

Минобрнауки России
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Федеральный исследовательский центр
«Карельский научный центр Российской академии наук»
(КарНЦ РАН)

На правах рукописи

НИКЕРОВА Ксения Михайловна

НАУЧНЫЙ ДОКЛАД

об основных результатах научно - квалификационной работы (диссертации)
на тему: **«Участие ферментов антиоксидантной системы в формировании
узорчатой древесины карельской березы»**,
подготовленной в соответствии с требованиями
Федерального государственного образовательного стандарта
высшего образования по направлению 06.06.01. Биологические науки
(уровень подготовки кадров высшей квалификации)

Научный руководитель:
заместитель директора по научной
работе Института леса КарНЦ РАН,
д.б.н., Н.А. Галибина

Петрозаводск 2019

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы. Процесс формирования древесины, или ксилогенез, в жизни древесного растения имеет огромное значение. В основе ксилогенеза лежит фиксация углерода в составе структурных полимеров углеводной и фенольной природы в клеточных стенках древеснеющих тканей растений. Ксилогенез не представляется возможным без деятельности ферментов углеводного и фенольного метаболизма в связи с их непосредственным участием в образовании целлюлозы и лигнина, которые, в свою очередь, определяются качественными и количественными особенностями биосинтеза сахаров и фенольных соединений (Галибина и др., 2015а, 2015б; Галибина и др., 2016а, 2016б; Мощенская и др., 2017; Никерова и др., 2017; Никерова и др., 2019а, 2019б; Kubler, 1991; Robertson et al., 1995; Sudachkova et al., 2004; Foucart et al., 2006; Nomura et al., 2013; Novitskaya et al., 2016, 2019).

Образование древесины очень лабильная характеристика, кроме того, несколько разных типов древесины может присутствовать в пределах одного дерева (Paiva et al., 2008; Dharanishanthi, Dasgupta, 2016). Поэтому среди исследователей стоит задача поиска цитологических, биохимических и молекулярных маркеров, которые могли бы определять тот или иной путь ксилогенеза. Также встает вопрос: могут ли данные характеристики иметь диагностическое значение в онтогенезе растения с целью повышения продуктивности и познания механизмов получения древесины с заданными свойствами (Fucuda, 1996; Plomion et al., 2001; Wodzicki, 2001).

С этой точки зрения ценным объектом является карельская береза (*Betula pendula* Roth var. *carelica* (Mercl.) Hämet-Ahti) – особая форма березы повислой (*Betula pendula* Roth), у которой при любом варианте скрещивания родительских форм в потомстве появляются особи как с узорчатой, так и безузорчатой текстурой древесины. Кроме того, в пределах одного дерева можно встретить узорчатые и безузорчатые участки (Любавская, 1978; Ермаков, 1986; Машкина и др., 2000; Novitskaya et al., 2016, 2019). Древесина карельской березы носит свилеватый характер и визуально характеризуется наличием узора (Коровин и др., 2003; Novitskaya, Kushnir, 2006). Причина внешних изменений – отклонения в деятельности латеральной меристемы – камбия (Барильская, 1978; Коровин и др.,

2003; Новицкая, 2008; Novitskaya, Kushnir, 2006). В зонах развития структурных аномалий не запускается программа гибели клеток, приводящая к формированию сосудов и волокон ксилемы и ситовидных элементов флоэмы, дифференцирующиеся камбиальные производные сохраняют протопласт и превращаются в клетки запасующей паренхимы, которые накапливают большие количества запасных веществ (Novitskaya, Kushnir, 2006).

Исследования, выполненные ранее в Институте леса КарНЦ РАН, показали, что по анатомо-морфологическим характеристикам и метаболическому статусу ферментов углеводного обмена (сахарозосинтазы (СС) и апопластной инвертазы (АпИInv)) растения карельской березы отличаются от растений обычной березы повислой во взрослом состоянии и раннем онтогенезе, и, что интересно, различия по исследуемым параметрам обнаружены также в ряду растений карельской березы с разной степенью узорчатости (Галибина и др., 2016а, 2016б, 2018, 2019; Мощенская и др., 2016, 2017, 2019; Никерова, Галибина, 2017; Никерова и др., 2018, 2019а, 2019б; Novitskaya et al., 2016, 2019). Среди ферментов антиоксидантной системы (АОС) была отмечена диагностическая роль в идентификации степени узорчатости при использовании активности пероксидазы (ПО) (Галибина, Никерова, 2016; Галибина и др., 2016а; Никерова, Галибина, 2017).

ПО, наряду с другими ферментами, супероксиддисмутазой (СОД), каталазой (КАТ), полифенолоксидазой (ПФО), входит в единую сеть ферментов АОС, согласованное функционирование которой определяется локальными и общеклеточными каскадными взаимодействиями (Прадедова и др., 2011). Поэтому, вероятно, СОД, КАТ и ПФО также будут иметь разные биохимические стратегии при разных сценариях ксилогенеза. Более того, известно, что ферменты АОС принимают непосредственное участие в формировании древесины и образовании лигнина (Olson, Vagner, 1993; Polle et al., 1994; Ros-Barceló, 1997, 2005; Fernández-García et al., 2004; Passardi et al., 2004; Gapper, Dolan, 2006; Ros-Barceló et al., 2006; Ros-Barceló, Gómez Ros, 2009, Gill et al., 2010).

В связи с этим, **цель настоящей работы** состояла в изучении участия ферментов АОС в формировании узорчатой древесины карельской березы.

Для достижения указанной цели были поставлены следующие **задачи**:

1. изучить годовую динамику активности перекись-утилизирующих ферментов (КАТ, ПО) в тканях ствола двух форм березы повислой, различающихся по структуре древесины;
2. исследовать активность СОД, КАТ, ПО и ПФО в ксилеме и флоэме обычной березы повислой и карельской березы при формировании древесины с разной степенью узорчатости;
3. охарактеризовать биохимические стратегии комплекса ферментов АОС в ряду растений карельской березы с разной степенью узорчатости;
4. рассмотреть метаболические стратегии ферментов АОС на начальных этапах онтогенеза у 6 и 11-недельных семян обычной и карельской березы;
5. исследовать активность ПО и КАТ у 10-месячных семян обычной березы повислой и карельской березы на разных стадиях развития листа;
6. сравнить обнаруженные в листовом аппарате семян биохимические закономерности активности изучаемых ферментов с таковыми в листовом аппарате у взрослых безузорчатых и узорчатых растений карельской березы;
7. выявить биохимические стратегии комплекса ферментов АОС у деревьев сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) с прямослойной древесиной и с проявившимся косослоем.

Научная новизна и практическая значимость работы. Впервые изучены метаболические стратегии ферментов АОС в проводящих тканях у двух форм березы повислой (*Betula pendula* Roth) при разных сценариях ксилогенеза. Впервые показана диагностическая роль ферментов АОС при формировании узорчатости у карельской березы (*Betula pendula* Roth var. *carelica* (Mercl.) Hämet-Ahti). Впервые приведены данные о возможности использования активности ферментов АОС для ранней диагностики признака узорчатости. Впервые предложено использовать листовой аппарат исследуемых растений в качестве тест-объекта для диагностики узорчатости. Для сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) получены первичные данные об увеличении активности ферментов АОС при формировании косослойной древесины.

Выявленные закономерности могут лечь в основу количественной диагностики качества древесины карельской березы и аномальной древесины в целом, как на лесосеменных плантациях, так и в местах их естественного произрастания, что необходимо как для целей фундаментальной науки, так и в различных областях промышленности при заготовке высококачественного материала, обладающего наибольшей ценностью.

Личное участие автора. Автор принимал личное участие в планировании работы, постановке целей и задач исследования, модификации и совершенствовании методов исследования в соответствии с объектами исследования. Автор лично принимал участие в планировании и проведении экспедиционной и экспериментальной работы, в обработке полученных данных, в том числе, статистической, и обсуждении полученных результатов. Автор лично участвовал в написании статей и подготовке устных и стендовых докладов по материалам исследования. Научно-квалификационная работа (диссертация) написана автором самостоятельно.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 45 работ, из них 16 статей, в рецензируемых журналах, входящих в перечень изданий, рекомендованных ВАК.

Работа выполнена на базе двух лабораторий: аналитической и физиологии и цитологии древесных растений Института леса – обособленного подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра «Карельский научный центр Российской академии наук». Исследования выполнены на научном оборудовании Центра коллективного пользования Федерального исследовательского центра «Карельский научный центр Российской академии наук».

ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

Приведена общая информация о строении и функциях ферментов АОС – СОД, КАТ, ПО и ПФО и активных форм кислорода (АФК) в растительном организме. Обсуждается взаимодействие компонентов АОС и АФК между собой. Проанализировано участие ферментов АОС в различных процессах в растительном организме: в процессах роста и дифференциации, старения, сигналинга, образования различных по составу клеточных стенок, донорно-акцепторных отношениях (ДАО) Показаны взаимосвязи АОС с фенольным и углеводным обменом. Прослежена эволюция системы защиты от АФК. Рассмотрены причины формирования структурных аномалий у древесных растений в целом. Раскрывается информация о процессах формирования узорчатой древесины у карельской березы, механизмах ферментативной и гормональной регуляции данного процесса. Затронута проблема формирования косослойной древесины у сосны обыкновенной. Обсуждается вопрос важности поиска биохимических маркеров процессов ксилогенеза.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Растительный материал. Основными объектами исследования были две формы березы повислой разного возраста: обычная береза повислая *Betula pendula* Roth var. *pendula* и карельская береза – *B. pendula* var. *carelica* (Mercl.) Hämet-Ahti.

46-летние деревья *B. pendula* var. *pendula* и *B. pendula* var. *carelica*. Деревья обычной березы повислой (*B. pendula* var. *pendula*) обладали обычной прямослойной древесиной. Среди деревьев карельской березы (*B. pendula* var. *carelica*) подбирали особи с хорошо проявившейся узорчатостью древесины. Место произрастания деревьев: Агробиологическая станция Карельского научного центра РАН, в 2 км от г. Петрозаводска, Республика Карелия. Почвенные и климатические условия у исследуемых деревьев не отличались. Исследование проводили в течение всего сезона 2016 года. Отбор производился в дни без осадков в утреннее время (9-11 часов утра). На стволе изучаемых растений вырезали окошки 4х6 см и отделяли кору от древесины. С поверхности древесины соскабливали ткани ксилемы и флоэмы. Ткани ксилемы были представлены материнскими клетками ксилемы и наружными слоями прироста ксилемы текущего года. Ткани флоэмы

отбирали с внутренней поверхности коры и состояли из камбиальной зоны, проводящей флоэмы и самых внутренних слоев непроводящей флоэмы. У узорчатых растений карельской березы ткани отбирали из участков ствола с характерными вздутиями, неровностями, крупными бугорками и бугорчатыми выпуклостями. Отбор образцов тканей ствола контролировали под световым микроскопом.

Определяли активность КАТ и апопластной ПО. Отбирали по 5 растений обычной березы повислой и карельской березы.

25-летние растения *B. pendula* var. *carelica* с разной степенью узорчатости древесины ствола, которую характеризовали баллом от 0 (безузорчатые растения) до 3 (наиболее узорчатые растения), согласно способу диагностики узорчатой текстуры древесины, предложенного В. И. Ермаковым (1986). На стволе вырезали окошки 10х6 см и подсчитывали количество желобковидных углублений на 1 см² обнаженной поверхности древесины. Так, растениям, не имеющим углублений, присваивали 0 баллов; имеющим 1-3 углубления на см² (редкий рисунок) – 1 балл; 4-6 углублений на см² (плотный рисунок) – 2 балла; 7 и более углублений на см² (очень плотный рисунок) – 3 балла (Ермаков, 1986). Исследуемые растения произрастали на лесосеменной плантации в Медвежьегорском районе Республики Карелия и были выращены из семян от контролируемого опыления плюсовых деревьев. Образцы были отобраны в июне-июле 2016, 2017 годов: 2016 год – период активного камбиального роста; 2017 год – период подготовки к камбиальному росту, когда происходило формирование тонкостенной древесины. На анализ отбирали ткани ксилемы, флоэмы и листья с укороченных побегов (брахибластов).

Определяли активность СОД, КАТ, апопластных и цитоплазматических изоформ ПО и ПФО. Всего было отобрано 12 безузорчатых растений карельской березы и 22 растения карельской березы с разной степенью узорчатости.

12-летние растения *B. pendula* var. *pendula* и *B. pendula* var. *carelica* с разной степенью узорчатости древесины ствола отбирали на Агробиологической станции Карельского научного центра РАН. Растения были выращены из семян, полученных от контролируемого опыления (Forelia OY, Финляндия). Семена карельской березы получены от родительских деревьев с ярко

выраженными признаками узорчатости древесины. Отбор образцов проводили в период активной камбиальной деятельности (начало июля 2018 года). Образцы для анализа отбирали с деревьев обычной березы, безузорчатой и узорчатой частей ствола узорчатых деревьев карельской березы. На анализ отбирали ткани ксилемы и флоэмы.

