

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

определяет включение расщепляемой ими сахарозы в различные метаболические пути и, как следствие, может определять направление дифференциации камбиальных производных. Мы предположили, что нарушения процессов дифференциации материнских клеток ксилемы и флоэмы у карельской березы связаны с изменением соотношения активностей инвертазы и сахарозосинтазы в отдельных участках ствола. Поэтому целью работы было выявление соотношения инвертазного и сахарозосинтазного путей метаболизации сахарозы в процессе формирования структурных аномалий тканей древесины карельской березы.

Исследование активности ферментов метаболизации сахарозы проводили на деревьях карельской березы с узорчатым строением древесины ствола и растениях без признаков структурных аномалий. Возраст растений 40 лет. Все деревья произрастали в одинаковых почвенно-климатических условиях. 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.

Из ствола берез препарировали ткани флоэмы, ксилемы и камбиальной зоны, растирали в жидком азоте до однородной массы и гомогенизировали при 4°C в буфере следующего состава: 50 мМ Нерес (рН 7,5), 1 мМ ЭДТА, 1 мМ ЭГТА, 3 мМ ДТТ, 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,5 мМ PMSF. После 20-минутной экстракции гомогенат центрифугировали при 10000 g в течение 20 минут. Осадок троекратно промывали буфером. Осадок и объединенный супернатант диализовали при 4°C в течение 18–20 часов против буфера для гомогенизации, разбавленного в 10 раз. Осадок использовали для определения апопластной (связанной с клеточными стенками) инвертазы, а супернатант – цитоплазматической и вакуолярной инвертазы и сахарозосинтазы. Активности ферментов определяли после инкубации полученного препарата при 30°C в течение 30 минут. Инкубационная среда для определения активности инвертазы содержала 100 мМ ацетатный буфер, рН 4,7 (апопластный и вакуолярный фермент) или 50 мМ Нерес, рН 7,5 (цитоплазматическая инвертаза), концентрация сахарозы – 25 мМ. Количество образовавшейся в процессе инкубации глюкозы определяли глюкозооксидазным методом. Инкубационная среда для определения активности сахарозосинтазы содержала 70 мМ Нерес (рН 7,4), 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1 мМ уридиндифосфат, 1 мМ пиродифосфат, 1 мМ НАДФ, 50 мМ сахарозу, 1 U глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, 2 U фосфоглюкомутазы. Активность сахарозосинтазы определяли в направлении распада сахарозы спектрофотометрически по восстановлению НАДФ [10]. Активность инвертазы и сахарозосинтазы выражали в нмоль распавшейся сахарозы на г сырой ткани. Крахмал извлекали из ткани флоэмы хлорной кислотой, его содержание определяли по количеству образованной в результате кислотного гидролиза глюкозы.

**Активность ферментов метаболизации сахарозы у безузорчатых деревьев.** На деревьях карельской березы с нормальным строением древесины в течение сезона вегетации в тканях ствола была исследована активность инвертазы (Инв, ЕС 3.2.1.26), фермента, гидролизующего сахарозу до моносахаров (глюкозы и фруктозы), и активность сахарозосинтазы (СС, ЕС 2.4.1.13), фермента, приводящего к расщеплению сахарозы до фруктозы и уридиндифосфоглюкозы (УДФГ).

В мае, когда основным акцептором ассимилятов являются распускающиеся листья, во флоэме были обнаружены высокие активности кислых инвертаз. Активность апопластной инвертазы достигала 13000 нмоль/г сырой ткани, вакуолярной инвертазы – 1100 нмоль/г сырой ткани, а цитоплазматической – только 316 нмоль/мг белка. Еще менее активной была сахарозосинтаза. В тканях ксилемы в этот период невысокую активность проявляли только кислые инвертазы, тогда как активности цитоплазматической инвертазы и сахарозосинтазы не определялись совсем (рис. 1).

В конце июня, в период активных ростовых процессов, во флоэме на фоне снижения активности апопластной инвертазы происходило возрастание активности цитоплазматических ферментов. В ксилеме активность апопластной инвертазы не изменялась, но проявлялась высокая активность сахарозосинтазы, которая не выявлялась в начале вегетации. Значения ее достигли 20000 нмоль/г сырой ткани (рис. 1). В это время основная масса вновь синтезированных ассимилятов тратится на процессы роста и формирования тканей ксилемы.

