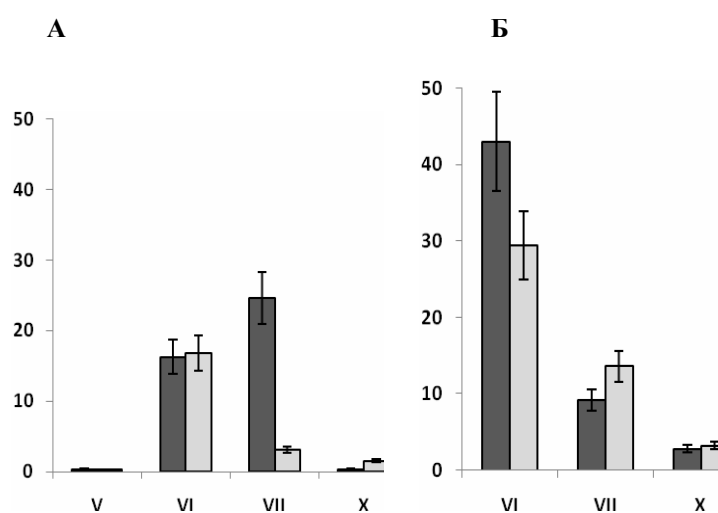


Рисунок 5. Динамика содержания крахмала (мг/г) в течение вегетационного периода в листьях 40-летних (А) и 8-летних (Б) деревьев карельской березы.

Обозначения, как на рис. 3

Таким образом, в тканях ствола с узорчатым строением была обнаружена высокая ферментативная активность пероксидаз, которая изменялась в течение вегетационного сезона. У безузорчатых растений активность пероксидазы так сильно не изменялась. Наблюдаемые нами изменения активности пероксидазы на разных фазах развития указывают на ее активное участие в метаболических процессах.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Андреев ИМ. Функции вакуоли в клетках высших растений // Физиология растений. 2001. Т. 48. С. 777–778.
2. Андреева В.А. Фермент пероксидаза: участие в защитном механизме растений. М.: Наука, 1988. 128 с.
3. Газарян И.Г., Хушпультян Д.М., Тишков В.И. Особенности структуры и механизма действия пероксидазы растений // Успехи биологической химии. 2006. Т. 46. С. 303–322.
4. Галибина Н.А., Терехова Е.Н. Свойства клеточных оболочек тканей ствола *Betula pendula* Roth // Мат. Всерос. конф. «Дендрэкология и лесоведение». Красноярск: Институт леса им. В.Н. Сукачева СО РАН. 2007.

5. Кулаева О.Н. О регуляции экспрессии генов в растительных клетках // Физиология растений. 1978. Т. 25. № 5. С. 990–1008.
6. Новицкая Л.Л. Карельская береза: механизмы роста и развития структурных аномалий. Рос. акад. наук, Карел. науч. центр, Ин-т леса. Петрозаводск: Verso, 2008. 144 с.
7. Попов В.К., Авраменко Р.С., Филоненко Е.В. Способ диагностики узорчатой древесины карельской березы // Описание изобретения к патенту российской федерации. 1996. № 2063679.
8. Рогожин В.В. Peroxidase как компонент антиоксидантной системы живых организмов. СПб.: ГИОРД, 2004. 240 с.
9. Шарова Е.И. Клеточная стенка растений. СПб.: СПбГУ, 2004. 156 с.
10. Borchert R. Time Course and Spatial Distribution of Phenylalanine Ammonia Lyase and Peroxidase Activity in Wounded Potato Tuber Tissue // Plant Physiol. 1978. Vol. 62. P. 789–793.
11. Gove J.P., Hoyle M.C. The isozymic similarity of indoleacetic acid oxidase to peroxidase in bich and horseradish // Plant Physiol. 1975. Vol. 56. P. 684–687.
12. Fry S.C. Phenolic components of the primary cell wall and their possible role in the hormonal regulation of growth // Planta. 1979. Vol. 146. P. 343–351.
13. Wareing P.F., Phillips I.D.J. Growth and differentiation in plants. Oxford: Pergamon Press. 1981. 343 p.

## ENZYMES OF SUCROSE METABOLISATION DURING FORMATION OF ABNORMALITIES IN CURLY BIRCH

*Galibina N.A.<sup>1</sup>, Krasavina M.S.<sup>2</sup>, Novitskaya L.L.<sup>1</sup>, Sofronova I.N.<sup>1</sup>*

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

<sup>2</sup> Institute of Plant Physiology Russian Academy of Sciences, Moscow

Abstract. We studied the activity of apoplastic (ApIn), vacuolar (VacIn), cytoplasmic (CtIn) invertases and sucrose synthase (SS) in trunk tissues of curly birch trees with figured and straight grain over the growing season. ApIn activity in phloem tissues was higher compared with other enzymes that break down sucrose. Its values were the highest in May and during the plants' preparation for dormancy. During high cambium activity and secondary cell wall formation ApIn activity in the phloem dropped significantly. In this period, SS activity in the xylem grew notably. Differences in the distribution of enzyme activity were found between curly birch trees with figured trunk wood and the plants with no abnormalities. Abnormal sections featured high ApIn activity throughout the growing season. In plants with normal wood texture, the sucrose synthase pathway of sucrose metabolisation prevailed during active growth over the invertase pathway.

## ФЕРМЕНТЫ МЕТАБОЛИЗАЦИИ САХАРОЗЫ ПРИ ФОРМИРОВАНИИ АНОМАЛИЙ КАРЕЛЬСКОЙ БЕРЕЗЫ

*Галибина Н.А.<sup>1</sup>, Красавина М.С.<sup>2</sup>, Новицкая Л.Л.<sup>1</sup>, Софронова И.Н.<sup>1</sup>*

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

<sup>2</sup> Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Москва, ул. Ботаническая, 35

Аномальная древесина карельской березы формируется в результате отклонений в деятельности камбия, ее рисунок образуется за счет характерных аномальных вкраплений прослоек паренхимной ткани. При этом происходит интенсивное нарастание коры как за счет активизации камбиальных делений в сторону флоэмы, так и за счет повторных делений паренхимных клеток флоэмы первого – второго года жизни [1, 2]. Была сформулирована гипотеза о том, что нарушение дифференциации камбиальных производных может возникать в местах с избыточным содержанием сахаров, в частности сахарозы [5]. Метаболизация сахарозы в растительных тканях происходит через ее ферментативное расщепление с участием инвертазы или сахарозосинтазы [3, 4, 8]. С одной стороны, эти ферменты участвуют в создании концентрационного градиента сахарозы в месте разгрузки флоэмы, необходимого для поддержания транспорта ассимилятов в камбиальную зону. С другой стороны, соотношение активностей этих ферментов