Определяли активность СОД, КАТ, апопластных изоформ ПО и ПФО. Отбирали по 4 растения каждой группы.

Сеянцы обычной березы повислой (*B. pendula* var. *pendula*) и карельской березы (*B. pendula* var. *carelica*) исследовали в возрасте 6 недель, 11 недель, 10 месяцев.

Семена для выращивания исследуемых растений были получены от контролируемого опыления (Forelia OY, Финляндия). Семена карельской березы получены от родительских деревьев с ярко выраженными признаками узорчатости древесины. Сеянцы выращивали под светоустановкой при следующих условиях: температура воздуха 21-22 °С, освещенность 8 клк, светопериод 16 часов. Питательный грунт имел следующий состав основных элементов: N – 0.5%, С – 21%, Р подвижный – 0.03%, К подвижный – 0.09%.

У 6 и 11-недельных сеянцев на анализ отбирали стебли и листья размером 2-5 см.

Определяли активность СОД, КАТ, цитоплазматических изоформ ПО и ПФО. Было отобрано по 10-15 индивидуальных растений обычной и карельской березы.

У 10-месячных сеянцев на анализ отбирали листья, которые находились во внепочечном периоде развития. По форме исследуемые листья соответствовали форме листа взрослого растения, однако обладали разными размерами, поэтому листья сеянцев были разделены на фазы развития по длине: 1-2 см – **I** фаза развития, 3-4 см, 5-6 см, 7-8 см – **II**, **III** и **IV** соответственно.

Определяли активность КАТ и апопластной ПО. Для определения активности фермента на каждой фазе развития листа проводили по 5-7 независимых опытов.

Сосна обыкновенная. 150-300-летние деревья сосны обыкновенной *Pinus sylvestris* L. с прямослойной древесиной и с проявившимся косослоем, выраженным в разной степени (от 2-20 градусов наклона), произрастали в Пряжинском,

Деревянском и Прионежском лесничествах Республики Карелия. Образцы были отобраны в июле 2018 года в период активного камбиального роста. Наличие косослоя определяли по отклонению волокон от линии, параллельной продольной оси. Для этого вырезали окошки 10х6 см на расстоянии 1 м друг от друга по вертикальной линии и измеряли угол наклона. На анализ отбирали ткани ксилемы и флоэмы, аналогично тому, как отбирали их у растений березы.

Определяли активность СОД, КАТ, апопластных изоформ ПО и ПФО. Всего было отобрано по 20 прямослойных и косослойных деревьев сосны обыкновенной.

Биохимические исследования. Растительные ткани растирали с жидким азотом и гомогенизировали при 4 °С в буфере, который имел следующий состав: 50 мМ Нерес (рН 7.5), 1 мМ ЭДТА, 1 мМ ЭГТА, 3 мМ ДТТ, 5 мМ MgCl₂, 0.5 мМ PMSF. Затем гомогенат экстрагировали в течение 20 минут и центрифугировали при 10000 g 20 минут (центрифуга MPW-351R, Польша). После проводили диализ в течение 18-20 часов против буфера для гомогенизации, разбавленного в 10 раз при 4 °С. Ферментативные препараты, полученные после диализа, были использованы для спектрофотометрического определения (СФ 2000, Россия) активности изучаемых ферментов АОС (Галибина и др., 2013). Содержание белка определяли по методу Бредфорда.

Об активности СОД судили по ингибированию фотовосстановления нитросинего тетразолия (НСТ). Состав инкубационной среды: 50 мМ К, Na-фосфатный буфер (рН 7.8), 172 мкМ НСТ, 210 мкМ метионин, 24 мкМ рибофлавин, 0.1% тритон X-100. Активность определяли по уменьшению оптической плотности при 560 нм после 30 минут инкубации под светом флуоресцентных ламп. Активность СОД выражали в усл. ед. на 1 мг белка за 30 минут (усл. ед./мг белка) (Никерова и др., 2018, 2019б).

Об активности КАТ судили по ферментативному разложению перекиси водорода. Состав инкубационной среды: 50 мМ К, Na-фосфатный буфер (рН 7.8) и 14.7 мМ перекись водорода. Инкубировали в течение 4 минут. Активность определяли по уменьшению оптической плотности при 240 нм, содержание перекиси водорода рассчитывали по предварительно построенному градуировочному графику (Никерова и др., 2016). Активность КАТ выражали в мкмоль восстановленной перекиси водорода на 1 мг белка (мкмоль H₂O₂/мг белка).

Для определения активности ПО в качестве донора водорода использовали гваякол, в качестве субстрата – перекись водорода. Состав инкубационной среды: 50 мМ К, Na-фосфатный буфер (рН 5 и 7.8), 2.6 мМ перекись водорода и 21.5 мМ гваякол. Время наблюдения за реакцией – 30 минут. Активность определяли по образованию продукта реакции – тетрагваякола (ТГ) за счет увеличения оптической плотности при 470 нм. Количество ТГ рассчитывали с учетом коэффициента экстинкции ($\epsilon_{470\text{нм}} = 0.0266 \text{ мкМ}^{-1} \text{ см}^{-1}$). Активность ПО выражали в мкмоль образовавшегося ТГ на 1 мг белка (мкмоль ТГ/мг белка) (Галибина и др., 2013; Никерова, Галибина, 2017)

Для определения активности ПФО в качестве субстрата использовали пирокатехин. Состав инкубационной среды: 50 мМ К, Na-фосфатный буфер (рН 5 и 7.8), 16.4 мМ пирокатехин. Время наблюдения за реакцией – 20 минут. Активность определяли по увеличению оптической плотности при длине волны 420 нм, где поглощают продукты окисления пирокатехина. Активность ПФО выражали в усл. ед. на 1 мг белка за 1 минуту (усл. ед./мг белка) (Никерова и др., 2018, 2019).

Статистическая обработка данных осуществлялась в среде Microsoft Excel и PAST. На диаграммах приведены средние значения, с учетом указанной биологической и трехкратной аналитической повторностей, и их стандартные ошибки. Для оценки достоверности различий использовали t-критерий Стьюдента. Статистически значимыми считали различия при $p < 0.05$.

Исследования выполнены на научном оборудовании Центра коллективного пользования Федерального исследовательского центра «Карельский научный центр Российской академии наук».

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Участие пероксидазы и каталазы в процессах ксилогенеза у 46-летних растений двух форм березы повислой, различающихся по структуре древесины

Фенологическая фаза и метаболические процессы, протекающие в тот или иной период развития в растении во многом определяются температурой, как одним из основных факторов (Федорков, 2007).

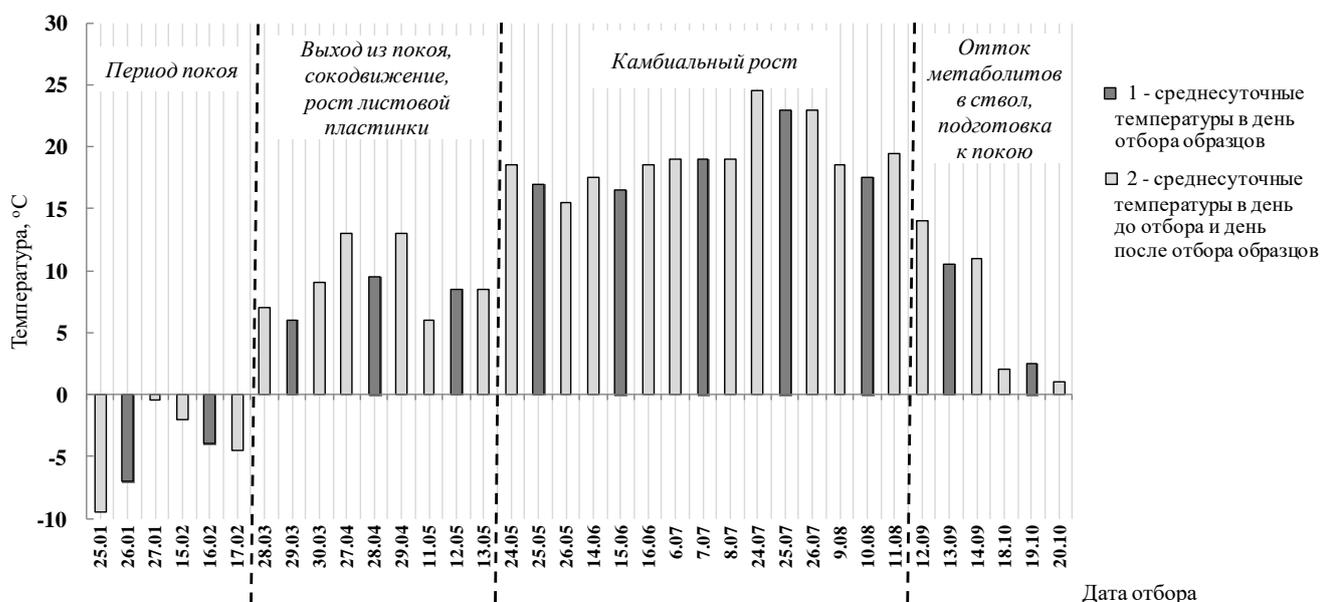


Рис. 1. Динамика среднесуточной температуры в течение 2016 года в г. Петрозаводске. Данные с сервера «Погода России» (<https://rp5.ru>). Период покоя: 26.01 – состояние глубокого покоя (в лабораторных условиях почки не распускаются); 16.02 – состояние вынужденного покоя (почки способны распускаться и расти). Выход из состояния покоя, сокодвижение, рост листовых пластинок: 29.03 – выход из состояния покоя, в стволе начинается гидролиз запасных веществ (Галибина и др., 2012); 28.04 – активное сокодвижение; 12.05 – активные процессы во флоэме, клетки флоэмы сильно вакуолизированы, отделение коры от ксилемы идет по зоне дифференциации флоэмных клеток (Барильская, 1978), лист распустился на 50-70%. Камбиальный рост: 25.05 – начало формирования прироста ксилемы, камбиальная зона оводнена, отделяется к флоэме, лист распустился на 100%; 15.06 – активное формирование ранней тонкостенной древесины; 07.07 – активизация утолщения клеточной стенки; 25.07 – продолжение формирования вторичной клеточной стенки; 10.08 – завершение камбиального роста, кора плохо отходит от ксилемы. Подготовка к состоянию покоя: 13.09 – интенсивный отток метаболитов в ствол, кора не отходит от ксилемы; 19.10 – подготовка к состоянию покоя.

Активность каталазы у двух форм березы повислой, отличающихся по структуре древесины

Переход от глубокого к вынужденному покою у растений обычной березы повислой в ксилеме биохимически отразился в увеличении активности КАТ от 405 до 463 мкмоль H_2O_2 /мг белка. Активность КАТ продолжила возрастать до выхода растений из состояния покоя и достигла максимального значения в период

развертывания листовой пластинки (12 мая) – 622 мкмоль H_2O_2 /мг белка. Во флоэме активность КАТ составила 380 мкмоль H_2O_2 /мг белка и 470-520 мкмоль H_2O_2 /мг белка в период покоя и при выходе из состояния покоя соответственно. Однако в период сокодвижения активность фермента резко упала до 190 мкмоль H_2O_2 /мг белка. Камбиальный рост отразился в понижении активности КАТ, а интенсивный отток метаболитов в ткани ствола в связи с прекращением ростовых процессов сопровождался возрастанием активности КАТ, особенно во флоэме (571 мкмоль H_2O_2 /мг белка). Переход растений к состоянию покоя охарактеризовался значениями КАТ, близкими к таковым в период покоя (рис. 2).