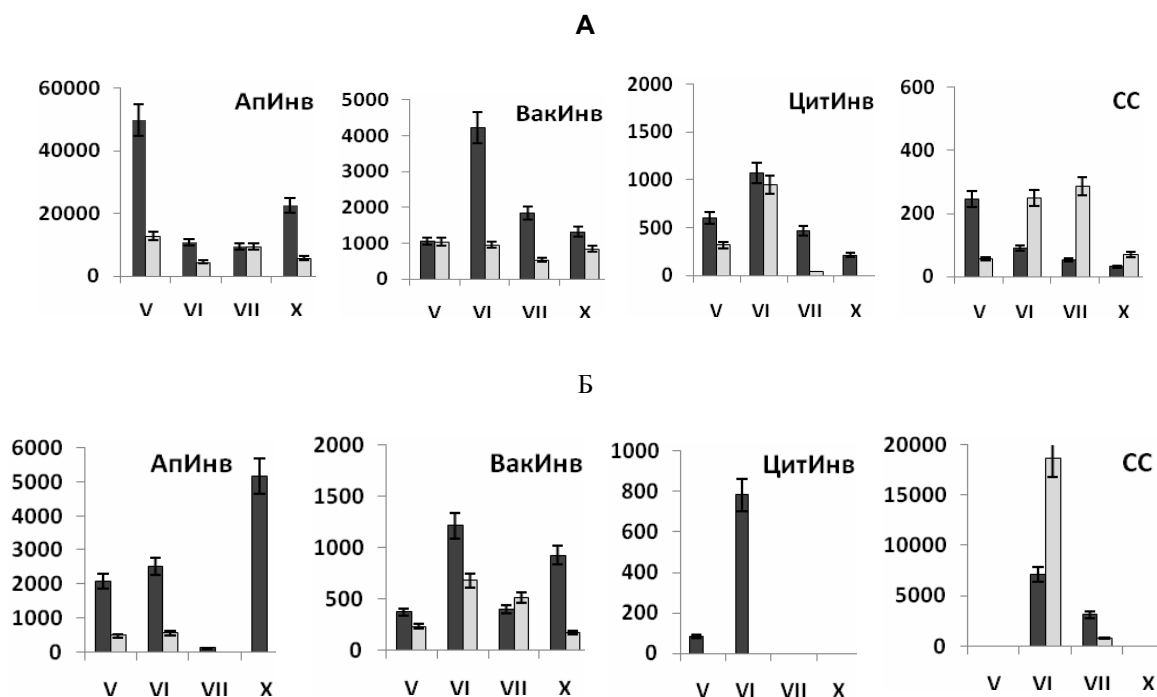


Рисунок 1. Активность ферментов метаболизма сахарозы в тканях флоэмы (А) и ксилемы (Б) 40-летних деревьев в течение вегетационного периода.

АпИнв, ВакИнв, ЦитИнв – апопластная, вакуолярная и цитоплазматическая инвертазы. СС – сахарозсинтаза. Темные столбики – узорчатые растения, светлые – безузорчатые. По оси абсцисс – дата взятия образцов (месяц), по оси ординат – активность ферментов (нмоль распавшейся сахарозы/г сырой ткани).

Середина и конец июля в нашем исследовании – это период торможения деятельности камбия, вызванного погодными условиями. Отсутствие дождей в течение июля и высокие температуры, вероятно, способствовали также снижению темпа развития вторичной стенки и лигнификации. Вероятно, этим можно объяснить снижение в ксилеме активности сахарозсинтазы (в 24 раза) и практически полное исчезновение апопластной инвертазы. Во флоэме апопластная инвертаза была даже более активной, чем в июне, но снижалась активность вакуолярной и, особенно, цитоплазматической инвертазы. Снижение активностей двух последних форм инвертазы соответствует затуханию процессов роста клеток растяжением. При этом заметно возросла активность сахарозсинтазы, что может отражать использование сахарозы для синтеза нерастворимых углеводов. Так, например, в этот период происходит накопление крахмала (рис. 2).

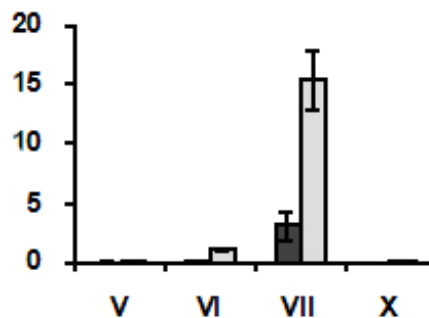


Рисунок 2. Динамика содержания крахмала в течение вегетационного периода в тканях флоэмы 40-летних узорчатых (темные столбики) и безузорчатых (светлые столбики) деревьев карельской березы.