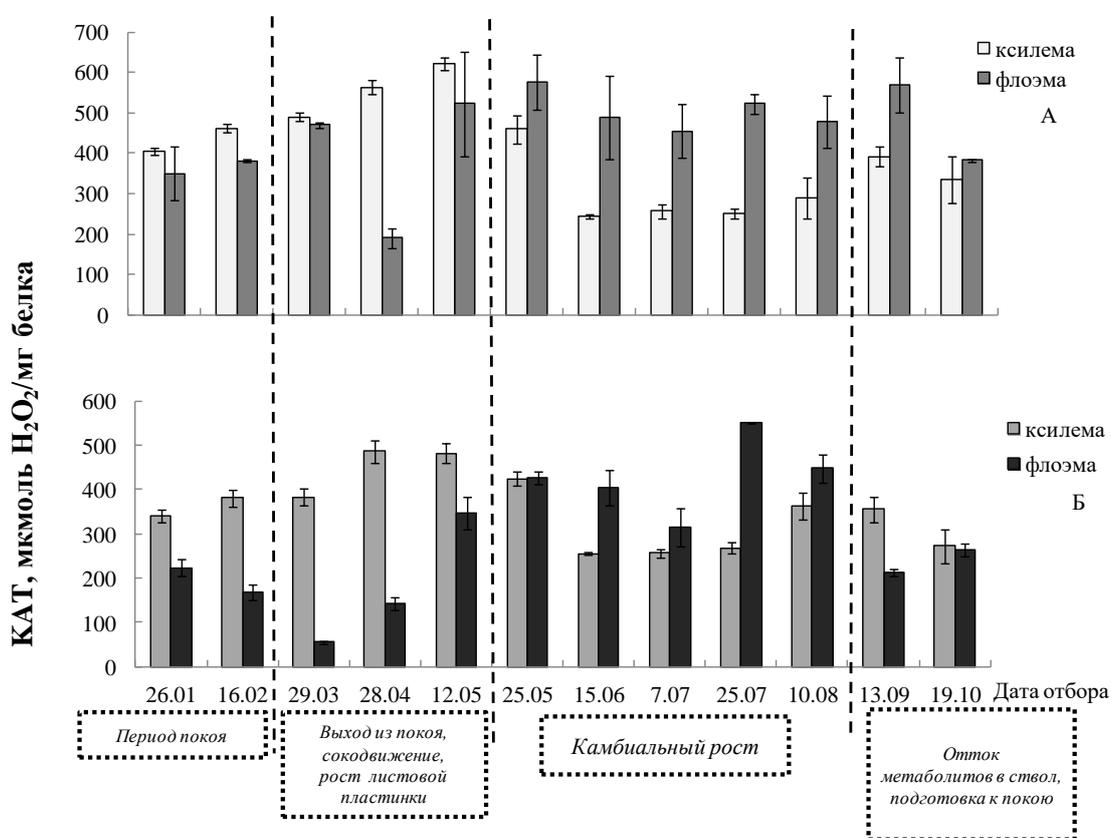


Рис. 2. Сезонная динамика активности КАТ (мкмоль H_2O_2 /мг белка) в тканях ствола у двух форм березы повислой: обыкновенной березы повислой (*B. pendula* var. *pendula*) (А), карельской березы (*B. pendula* var. *carelica*) (Б).

Динамика активности КАТ у растений карельской березы в ксилеме была аналогична таковой у растений обыкновенной березы повислой. Активность фермента в период покоя была 340-380 мкмоль H_2O_2 /мг белка, повышалась при выходе из состояния покоя, достигала максимальных значений в период развертывания

листовой пластинки (486 мкмоль H_2O_2 /мг белка) и снижалась в период камбиального роста (250-360 мкмоль H_2O_2 /мг белка). Во флоэме были обнаружены отличительные черты. При выходе растений из состояния покоя (29.03) и после окончания камбиального роста в период интенсивного оттока метаболитов в ствол (13.09) происходило снижение активности КАТ до 55 и 213 мкмоль H_2O_2 /мг белка соответственно (рис. 2).

Активность КАТ у растений обычной березы повислой была выше, чем у узорчатых растений карельской березы во флоэме и в ксилеме, за исключением периода камбиального роста, когда происходило формирование древесины и отложение вторичной клеточной стенки. В этот период в ксилеме наблюдалась обратная тенденция: КАТ была выше у растений карельской березы (рис. 2).

Статистический анализ показал, что КАТ была достоверно выше в течение всего сезона во флоэме у растений обычной березы повислой по сравнению с узорчатыми растениями карельской березы.

Активность пероксидазы у двух форм березы повислой, отличающихся по структуре древесины

Самая высокая активность ПО приходилась на состояние вынужденного покоя (конец марта). Активность в ксилеме составила 485 и 1087 и во флоэме – 611 и 1250 мкмоль ТГ/мг белка у растений обычной березы повислой и карельской березы соответственно. Фенологическая фаза, связанная с периодом сокодвижения, в ксилеме у растений обычной березы повислой и карельской березы отразилась невысокими значениями ПО: 31 и 424 мкмоль ТГ/мг белка соответственно. Во флоэме низкие значения обнаруживались в период формирования ранней тонкостенной древесины: 263 и 688 мкмоль ТГ/мг белка у растений обычной березы повислой и карельской березы соответственно. В ксилеме в этот период также наблюдались невысокие значения активности ПО: 91 мкмоль ТГ/мг белка у растений обычной березы повислой и 243 мкмоль ТГ/мг белка у растений обычной карельской березы.

Активность ПО была значимо выше в тканях флоэмы по сравнению с тканями ксилемы у обеих изучаемых форм березы. У растений обычной березы на

протяжении всего сезона активность ПО была ниже, чем у растений карельской березы, как в тканях ксилемы, так и в тканях флоэмы (рис. 3).

ПО была достоверно выше в течение всего сезона у растений карельской березы, по сравнению с растениями обычной березы повислой и в ксилеме, и во флоэме.

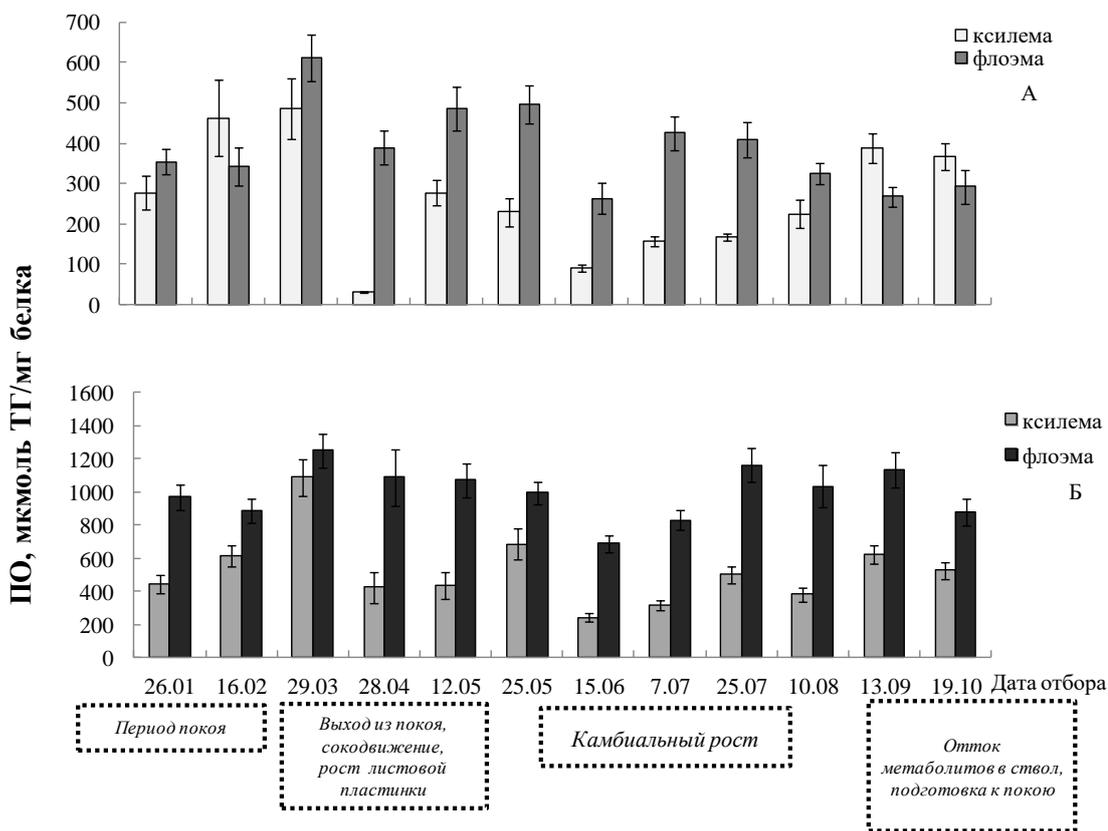


Рис. 3. Сезонная динамика активности ПО (мкмоль ТГ/мг белка) в тканях ствола у двух форм березы повислой: обычной березы повислой (*B. pendula* var. *pendula*) (А), карельской березы (*B. pendula* var. *carelica*) (Б).

Взаимосвязь активностей пероксидазы и каталазы у двух форм березы повислой, отличающихся по структуре древесины

Отметим, что метаболические стратегии КАТ и ПО в течение сезона у обычной березы повислой и у карельской березы отличались. Так, активность КАТ в тканях ствола была выше у растений обычной березы повислой (рис. 2), особенно во флоэме. Вероятно, причина в том, что активные ростовые процессы, сопровождающие образование нормальной древесины (Галибина и др., 2015а, 2015б; 2016), требовали высокой активности КАТ, которая служит показателем

формирования новых жизнеспособных органов и тканей (Карасев и др., 2015), а также указывает на активизацию работы меристем (Мазей и др., 2009; Павлова и др., 2014; Sairam et al., 2003). Узорчатые растения карельской березы показывали более высокую активность ПО (рис. 3). Возможная причина: компенсаторная роль перекись-расщепляющих ферментов (Fernández-García et al., 2004; Chen et al., 2006).

Глубокий покой биохимически характеризовался невысокими активностями ПО и КАТ у обеих изучаемых форм (рис. 2, 3, дата 26.01) по причине преобладания анаэробных процессов в зимний период покоя (Рогожин, 2004). Сосредоточение дыхательных процессов у древесного растения во флоэме в этот период (Крамер, Козловский, 1983) обуславливали более низкую здесь активность КАТ по сравнению с ксилемой (рис. 2, дата 26.01).

При выходе из состояния покоя в связи с повышением температуры (рис. 1) дыхание становилось интенсивнее, расходовались метаболиты углеводной природы (Исаева, Рязанова; 2006; Федорков, 2007), и активность изучаемых ферментов возросла (рис. 2, 3, дата 29.03), что, вероятно, связано с интенсивным гидролизом полимерных компонентов. Высокая активность АпИнв в этот период (Галибина, 2018, 2019), свидетельствовавшая о большой концентрации сахарозы в апопласте, особенно у растений с узорчатой древесиной, способствовала возникновению избытка гексоз, образующихся при апопластной утилизации дисахарида. Гексозы могли участвовать в образовании субстратов окислительных реакций АОС фенольной природы и АФК (Донцов и др., 2006; Couée et al., 2006; Wellen, Thompson, 2010), приводя, тем самым, к возрастанию активности ПО и КАТ. Однако у растений обычной березы повислой высокие значения наблюдались у обоих перекись-утилизирующих ферментов, а у растений карельской березы – экстремально высокая активность ПО на фоне самой низкой активности КАТ.

Период сокодвижения и активного транспорта сахаров по ксилеме к развивающимся листьям сопровождался понижением ПО активности (рис. 3, дата 28.04). В это время снижалась активность АпИнв (Галибина, 2018), что также свидетельствовало о снижении содержания сахарозы. В клетках сахара участвуют в поддержании тургорного давления и дыхания. Возрастание активности КАТ в

ксилеме (рис. 2, дата 28.04) можно рассматривать как показатель интенсивности дыхания.

В период камбиальной деятельности активность КАТ и ПО в ксилеме были понижены (рис. 2, 3, дата 15.06-10.08). В ксилеме доминировал сахарозосинтазный путь утилизации сахарозы (Галибина и др., 2015а; 2016) на фоне снижения активности АпИнв (Галибина, 2018). Метаболиты углеводной природы из листьев активно расходовались в камбиальной зоне на рост и дифференциацию ксилемы и флоэмы. Кроме того, перекись водорода могла быть использована в реакциях других метаболических путей, например, ферментами биосинтеза лигнина (Oslon, Varner, 1993; Ros Barceló, 2005). Полученные данные подтвердили обнаруженную ранее (Галибина и др., 2013) обратную корреляцию между ростовыми процессами и активностью ПО в тканях ствола.

В период подготовки растения к состоянию покоя в стволе в результате осеннего оттока ассимилятов из кроны повышалось содержание сахарозы и активность АпИнв (Галибина, 2018), что так же, как и в период выхода растения из состояния покоя, повлияло на повышение активности ПО и КАТ (рис. 2, 3, дата 13.09). У узорчатых растений на фоне высокой активности АпИнв (рис. 2, дата 13.09) возросла ПО активность (рис. 3, дата 13.09) и снизилась КАТ (рис. 2 дата 13.09).

Выявленная в течение сезона взаимосвязь активностей КАТ и ПО с активностью АпИнв может свидетельствовать о том, что изменение активности ферментов АОС у карельской березы может быть связано с нарушением углеводного обмена. Перекись водорода может играть роль сигнальной молекулы, регулируя уровень экспрессии *PR*-генов (Bi et al., 1995; Pellinen et al., 2002), кодирующих патоген-индуцируемые белки (*PR*-белки, от pathogenesis related), которые управляют неспецифичной устойчивостью растений к действию различных факторов (Kinkema et al., 2000; Van Loon et al., 2006; Almagro et al., 2009); в числе прочих к *PR*-белкам относятся и ПО. На трансгенных растениях тополя (сверхэкспрессия генов, кодирующих АпИнв) продемонстрировано увеличение уровня экспрессии *PR*-генов в ответ на повышение активности АпИнв (Zhang et al., 2014).

Таким образом, данный этап исследования показал наличие различных метаболических стратегий КАТ и ПО в течение всего сезона у обычной березы повислой и у карельской березы. Из этого следует, что по изменению активности КАТ и ПО можно судить о возможном сценарии ксилогенеза у древесного растения.

Биохимические стратегии антиоксидантных ферментов в тканях ствола 12-летних растений обычной березы повислой и карельской березы

Формирование структурных аномалий древесины у карельской березы обычно протекает в возрасте от 5-6 до 14-15 лет (Новицкая, 2008). Поэтому именно в этот период интересно рассмотреть метаболические стратегии изучаемых ферментов, которые уже во взрослом состоянии, при наличии характерных структурных изменений, биохимически отражают разные сценарии ксилогенеза у изучаемых двух форм березы повислой. Отметим, что образование древесины очень лабильная характеристика, кроме того, несколько разных типов древесины могут присутствовать в пределах одного дерева (Paiva et al., 2008; Dharanishanthi, Dasgupta, 2016).

Для исследования были выбрали 12-летние растения обычной березы повислой и карельской березы, ткани были отобраны в период активного камбиального роста в июле 2018 года. Кроме того, внешне узорчатость у исследуемых растений карельской березы была распределена неравномерно, на одном и том же стволе растений карельской березы встречались безузорчатые и узорчатые участки (рис. 4).

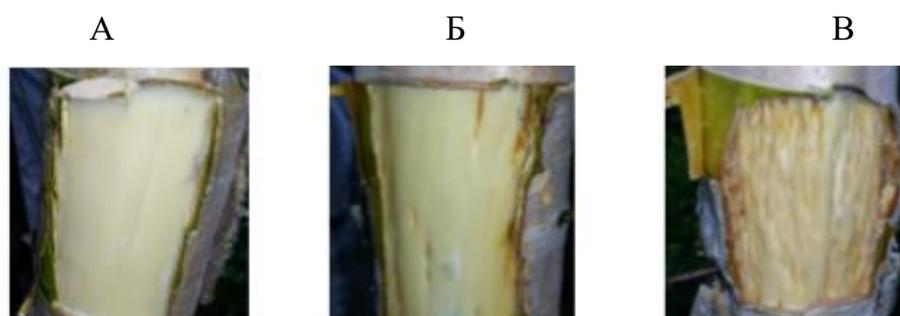


Рис. 4. Растения обычной березы повислой (*B. pendula* var. *pendula*) (А) и карельской березы (*B. pendula* var. *carelica*): безузорчатая (Б) и узорчатая части ствола (В) соответственно.

Для понимания функционирования АОС в целом при формировании структурных аномалий, кроме перекись-утилизирующих ферментов (КАТ и ПО), также рассматривали активность СОД – фермента АОС, стоящего на первом рубеже защиты организма от АФК, и активность ПФО – фермента, который, наряду с ПО, входит в состав основных ферментов вторичного метаболизма растения.

Закономерности изменения активности исследуемых ферментов у растений обычной березы и карельской березы с наличием и отсутствием структурных аномалий в ксилеме

Рассмотрим активность изучаемых ферментов АОС в ксилеме и флоэме исследуемых растений.

В ксилеме активность СОД находилась примерно на одном уровне у всех исследуемых растений, различающихся по структуре древесины, и достигала значений в диапазоне 0.71 – 0.82 усл. ед./мг белка (рис. 5).

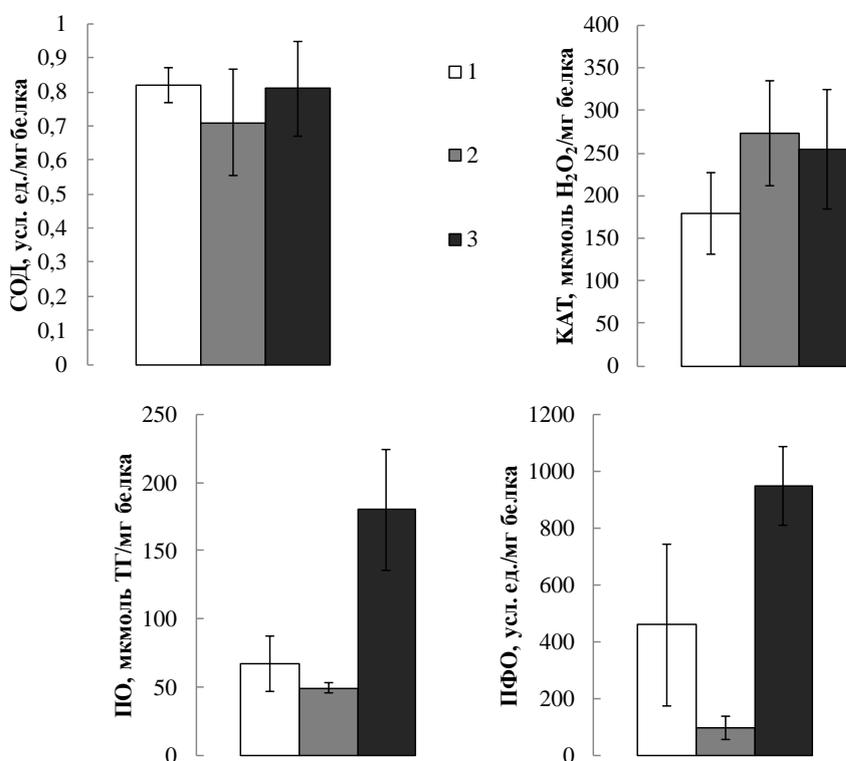


Рис. 5. Активность ферментов АОС в ксилеме у растений обычной березы повислой (*B. pendula* var. *pendula*) (1) и у растений карельской березы (*B. pendula* var. *carelica*) в безузорчатой (2) и узорчатой (3) частях ствола.

Активность КАТ у растений обычной березы повислой была 179 мкмоль H_2O_2 /мг белка, в то время как у растений карельской березы в безузорчатой и узорчатой части ствола 273 и 254 мкмоль H_2O_2 /мг белка соответственно. Значения активности КАТ у растений обычной березы повислой и карельской березы не отличались значимо, однако, наблюдалась тенденция на увеличение активности фермента у растений карельской березы даже в той части ствола, где аномалии внешне не были выражены (рис. 5).

При рассмотрении активности ПО и ПФО выявлены сходные тенденции. Активности обоих ферментов значимо не отличались у растений обычной березы повислой и в безузорчатой части ствола у растений карельской березы. А активность обоих ферментов в узорчатых частях ствола была достоверно более высокой.

Так активность ПО у растений обычной березы повислой и в безузорчатой части ствола карельской березы составила 67 и 49 мкмоль ТГ/мг белка соответственно, в то время как у растений карельской березы в узорчатой части ствола – 180 мкмоль ТГ/мг белка. Активность ПФО у растений обычной березы повислой и в безузорчатой части ствола карельской березы составила 458 и 95 усл. ед./мг белка соответственно, в то время как у растений карельской березы в узорчатой части ствола 947 усл. ед./мг белка (рис. 5).

Закономерности изменения активности исследуемых ферментов у растений обычной березы и карельской березы с наличием и отсутствием структурных аномалий во флоэме

Во флоэме активность СОД проявила тенденцию на увеличение активности в ряду растений обычной березы повислой, безузорчатых участков ствола карельской березы и узорчатых участков; значения активности фермента составили 1.9; 2.4 и 2.9 усл. ед./мг белка соответственно.

Активность КАТ у растений обычной березы повислой была 302 мкмоль H_2O_2 /мг белка, в то время как у растений карельской березы в безузорчатой и узорчатой части ствола 564 и 398 мкмоль H_2O_2 /мг белка соответственно.

Значения активности ПО в ряду растений обычной березы повислой, безузорчатых участков ствола карельской березы и узорчатых участков ствола – 73,

569 и 1009 мкмоль ТГ/мг белка; активность ПФО в том же ряду растений 441, 211 и 583 усл. ед./мг белка соответственно (рис. 6).

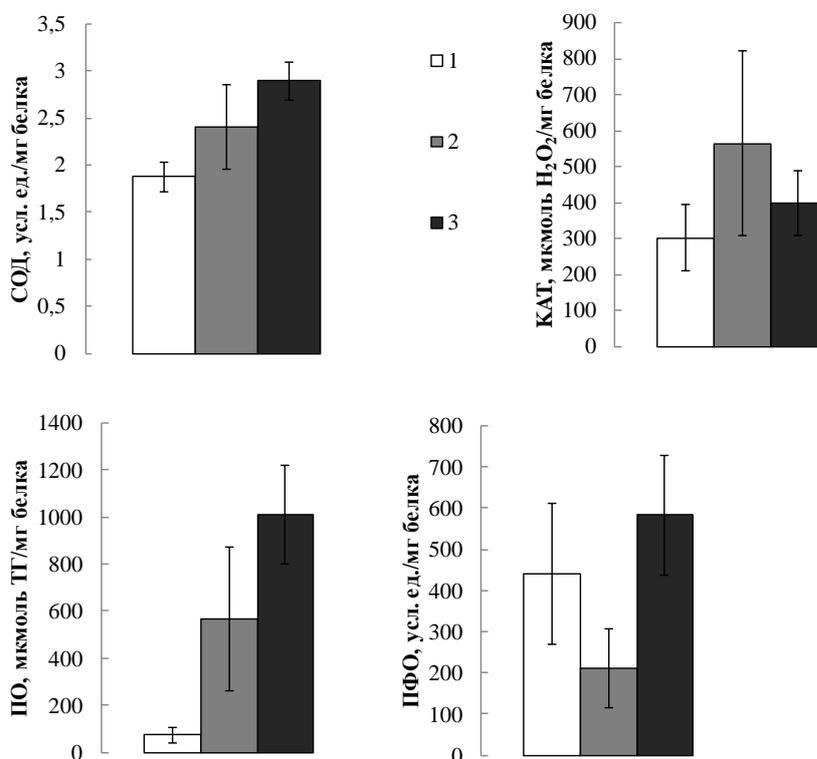


Рис. 6. Активность ферментов АОС во флоэме у растений обычной березы повислой (*B. pendula* var. *pendula*) (1) и у растений карельской березы (*B. pendula* var. *carelica*) в безузорчатой (2) и узорчатой (3) частях ствола.

Так, у изучаемых растений на фоне не отличающейся активности СОД в безузорчатых частях ствола преобладал каталазный путь утилизации образуемой перекиси водорода, а в узорчатых частях перекись расщеплялась при активном участии ПО. Кажется логичным, что этому могла предшествовать высокая активность СОД в узорчатых частях ствола у карельской березы, при участии которой активно бы образовывалась перекись водорода, однако этого не происходило. Возможно, причина тому, единство буферной системы распределения кислорода, как субстрата реакций СОД и ПФО (Vaughn, Duke, 1984). Поэтому, вероятно, мы наблюдали высокую активность ПФО в узорчатых участках ствола растений карельской березы, которой не предшествовало значительного повышения активности СОД.

Кроме того, высокую активность ПО и ПФО в узорчатых частях ствола растений карельской березы можно связывать с высокой активностью здесь АПИИВ (Галибина и др., 2019). Работа этого фермента приводит к интенсивному образованию гексоз, что коррелирует с накоплением в паренхимных клетках узорчатых растений большого количества липидов, веществ фенольной природы (Барильская, 1978; Новицкая, 2008; Novitskaya, Kushnir, 2006), что и может объяснять здесь высокие значения активностей основных ферментов фенольного метаболизма – ПО и ПФО.

Таким образом, на этапе активного формирования структурных аномалий в безузорчатых участках ствола у растений карельской березы наблюдается преобладание каталазного способа утилизации перекиси водорода. В узорчатых участках ствола утилизация перекиси водорода происходит преимущественно за счет повышения активности ПО. Более того, повышение активности ПФО также является индикатором образования структурных аномалий, так как фермент участвует в метаболизации запасных веществ фенольной природы, которые накапливаются в паренхимных клетках.

Активность ферментов антиоксидантной системы у 25-летних растений карельской березы с разной степенью развития структурных аномалий в период камбиального роста

Выявленные разные метаболические стратегии изучаемых ферментов в безузорчатых и узорчатых частях ствола карельской березы в период активного формирования структурных аномалий свидетельствуют об индикаторной роли изучаемых ферментов в формировании узорчатости.