В октябре во флоэме были активны только кислые инвертазы (вакуолярная и апопластная), но значения их активности были ниже, чем в мае. В ксилеме активность метаболизирующих сахарозу ферментов была близка к нулю за исключением вакуолярной инвертазы.

**Активность ферментов метаболизации сахарозы деревьев с узорчатым строением древесины.** В тканях ствола узорчатых растений также наибольшей активностью отличалась апопластная инвертаза. Во флоэме узорчатых деревьев ее активность значительно превышала таковую во флоэме безузорчатых растений. В мае значения ее были самыми высокими за весь сезон вегетации. Еще одна отличительная особенность узорчатых деревьев – это высокая активность вакуолярной инвертазы во флоэме, ее значения повышались в период активных ростовых процессов и достигали 4200 нмоль/г сырой ткани. В июле, в условиях торможения ростовых процессов, во флоэме узорчатых растений активности вакуолярной и цитоплазматической инвертазы снижались. В октябре происходило резкое падение активности этих ферментов.

На фоне высоких активностей инвертазы во флоэме активность сахарозосинтазы в ксилеме узорчатых деревьев была в 3 раза ниже по сравнению с безузорчатыми. Максимальную ее активность, как и у безузорчатых растений, наблюдали в июне, к июлю активность снижалась, но не столь резко, как у растений с нормальным строением древесины. Следует отметить, что у узорчатых растений высокая активность апопластной инвертазы наблюдалась и в тканях ксилемы, особенно в октябре месяце, когда ее значения достигали 5750 нмоль/г сырой ткани (рис. 1).

Изучение активности ферментов метаболизации сахарозы показало, что ярко выраженной характеристикой ферментативной активности тканей березы является высокая активность апопластной инвертазы, что свидетельствует о важной роли апопласта в разгрузке флоэмы. Особенно высокую активность инвертазы клеточной стенки обнаружили в тканях ствола узорчатых растений. И во флоэме, и в ксилеме на протяжении вегетационного сезона она значительно превышала активность в стволах без выраженного узорчатого строения древесины. Более высокая активность апопластной инвертазы – первое отличительное свойство ферментативной активности тканей ствола узорчатых растений.

Основная функция инвертазы клеточной стенки – участие в разгрузке флоэмы и поддержании тем самым концентрационного градиента между донором и акцептором ассимилятов. Активный флоэмный транспорт у древесных растений наблюдается с началом экспорта ассимилятов из листа. Лист березы становится донором ассимилятов после достижения 50 % своего окончательного размера [7], поэтому в мае у березы флоэма еще бездействует. Однако в это время идет интенсивный ксилемный транспорт. Вода восходящего ксилемного потока поступает в клетки и ткани всего ствола. При этом в цитоплазме активируется гидролиз полимерных компонентов, что может приводить к повышению концентрации сахарозы. Обнаруженные высокие значения активности апопластной инвертазы в мае свидетельствуют о большой концентрации сахарозы в апопласте в этот период, особенно у растений с узорчатой древесиной. Вероятно, функция апопластной инвертазы в мае – это участие в мобилизации запасных веществ. Образующиеся моносахара могут возвращаться в клетку вместе с водными потоками, повышая тем самым тургорное давление и поддерживая дыхание. Однако основная масса сахарозы и образующихся при ее расщеплении гексоз по градиенту концентрации перемещаются по апопласту до ксилемы и с ксилемным потоком поступают к развивающимся листьям, главным акцепторам в этот период.

Характерно, что второй пик активности апопластной инвертазы наблюдался в октябре. Повышение активности апопластной инвертазы может быть связано с накоплением в стволе в результате осеннего оттока ассимилятов из кроны сахарозы. В этот период идет подготовка растения к состоянию покоя, и сахароза, которая у березы не является запасным метаболитом [6], расщепляется вакуолярной и апопластной инвертазами с образованием моносахаров, которые, вероятно, возвращаются в клетки паренхимы и идут на синтез запасных биополимеров. Этот процесс также более активен у узорчатых растений и, очевидно, способствует запасанию большего количества веществ в тканях ствола. Осенью наблюдали самую высокую активность апопластной инвертазы и в тканях ксилемы узорчатых растений, когда безузорчатые растения не проявляли активности этого фермента. Этот факт можно связать с наличием в тканях ксилемы узорчатых растений аномальных прослоек паренхимы, где также могут откладываться запасные вещества.