При рассмотрении нами взрослых растений карельской березы в возрасте 25 лет, произрастающих на лесосеменной плантации, мы встретили среди них растения с разной степенью узорчатости (рис. 7), которую характеризовали баллом от 0 (безузорчатые растения) до 3 (наиболее узорчатые растения), согласно способу диагностики узорчатой текстуры древесины, предложенного В. И. Ермаковым (1986). Отбор образцов проводили в период активного камбиального роста (лето 2016 года) и в период подготовки к камбиальному росту (лето 2017 года).

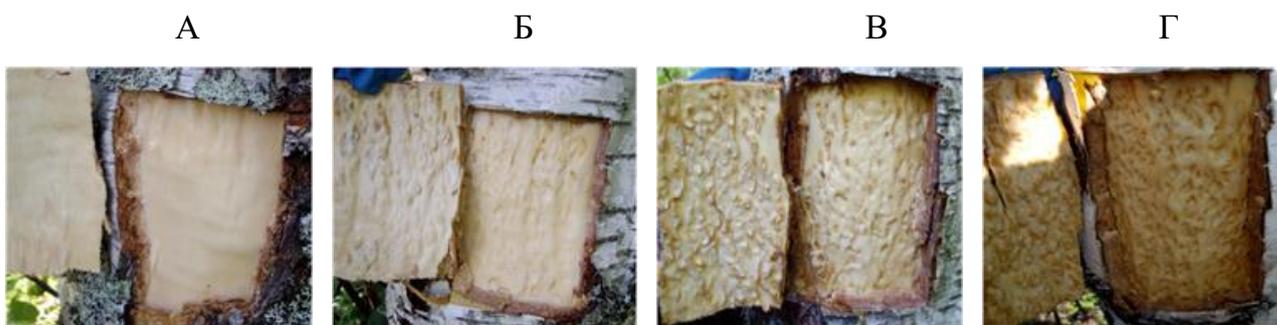


Рис. 7. Растения карельской березы (*B. pendula* var. *carelica*) с разной степенью узорчатости древесины: 0 баллов (А), 1 балл (Б), 2 балла (В), 3 балла (Г).

Отметим, что в предыдущем разделе при изучении метаболических стратегий ферментов АОС мы рассматривали активность только кислых (апопластных) изоформ ПО и ПФО, здесь же мы рассмотрели также и активность цитоплазматических изоформ ПО и ПФО, которые помогли лучше понять цепь внутренних взаимосвязей СОД и КАТ (цитоплазматических ферментов) с основными ферментами фенольного метаболизма ПО и ПФО.

Кислые (апопластные) изоформы ПО указывают на взаимосвязь изучаемых ферментов внутри апопластного пути, который лежит в основе биохимической стратегии узорчатости, за счет преимущественного пути расщепления сахарозы апопластной инвертазой (Галибина и др., 2019).

Активный камбиальный рост

В конце июня 2016 года отбор образцов приходился на период активного камбиального роста. Ткани ксилемы были представлены материнскими клетками ксилемы и наружными слоями прироста ксилемы текущего года. Ткани флоэмы включали камбиальную зону, проводящую флоэму и самые внутренние слои непроводящей флоэмы.

Активность изучаемых ферментов у узорчатых растений в ксилеме, в целом, была выше, чем у безузорчатых, кроме того, в ряду возрастания степени узорчатости у узорчатых растений активность ферментов повышалась.

Так, активность СОД у исследуемых растений находилась в диапазоне 0.19-0.89 усл. ед./мг белка, при этом в ряду растений с 0, 1, 2 и 3 баллами узорчатости

значения активности СОД составили: 0.19, 0.30, 0.53 и 0.89 усл. ед./мг белка соответственно (рис. 8 А).

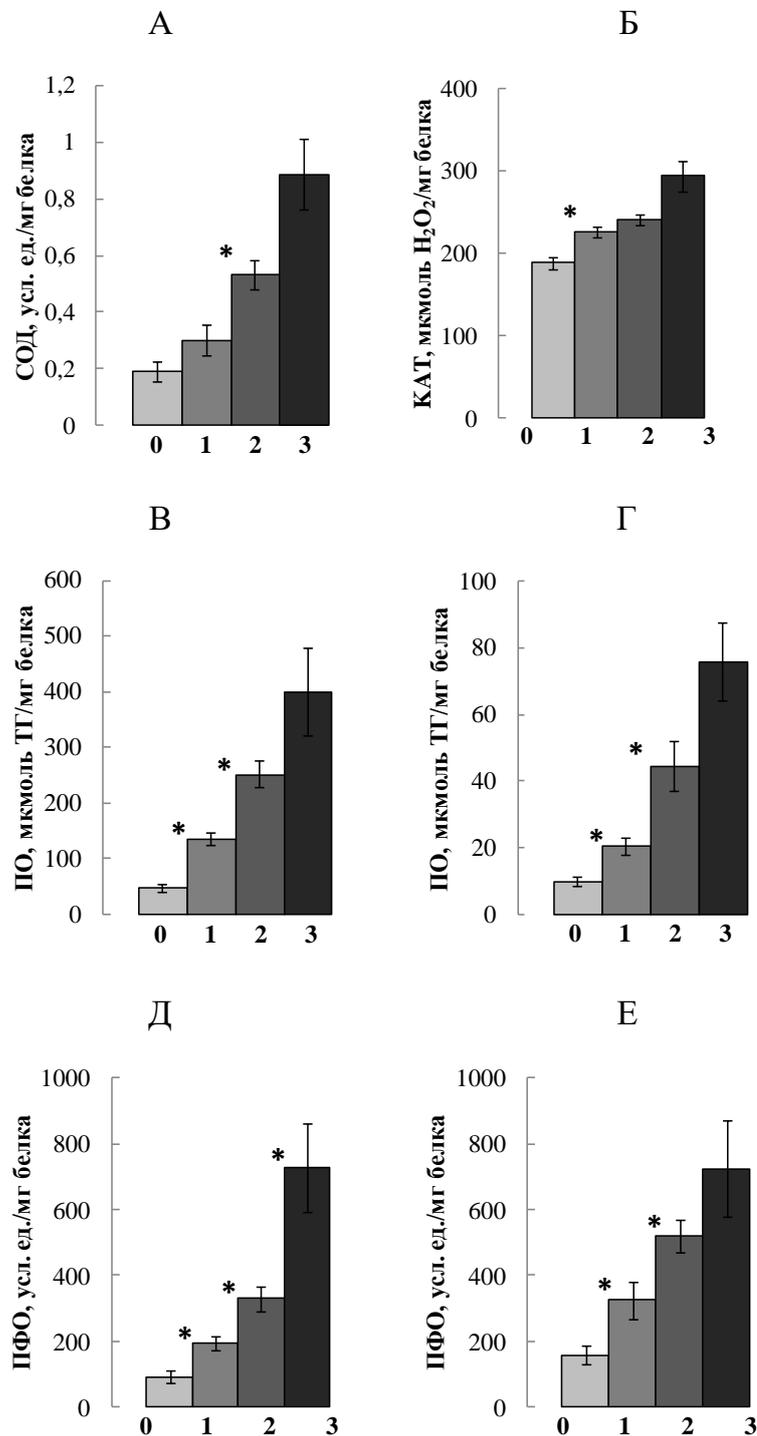


Рис. 8. Активность СОД (А), КАТ (Б), ПО при рН 5 (В) и ПО при рН 7.8 (Г), ПФО при рН 5 (Д) и ПФО при рН 7.8 (Е) в ксилеме у безузорчатых растений карельской березы (*B. pendula var. carelica*) (0 баллов) и с разной степенью узорчатости (от 1 до 3) в период активного камбиального роста. Баллы указаны по оси абсцисс.

Активность КАТ имела значения 188-293 мкмоль H_2O_2 /мг белка. При возрастании балла узорчатости от 0 к 3 активность возрастала, значения активности фермента достигали 188, 225, 240 и 293 мкмоль H_2O_2 /мг белка соответственно (рис 8 Б).

При изучении пероксидазной и полифенолоксидазной активностей обеих изоформ (кислых и цитоплазматических при рН 5 и 7.8 соответственно) обнаружили такую же тенденцию, что у СОД и КАТ.

Активность кислых изоформ ПО составила 46, 135, 251 и 398 мкмоль ТГ/мг белка, а у цитоплазматических изоформ ПО эти значения были равны 10, 20, 44 и 76 мкмоль ТГ/мг белка при возрастании узорчатости (рис. 8 В, Г).

Активность ПФО у безузорчатых растений была соответственно 92 и 158 усл. ед./мг белка при рН 5 и 7.8. У растений с баллом узорчатости 1 – 193 и 324 усл. ед./мг белка, с баллом 2 – 329 и 520 усл. ед./мг белка, у самых узорчатых растений с баллом 3 – 727 и 724 усл. ед./мг белка. Отметим, что наиболее узорчатые растения имели практически одинаковую активность апопластных (кислых) и цитоплазматических изоформ (рис. 8 Д, Е).

Отметим, что в возрасте 12 лет мы еще не наблюдали значимых отличий по активности СОД и КАТ в безузорчатых и узорчатых частях ствола карельской березы, к возрасту 25 лет данные метаболические различия становятся явными.

Активность изучаемых ферментов у узорчатых растений во флоэме повторила обнаруженные в ксилеме тенденции для пероксидазной и полифенолоксидазной активностей, их активность возрастала с увеличением степени узорчатости.

Активность КАТ и СОД показала отличия между безузорчатыми растениями и узорчатыми растениями карельской березы в целом, без разделения узорчатых растений на группы с разной степенью узорчатости. Между растениями карельской березы с разной степенью узорчатости не было обнаружено отличий по активности СОД и КАТ.

Так, активность СОД у безузорчатых растений была 1.8 усл. ед./мг белка, а у узорчатых 2.5 усл. ед./мг белка (рис. 9 А).

Активность КАТ у безузорчатых растений достигла значения 334 мкмоль H_2O_2 /мг белка, а у узорчатых, в свою очередь, 379 мкмоль H_2O_2 /мг белка (рис. 9 Б).

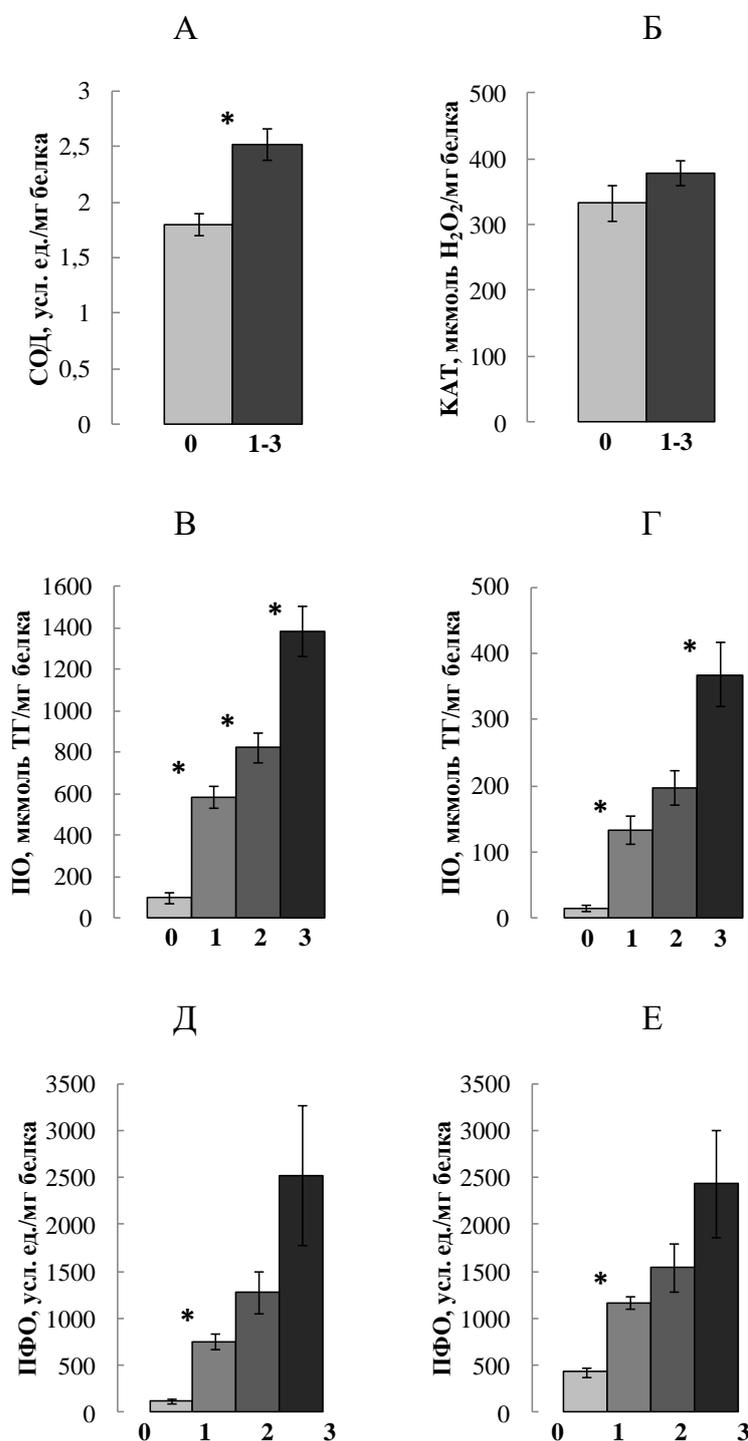


Рис. 9. Активность СОД (А), КАТ (Б), ПО при рН 5 (В) и ПО при рН 7.8 (Г), ПФО при рН 5 (Д) и ПФО при рН 7.8 (Е) во флоэме у безузорчатых растений карельской березы (*B. pendula* var. *carelica*) (0 баллов) и с разной степенью узорчатости (от 1 до 3) в период активного камбиального роста. Баллы указаны по оси абсцисс.