В период активных ростовых процессов бросается в глаза более высокая активность вакуолярной инвертазы флоэмы узорчатых растений. При торможении ростовых процессов в конце июля, активность вакуолярной инвертазы во флоэме узорчатых и безузорчатых растений резко снижалась. Высокая активность кислой инвертазы в течение длительного времени смещает соотношение

сахароза/гексозы в сторону накопления гексоз и тем самым способствует индукции клеточных делений [9]. В данной связи можно предположить, что высокая активность апопластной и вакуолярной инвертазы у узорчатых растений, возможно, является причиной увеличения числа паренхимных клеток в зоне проводящей флоэмы. Кроме того, образующиеся гексозы являются субстратом для внутриклеточных синтезов, что коррелирует с накоплением в паренхимных клетках проводящей флоэмы узорчатых растений большого количества липидных и танниновых включений [2, 5]. Таким образом, высокая активность инвертазы, очевидно, может приводить к усилению функции запасаения через образование запасных веществ и увеличение числа запасающих клеток.

В июне–июле активно фотосинтезирующие листья являются донорами ассимилятов, а основным местом потребления метаболитов становится камбиальная зона и формирующиеся клетки ксилемы и флоэмы. При дифференциации элементов вторичной ксилемы ведущим процессом является формирование клеточной оболочки. В этот период в ксилеме происходила активация сахарозосинтазы, активность которой у безузорчатой березы превышала активность всех форм инвертазы. Распад сахарозы по сахарозосинтазному пути в основном связан с анаболическими процессами, в которых УДФГ сразу поступает на синтез ряда структурных компонентов, например микрофибрилл целлюлозы [9, 11]. Можно заключить, что у узорчатых деревьев в местах аномалий формирование тканей ксилемы происходило менее интенсивно, чем у безузорчатых растений.

Наконец, можно заметить еще одну особенность активности ферментов во флоэме узорчатых растений. В тканях безузорчатых растений в течение вегетации происходило нарастание активности сахарозосинтазы, которая в конце периода активного роста даже превышала активность цитоплазматической инвертазы. Наоборот, у узорчатых растений цитоплазматическая инвертаза всегда была более активной, чем сахарозосинтаза. Такое различие в соотношении активности цитоплазматических ферментов может быть связано с различными путями использования сахарозы в паренхимных клетках флоэмы узорчатых и безузорчатых растений. У узорчатых берез в период активного роста во флоэмной паренхиме, по данным электронной микроскопии [5], накапливаются липиды и таннины, а у безузорчатых – крахмал, последнее подтверждено результатами наших исследований.

Сравнение растений по суммарной активности ферментов, метаболизирующих сахарозу, во флоэме и ксилеме показало, что количество расщепленной сахарозы у узорчатых форм значительно превосходило таковое у безузорчатых растений в обеих тканях (табл.). Исключение составлял июнь, когда наблюдали высокие значения активности сахарозосинтазы у безузорчатых деревьев. Можно заключить, что у узорчатых форм карельской березы количество сахаров во флоэме на протяжении всего периода вегетации было более высоким. Это может быть связано с более интенсивным притоком сахарозы из ассимилирующих и запасающих тканей, причину которого предстоит выяснить.

Таблица. Суммарное количество метаболизированной сахарозы за 30 мин, нмоль/мг белка

40 лет	Узорчатые растения		Безузорчатые растения	
	флоэма	ксилема	флоэма	ксилема
Май	51768,9	2547,5	14198,1	727,9
Июнь	16063,1	11632,8	6653,5	19889,3
Июль	11718,9	3652,5	10392,4	1276,4
Октябрь	24091,4	6100,2	6662,5	172,3

Таким образом, между деревьями карельской березы с узорчатым строением древесины ствола и растениями без признаков аномалий обнаружены отличия в распределении активности расщепляющих сахарозу ферментов. Можно предположить, что в аномальных участках высокая активность апопластной инвертазы в начале вегетации способствует более активной мобилизации запасных метаболитов ствола, в период активного роста – интенсивной флоэмной разгрузке, при подготовке к периоду покоя – синтезу запасных питательных веществ. Накопление гексоз в результате активности апопластного, вакуолярного и цитоплазматического ферментов вызывают индукцию деления клеток паренхимы и активизацию в них синтеза запасных метаболитов. У растений с нормальным строением древесины преобладание в период активного роста сахарозосинтазного пути метаболизации сахарозы над инвертазным способствует появлению большего количества УДФ-глюкозы, которая идет на формирование оболочек клеток ксилемы и не приводит к разрастанию паренхимной ткани коры.