Активность кислых изоформ ПО составила 95, 581, 820 и 1382 мкмоль ТГ/мг белка, для цитоплазматических изоформ ПО эти значения были равны 14, 133, 196 и 367 мкмоль ТГ/мг белка соответственно (рис. 9 Г).

Активность ПФО у безузорчатых растений была соответственно 123 и 429 усл. ед./мг белка при рН 5 и 7.8. У растений с баллом узорчатости 1 – 457 и 1168 усл. ед./мг белка, с баллом 2 – 1276 и 1547 усл. ед./мг белка, у самых узорчатых растений с баллом 3 – 2527 и 2438 усл. ед./мг белка. Отметим, что наиболее узорчатые растения имели практически одинаковую активность апопластных (кислых) и цитоплазматических изоформ (рис. 9 Д, Е). То же было отмечено и в тканях ксилемы (рис. 8 Д, Е).

Период подготовки к камбиальному росту

В период активного камбиального роста активность изучаемых ферментов АОС увеличивалась при возрастании признака узорчатости древесины, особенно четко это прослеживалось при изучении активности ферментов АОС в тканях ксилемы. Мы поставили перед собой задачу рассмотреть, как изменяется активность данных ферментов в период подготовки к камбиальному росту у древесного растения, наблюдается ли та же строгая зависимость активности изучаемых ферментов от степени узорчатости?

В начале июля 2017 года температуры были не достаточны для наступления периода активного камбиального роста. В исследуемый период у растений протекал процесс формирования ранней тонкостенной древесины. Наружные слои прироста ксилемы текущего года четко не идентифицировались.

В период подготовки к активному камбиальному росту активность изучаемых ферментов у узорчатых растений в ксилеме была достоверно выше, чем у безузорчатых, только при рассмотрении активностей ПО и ПФО. Таким образом, можно провести некую параллель с метаболическими стратегиями, выявленными при формировании структурных аномалий в узорчатых участках ствола карельской березы. Напомним, что биохимическую индикаторную роль в разных участках ствола карельской березы с отсутствием и наличием структурных аномалий имели ПО и ПФО, являющиеся основными ферментами фенольного метаболизма.

Так, активность СОД у исследуемых растений находилась в диапазоне 0.42-0.87 усл. ед./мг белка, при этом в ряду растений с 0, 1, 2 и 3 баллами узорчатости

активность фермента составила 0.42, 0.57, 0.62 и 0.87 усл. ед./мг белка соответственно (рис. 10 А).

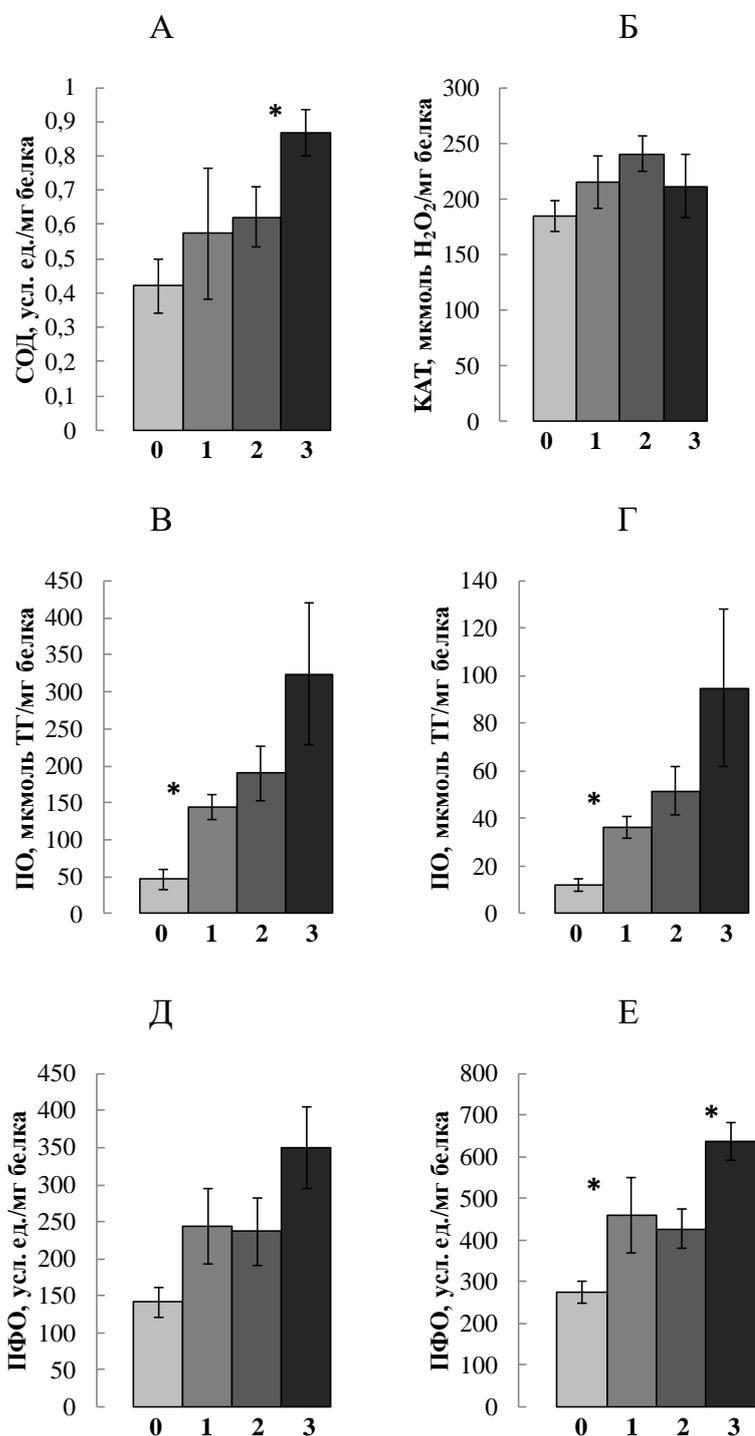


Рис. 10. Активность СОД (А), КАТ (Б), ПО при рН 5 (В) и ПО при рН 7.8 (Г), ПФО при рН 5 (Д) и ПФО при рН 7.8 (Е) в ксилеме у безузорчатых растений карельской березы (*B. pendula var. carelica*) (0 баллов) и с разной степенью узорчатости (от 1 до 3) в период подготовки к камбиальному росту. Баллы указаны по оси абсцисс.

Активность КАТ имела значения 185-241 мкмоль H_2O_2 /мг белка. При возрастании балла узорчатости от 0 к 3 активность фермента достигала значений 185, 215, 241 и 212 мкмоль H_2O_2 /мг белка соответственно (рис 10 Б).

Активность кислых изоформ ПО составила 46, 144, 431 и 724 мкмоль ТГ/мг белка соответственно (рис. 10 В). Для цитоплазматических изоформ ПО эти значения были равны 12, 36, 52 и 95 мкмоль ТГ/мг белка (рис. 10 Г).

Отметим, что значения активности ПО в период подготовки в камбиальному росту были несколько выше, чем непосредственно в период активного камбиального роста.

Активность кислых изоформ ПФО составила 141, 244, 237 и 349 усл. ед./мг белка соответственно (рис. 10 В). Для цитоплазматических изоформ ПФО эти значения были равны 275, 460, 472 и 638 усл. ед./мг белка (рис. 10 Г).

Значения активности ПФО, напротив, по сравнению с ПО, в период подготовки в камбиальному росту несколько ниже, чем в период активного камбиального роста. Отметим, что наиболее узорчатые растения имели более высокую активность цитоплазматических изоформ (рис. 10 Д, Е).

Ферменты антиоксидантной системы – возможные биохимические маркеры аномальной древесины

Во время камбиального роста мы обнаружили зависимость возрастания активности изучаемых ферментов от степени узорчатости древесины. Наиболее четко эта зависимость проявлялась в период активного камбиального роста, по сравнению с периодом формирования тонкостенной древесины, в тканях ксилемы.

Регрессионный анализ показал, что активность всех изучаемых ферментов в ксилеме зависела от степени узорчатости древесины в период активного камбиального роста.

С увеличением степени узорчатости возрастала активность ферментов АОС. В период подготовки к камбиальному росту корреляция наблюдалась только для СОД и ПФО. В таблице 1 приведены R-квадрат и уровень значимости.

Таблица 1. Результаты регрессионного анализа, отражающего зависимость активности изучаемых ферментов в ксилеме от степени узорчатости: в период активного камбиального роста (А), в период подготовки к камбиальному росту (Б). Указаны R-квадрат и уровень значимости.

А

	СОД	КАТ	ПО рН 5	ПО рН 7.8	ПФО рН 5	ПФО рН 7.8
R-квадрат	0.947	0.957	0.935	0.958	0.894	0.998
Уровень значимости	0.027	0.022	0.033	0.021	0.055	0.001

Б

	СОД	ПО рН 5	ПО рН 7.8
R-квадрат	0.902	0.940	0.934
Уровень значимости	0.033	0.020	0.022

В тканях флоэмы в период активного камбиального роста зависимость активности ферментов от степени узорчатости была обнаружена только для ПО и ПФО. В таблице 2 приведены R-квадрат и уровень значимости.

Таблица 2. Результаты регрессионного анализа, отражающего зависимость активности изучаемых ферментов в ксилеме от степени узорчатости в период активного камбиального роста. Указаны R-квадрат и уровень значимости.

	ПО рН 5	ПО рН 7.8	ПФО рН 5	ПФО рН 7.8
R-квадрат	0.979	0.969	0.958	0.979
Уровень значимости	0.010	0.016	0.021	0.011

Единая система активности ферментов АОС и их взаимосвязь между собой

Помимо зависимости активности ферментов от степени узорчатости древесины с использованием корреляционного анализа в период активного камбиального роста была установлена сильная положительная корреляционная взаимосвязь активности изучаемых ферментов АОС между собой в тканях

ксилемы. В тканях флоэмы сильная положительная корреляционная взаимосвязь обнаружена только между активностями ПО и ПФО. Средняя по силе корреляционная связь обнаружена между СОД и основными ферментами фенольного метаболизма (ПО и ПФО), то же можно заключить и о взаимосвязи КАТ с ПО и ПФО. Между СОД и КАТ взаимосвязи не обнаружено. В таблицах 3 и 4 приведены коэффициенты корреляции, отражающие взаимосвязь активностей ферментов в тканях ксилемы и флоэмы соответственно.

Таблица 3. Результаты корреляционного анализа, отражающего взаимосвязь активности изучаемых ферментов в ксилеме между собой в период активного камбиального роста. Указаны коэффициенты корреляции.

	СОД	КАТ	ПО рН 5	ПО рН 7.8	ПФО рН 5
КАТ	0.975				
ПО рН 5	0.968	0.916			
ПО рН 7.8	0.9993	0.973	0.976		
ПФО рН 5	0.991	0.975	0.926	0.985	
ПФО рН 7.8	0.983	0.980	0.974	0.987	0.957

Таблица 4. Результаты корреляционного анализа, отражающего взаимосвязь активности изучаемых ферментов во флоэме между собой в период активного камбиального роста. Указаны коэффициенты корреляции.

	СОД	КАТ	ПО рН 5	ПО рН 7.8	ПФО рН 5
КАТ	-0.022				
ПО рН 5	0.599	0.454			
ПО рН 7.8	0.577	0.417	0.998		
ПФО рН 5	0.518	0.403	0.991	0.997	
ОПФО рН 7.8	0.592	0.451	0.99994	0.9987	0.992

В период подготовки растений к активному камбиальному росту в ксилеме была установлена сильная положительная корреляционная только между активностями ПО и ПФО, а также между СОД и основными ферментами фенольного метаболизма (ПО и ПФО). Средняя по силе корреляционная связь

обнаружена между КАТ и основными ферментами фенольного метаболизма, то же можно заключить и о взаимосвязи СОД и КАТ. В таблице 5 приведены коэффициенты корреляции, отражающие взаимосвязь активности ферментов.