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ № 09-04-01643-а, № 09-04-90735-моб\_ст и № 10-04-90834-моб\_ст.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Барильская Л.А. Структурный анализ узорчатой древесины карельской березы // Ботанический журнал. 1978. Т. 63. № 6. С. 805–811.
2. Барильская Л.А., Ахтио И.Т. Особенности строения коры березы карельской // Проблемы комплексного использования древесины и охраны природы. Петрозаводск. 1981. С. 4–5.
3. Кретович В.Л. Биохимия растений. М.: Высш. шк., 1986. 503 с.
4. Курсанов А.Л. Транспорт ассимилятов в растении. М.: Наука, 1976. 646 с.
5. 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.
6. Новицкая Л.Л., Галибина Н.А. Транспортная и запасная формы сахаров у березы повислой (*Betula pendula* Roth) // Матер.междун.конф. «Структурные и функциональные отклонения от нормального роста и развития растений под воздействием факторов среды». Петрозаводск, 2011.
7. Цельникер Ю.Л., Малкина И.С. Баланс органического вещества в онтогенезе листа у лиственных деревьев // Физиология растений. 1986. Т. 33. № 5. С. 935–940.
8. Copeland L. Enzymes of sucrose metabolism // Methods Plant Biochem. 1990. №. 3. P. 73–85.
9. Sturm A., Tang G-Q. The sucrose-cleaving enzymes of plants are crucial for development, growth and carbon partitioning // Trends Plant Sci. 1999. №. 4. P. 401–407.
10. Xu D.-P., Sung S.-J. S., Loboda T., Kormanik P. P., and Black C. C. Characterization of sucrolysis via the uridine diphosphate and pyrophosphate-dependent sucrose synthase pathway // Plant Physiol. 1989. Vol. 90. P. 635–642.
11. Winter H., Huber U. Regulation of sucrose metabolism in higher plants: localization and regulation of activity of key enzymes // Crit Rev. Plant Sci. 2000. Vol. 19. P. 31–67.

### BIOCHEMICAL AND STRUCTURAL FEATURES OF TREES OF GENUS *BETULA* AT INITIAL STAGES OF ITS ONTOGENY

*Galibina N.A., Sofronova I.N.*

Forest Research Institute of Karelian Research Center of RAS, Petrozavodsk, E-mail: ngalibina@sampo.ru

Abstract. On two-year-old seedling plants of genus *Betula* it is shown, that a silver birch and a downy birch already at early stages ontogeny, differ among themselves on strategy of distribution metabolite. At silver birches of both forms the bulk of assimilates are directed toward trunk tissues to satisfy cambial growth demands. Formation of conducting system goes on a background of the high metabolic status. At a usual silver birch accumulation of carbohydrates results in formation of thick-walled vessels of xylem with strong lignified cellular walls. At the Karelian birch intensive accumulation of saccharose in phloem can break cambial activity, resulting in the future to formation of structural anomalies of wood. At a downy birch the attracting cent of photoassimilate the crone is fluffy. Accumulation of carbohydrates in leaves can lead to decrease in intensity of photosynthesis and as consequence to reduction of intensity of transpiration and water-conductivity of xylem. In result, in a trunk are formed less lignified cells of xylem, in comparison with a silver birch.

### БИОХИМИЧЕСКИЕ И СТРУКТУРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ РАСТЕНИЙ РОДА *BETULA* L. НА НАЧАЛЬНЫХ ЭТАПАХ ОНТОГЕНЕЗА

*Галибина Н.А., Софронова И.Н.*

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

Весь жизненный цикл древесных растений, делится на большое количество качественно различающихся, с характерными морфологическими особенностями периодов – этапы онтогенеза: эмбриональный, ювенильный, имматурный, виргинильный, зрелости, старости. Ювениль-