Таблица 5. Результаты корреляционного анализа, отражающего взаимосвязь активности изучаемых ферментов в ксилеме между собой в период подготовки к камбиальному росту. Указаны коэффициенты корреляции.

	СОД	КАТ	ПО рН 5	ПО рН 7.8	ПФО рН 5
КАТ	0.414				
ПО рН 5	0.958	0.474			
ПО рН 7.8	0.997	0.432	0.977		
ПФО рН 5	0.983	0.441	0.896	0.969	
ПФО рН 7.8	0.976	0.402	0.874	0.957	0.998

Приведенные результаты свидетельствуют о взаимосвязанной каскадной работе ферментов АОС при разных сценариях ксилогенеза у карельской березы, что подтверждается результатами корреляционного анализа (таблицы 3-5). Особенно ярко это прослеживалось в тканях ксилемы в период активного камбиального роста, где была обнаружена корреляция активности всех изучаемых ферментов при возрастании признака узорчатости (таблицы 1, 3). Во флоэме это касалось только основных ферментов вторичного метаболизма – ПО и ПФО обеих изучаемых (апопластных и цитоплазматических) изоформ (таблицы 2, 4). Эти зависимости были выявлены именно в период активного камбиального роста.

Отметим, что количественного определения содержания фенольных соединений и АФК в исследуемых тканях не было проведено, однако, такая взаимосвязанная работа изучаемых ферментов, особенно в период активного камбиального роста, позволяет предположить, что и потоки субстратов фенольной природы и АФК также могут быть упорядоченно распределены, и нарушения баланса их превращений внутри АОС, вероятно, не происходит. Это позволяет нам косвенно делать вывод и об участии АФК в обсуждаемых процессах, что отражено на рисунке 11.

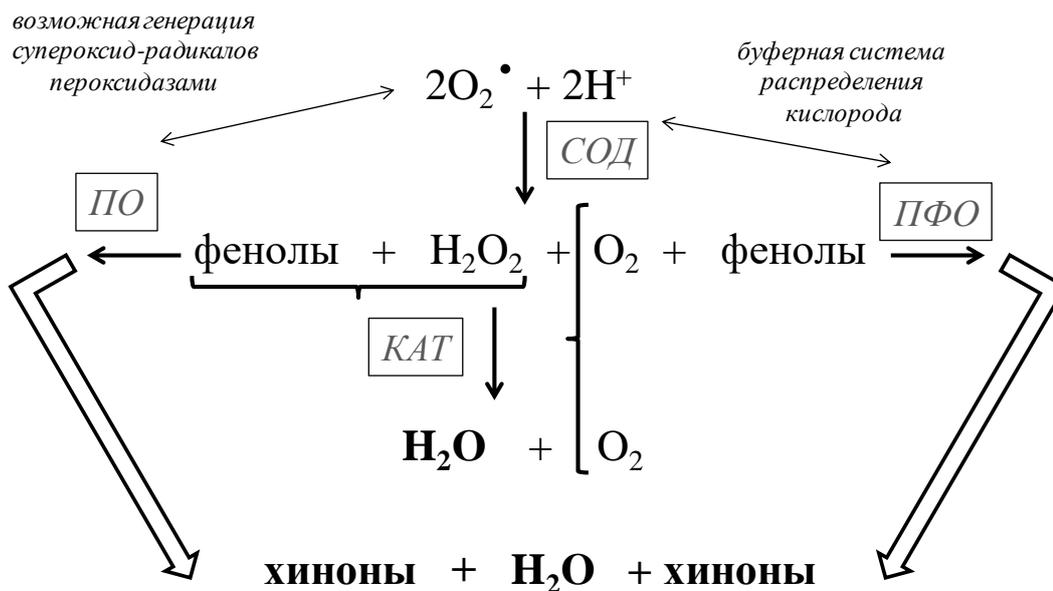


Рис. 11. Взаимосвязанная каскадная работа ферментов АОС.

Отметим, что АФК на определенном контролируемом уровне всегда присутствуют в клетках, участвуют во многих метаболических процессах, вовлечены в нормальную жизнедеятельность растительного организма, участвуют в сигнальных путях растения (Apel, Hirt, 2004; Mittler, 2017). АФК задействованы в синтезе веществ фенольной и углеводной природы, биосинтезе лигнина (Полесская и др., 2004; Гарифзянов и др., 2011; Креславский и др., 2012; Колупаев, 2016; Passardi et al., 2004; Ros-Barceló, Gómez Ros, 2009).

Так, в результате супероксиддисмутазной реакции происходит образование перекиси водорода, что в дальнейшем активизирует работу КАТ и ПО. Согласованная работа СОД, КАТ и ПО происходит за счет поддержания баланса между супероксидными радикалами и перекисью водорода (Прадедова и др., 2011; Mittler et al., 2004; Jajic et al., 2015). С другой стороны, ПО, выполняя оксидазные функции, может способствовать генерации супероксидных радикалов (Минибаева, Гордон, 2003; Шарова, Медведев, 2017; Passardi et al., 2004).

Кроме того, клетки паренхимы характеризуются активными дыхательными процессами, следовательно, в электрон-транспортной сети образуется большое количество супероксидных радикалов (Гарифзянов и др., 2011; Jajic et al., 2015), которые могут способствовать увеличению активности СОД. Следовательно, одна из вероятных причин параллельного возрастания активности СОД и степени

узорчатости – усиление процессов паренхиматизации. Тогда становится понятным, почему в клетках паренхимы может активно образовываться перекись водорода (Ros-Barceló, 2005).

Высокая активность ПО и ПФО не определяется только лишь присутствием АФК, необходимо наличие фенольных соединений, которые также выступают в качестве субстратов окислительных пероксидазных и полифенолоксидазных реакций (Запрометов, 1993; Srivastava, van Huyste, 1977; Maksimović et al., 2008). В клетках паренхимы содержится большое количество фенолов (Mace et al., 1972), следовательно, есть необходимые субстраты для запуска ПО и ПФО. Отметим, что во флоэме активности ПО и ПФО были значительно выше, чем в ксилеме, что, вероятно, можно связать с бóльшим количеством фенольных соединений во флоэме у древесных растений (Антонова, Стасова, 2006, 2008).

КАТ, ПО и ПФО связаны друг с другом посредством молекулярного кислорода, как продукта каталазной реакции, и фенолов растительного организма, а также перекиси водорода, генерируемой деятельностью СОД (Wang et al., 1991; Sheptovitsky, Brudvig, 1996). Более того, СОД и ПФО создают единую буферную систему распределения молекулярного кислорода с участием фотосистемы I (Sherman et al., 1991), а перекись водорода может являться сигнальной молекулой для запуска генов ПФО (Thiруarong et al., 2004). Хиноны, являясь продуктами реакции ПО и ПФО, образуют семихинонные радикалы, которые ковалентно присоединяются к другим молекулам и генерируют большое количество супероксидных радикалов, что обеспечивает взаимосвязь ПФО и СОД (Steffens et al., 1994; Thiруarong et al., 2004).

В чем же причина столь четко направленного и взаимосвязанного усиления роли ферментов АОС при формировании узорчатости? В исследованиях, проводимых ранее в ИЛ КарНЦ РАН, было показано, что при образовании нормальной древесины (у безузорчатых растений) метаболизация сахарозы, как основной транспортной формы сахаров (Новицкая и др., 2015), происходит при высокой активности сахарозосинтазы (СС), работа которой контролируется геном *SUS1*. Мембраносвязанная форма СС входит в состав целлюлозосинтазного комплекса, где УДФ-глюкоза вовлекается в синтез целлюлозы, содержание

которой выше у безузорчатых растений (Галибина и др., 2015а, 2016а; Мощенская и др., 2017, 2018).

Образование узорчатой древесины, которое обусловлено переходом на путь паренхиматизации, сопровождается расщеплением сахарозы апопластной инвертазой (АпИнв), а в образующихся паренхимных клетках может накапливаться большое количество запасных продуктов (Галибина и др., 2015б, 2016б). Кроме того, и содержание целлюлозы в аномальных тканях ниже (Мощенская и др., 2017, 2018).

Возрастание активности АпИнв сопровождается увеличением содержания свободных гексоз, которые, включаясь в пентозофосфатный путь и цикл Кребса (Донцов и др., 2006; Savidge, 1996; Couee et al., 2006; Wellen, Thompson, 2010; Borges et al., 2017), участвуют в синтезе АФК и фенольных соединений, запуская цепь реакций ферментов АОС (Галибина и др., 2013, 2016а; Никерова и др., 2016, 2017; 2019; Никерова, Галибина, 2017). Кроме того, гексозы усиливают синтез запасных метаболитов, что способствует превращению камбиальных производных в клетки запасной паренхимы, которые составляют структурную основу узорчатой древесины (Новицкая, 2008). Глюкоза, являясь сигнальной молекулой, может инициировать активность ферментов АОС (Hu et al., 2012), а также непосредственно взаимодействовать с АФК, образуя субстраты пероксидазного окисления (Синькевич и др., 2009).

Так, можно заключить, что в тканях ствола узорчатых растений карельской березы в период камбиального роста возрастание пероксидазной активности в ксилеме было тесно связано с избытком гексоз, образующихся при расщеплении сахарозы по инвертазному пути. Изменение соотношения активностей СС и АпИнв лежит в основе большого разнообразия растений карельской березы по степени узорчатости древесины (Галибина и др., 2016б; 2019; Галибина, 2018).

Ранее было показано, что в тканях узорчатой ксилемы выше жесткость структуры клеточной стенки, по сравнению с прямослойной древесиной, за счет увеличения доли компонентов фенольной природы, как в составе лигнина, так и в виде поперечных диферуловых мостиков (Галибина, Теребова, 2014). Намного более высокая активность ПО и ПФО, вовлеченных в биосинтез лигнина, в узорчатых тканях, может быть, как раз была обусловлена активными процессами

лигнификации (Boudet et al., 2003; Passardi et al., 2004; Ros-Barceló et al., 2006; Yang et al., 2010). Высокоактивные хиноны могут модифицировать и сшивать большое количество клеточных молекул с получением полимеров (Ortega-Garcia, Peragon, 2009). При этом одревеснение клеточных стенок трахеальных и волокнистых элементов происходит с участием клеток паренхимы: синтезирующиеся в них монолигнолы экспортируются в клеточную стенку соседних одревесневающих клеток (Pickett-Heaps, 1968; McCann et al., 2001; Mellerowicz et al., 2001, Mellerowicz, Sundberg, 2008; Schuetz et al., 2013).

При изучении сезонной динамики активности ПО и КАТ у растений обычной березы повислой и карельской березы было показано, что в течение всего сезона в ксилеме активность АпИ_{нв} коррелировала с активностью ПО у изучаемых растений (Никерова и др., 2019).

Все эти факты позволяют использовать активность ферментов АОС в качестве диагностических маркеров для обнаружения признаков узорчатости (Галибина и др., 2016а, Никерова и др., 2016; 2019а; 2019б; Никерова, Галибина, 2017). На основании данных исследований нами был предложен способ количественной экспресс-диагностики «узорчатости» древесины карельской березы по определению активности гваякол-пероксидазы в ксилеме (Галибина, Никерова, 2016).

Во флоэме мы обнаружили корреляцию со степенью узорчатости только для основных ферментов вторичного метаболизма – ПО и ПФО. Кроме того, не присутствовало и значимой взаимосвязи во внутренней сети взаимодействия ферментов АОС, подобно обнаруженной в ксилеме. Отметим, что у наиболее узорчатых растений даже в период подготовки к активному камбиальному росту происходило некоторое снижение активности КАТ параллельно с повышением ПО, что можно объяснить компенсаторной ролью (Fernández-García et al., 2004; Chen et al., 2006). Понижение активности каких-либо компонентов должно компенсироваться повышением каких-либо других (Wilekens et al., 1997).

Кроме того, вероятно, у наиболее узорчатых растений может происходить «запрос» на отток перекиси водорода активно лигнифицирующимися тканями ксилемы, да и более низкие количественные значения перекись-утилизирующих ферментов, возможно, говорят о том, что перекись водорода, наряду с другими

АФК, расходуется на синтез лигнина (Osion, Varner, 1993; Polle et al., 1994; Ros-Barceló, 2005; Michalak, 2006; Ros-Barceló, Gómez Ros, 2009). Есть данные, что сверхэкспрессия гена СОД может приводить к активной лигнификации (Gill et al., 2010).

Поэтому мы предполагаем, что в ксилеме пусковым механизмом скоординированного действия ферментов АОС при увеличении признака узорчатости является высокая активность АпИив. А во флоэме у карельской березы в период камбиальной деятельности скоординированы активные ростовые процессы (Галибина и др., 2016б), характеризующиеся интенсивными свободно-радикальными реакциями, а активный рост может коррелировать с высоким содержанием фенольных соединений (Загоскина и др., 2018), которые могут служить субстратами реакций ПО и ПФО.

В ксилеме и апопластные изоформы ферментов (ПО и ПФО), и цитоплазматические (СОД, КАТ, ПО и ПФО) образуют единую сеть. Во флоэме же координация происходит на уровне основных ферментов вторичного метаболизма – ПО и ПФО, что обуславливается, вероятно, бóльшей доступностью фенольных соединений. Обращает на себя внимание высокая активность обеих изучаемых изоформ (кислых и цитоплазматических) ПФО у наиболее узорчатых растений карельской березы и в ксилеме, и во флоэме. Активизация какого-либо процесса, в данном случае, процесса паренхиматизации, вероятно, заставляет эффективно работать более широкий спектр изоформ ферментов (Нимаева и др., 2014).

Таким образом, формирование узорчатости тесно сопряжено с процессами вторичного метаболизма у древесного растения, что отражается в повышении активности ферментов АОС. Полученные данные показали возможность использования ферментов АОС в качестве биохимических маркеров узорчатости в период активного камбиального роста.

Ферменты антиоксидантной системы – индикаторы аномального ксилогенеза в раннем онтогенезе

Ферменты АОС вовлечены в регуляцию метаболизма на протяжении всего онтогенеза растения (Жукова и др., 1996; Половникова, Воскресенская, 2008; Jakovljevic et al., 2013; Iqbal et al., 2017), поэтому их изучение необходимо на

разных его стадиях. Кроме того, интересно было бы понимать, как ведут себя изучаемые ферменты АОС, являющиеся во взрослом состоянии биохимическими маркерами структурных аномалий у березы повислой, в раннем онтогенезе. Сохраняются ли обнаруженные биохимические закономерности, когда внешних признаков еще нет? Кроме того, интересно, может ли активность изучаемых ферментов в листовом аппарате, который связан со стеблем ДАО, являться индикатором для определения узорчатости на ранних стадиях онтогенеза, а лист – тест-объектом? Для выяснения этих вопросов мы провели исследование активности ферментов АОС на начальных этапах онтогенеза у 6 и 11-недельных сеянцев обычной и карельской березы.

Морфометрические показатели разновозрастных сеянцев

В возрасте 6 недель сеянцы обычной березы повислой и карельской березы не отличались внешне (рис. 12 А, Б). К возрасту 11 недель у сеянцев обычной березы повислой ростовые процессы происходили более интенсивно по сравнению с сеянцами карельской березы (рис. 12 В, Г).

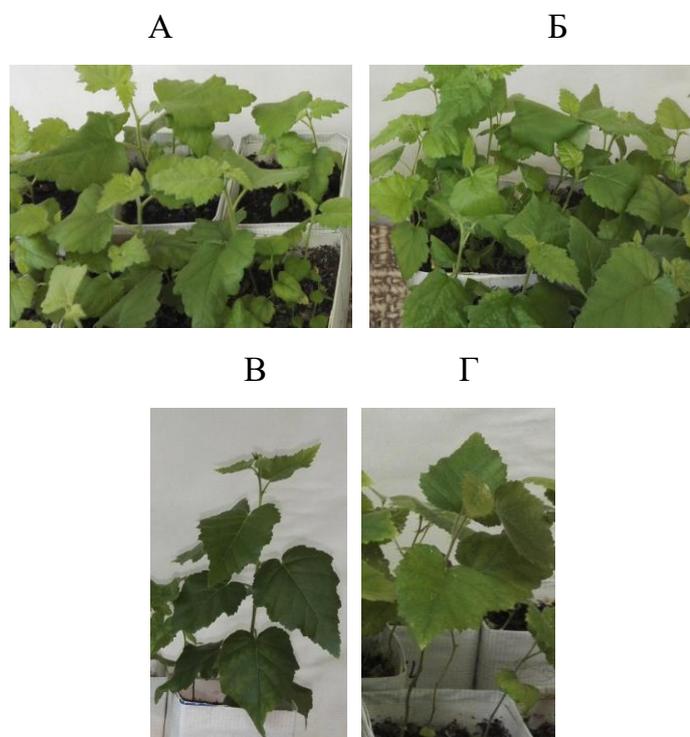


Рис. 12. Сеянцы обычной березы повислой (*B. pendula* var. *pendula*) (А, В) и карельской березы (*B. pendula* var. *carelica*) (Б, Г) в возрасте 6 (А, Б) и 11 (В, Г) недель.

Высота сеянцев обычной березы составила в среднем 6.8 см, а у карельской березы – 4.6 см. Массы листьев у сеянцев обычной березы повислой и карельской березы были равны 0.29 г и 0.15 г соответственно. Такая же тенденция была обнаружена и для массы стебля: 0.08 г – у сеянцев обычной березы повислой, 0.04 г – у сеянцев карельской березы (рис. 13).

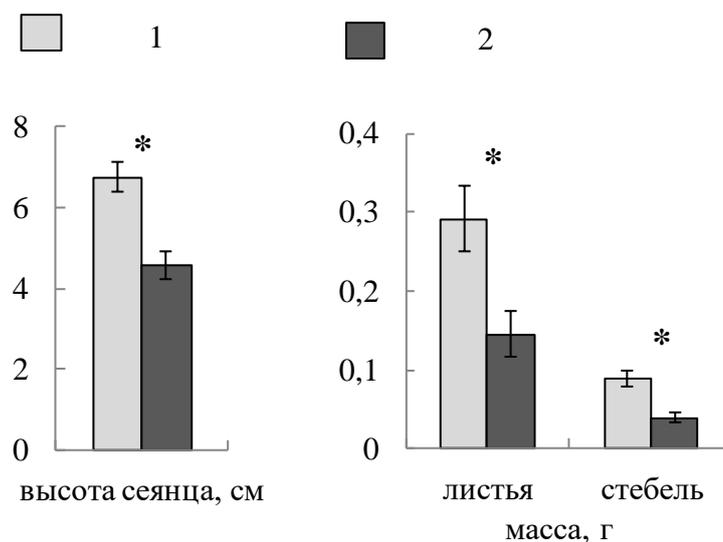


Рис. 13. Морфометрические показатели 11-недельных сеянцев обычной березы повислой (*B. pendula* var. *pendula*) (1) и карельской березы (*B. pendula* var. *carelica*) (2).

Активность ферментов АОС у разновозрастных сеянцев в стебле и листовом аппарате

При изучении активности СОД обнаружены сходные метаболические стратегии у обеих форм сеянцев березы повислой. Активность фермента в стебле была выше у сеянцев карельской березы обоих возрастов.

Так, значения активности СОД в стебле у сеянцев карельской березы и обычной березы повислой, соответственно, составили 1 и 0.2 усл. ед./мг белка в возрасте 6 недель; на 11 неделях – 2.1 и 1.8 усл. ед./мг белка.

В листе, напротив, активность СОД была незначительно выше у сеянцев обычной березы. Значения активности достигли 1.5 и 1.3 усл. ед./мг белка в возрасте 6 недель; 1.7 и 1.6 усл. ед./мг белка – у 11-недельных сеянцев обычной березы повислой и карельской березы соответственно (рис. 14 А).

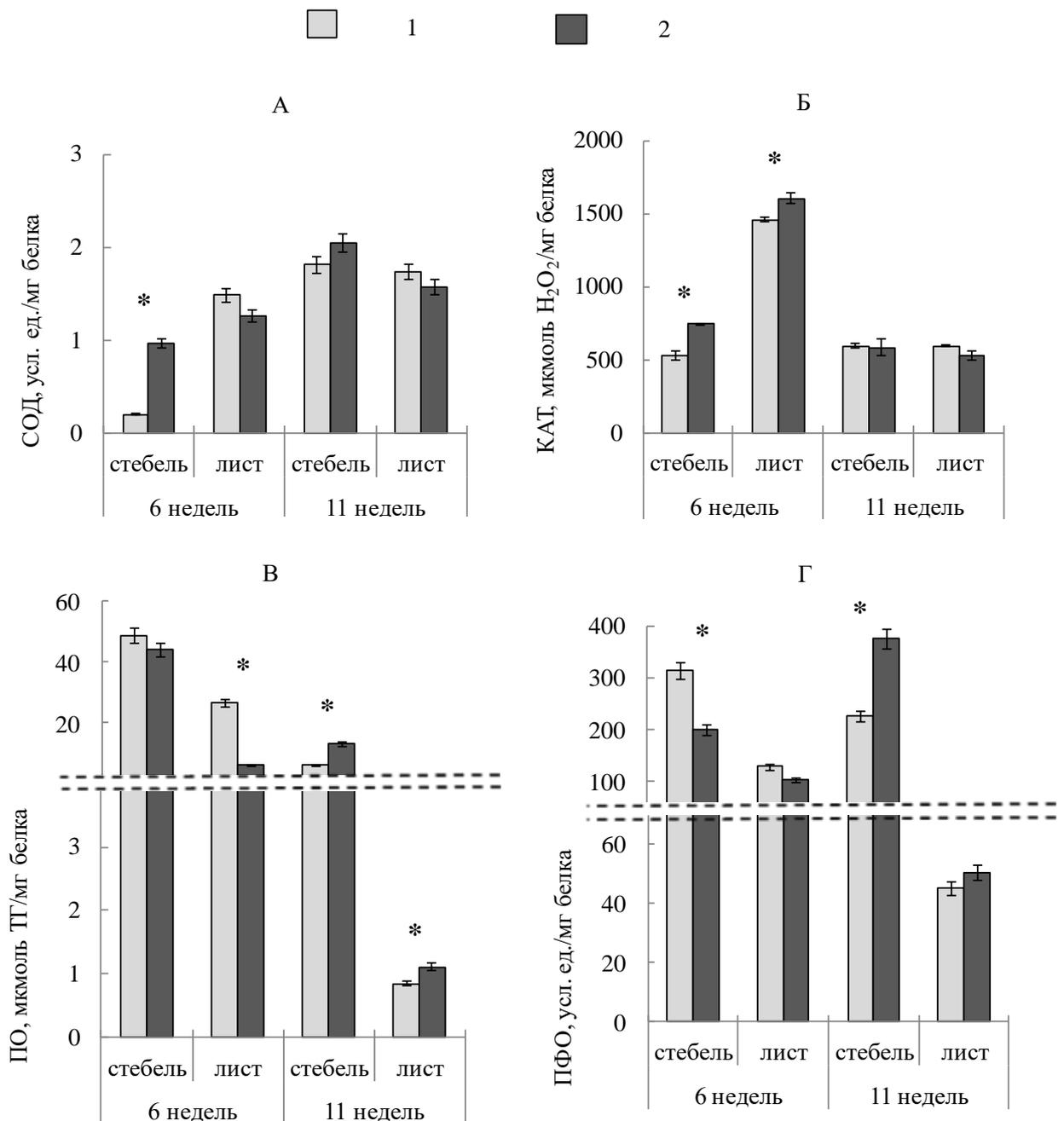


Рис. 14. Активность СОД (А), КАТ (Б), ПО (В) и ПФО (Г) в стебле и листе у 6- и 11-недельных сеянцев обычной березы повислой (*B. pendula var. pendula*) (1) и карельской березы (*B. pendula var. carelica*) (2).

Активность КАТ, в целом, показала высокие значения в листе и стебле у 6-недельных сеянцев, причем у сеянцев карельской березы активность КАТ была немного выше. Так, активность КАТ в листе в возрасте 6 недель была 1458 мкмоль H₂O₂/мг белка у сеянцев обычной березы повислой, 1605 мкмоль H₂O₂/мг белка у сеянцев карельской березы. В стебле – 532 мкмоль H₂O₂/мг белка и 747 мкмоль H₂O₂/мг белка соответственно. 11-недельные сеянцы показывали снижение

активности КАТ, которое особенно явно наблюдалось в листьях. Так, активность КАТ в листе была 593 мкмоль H_2O_2 /мг белка и 532 мкмоль H_2O_2 /мг белка у обычной и карельской березы соответственно. В стебле – 594 мкмоль H_2O_2 /мг белка и 585 мкмоль H_2O_2 /мг белка соответственно (рис. 14 Б).

У ПО наблюдалась перестройка при переходе от возраста 6 к 11 неделям. Сначала более высокая активность этого фермента наблюдалась у 6-недельных сеянцев обычной березы повислой, а к 11 неделям ситуация менялась в обратном направлении.

Так, активность ПО в листе в возрасте 6 недель была 27 мкмоль ТГ/мг белка у сеянцев обычной березы повислой и 6.4 мкмоль ТГ/мг белка у сеянцев карельской березы. В стебле – 49 мкмоль ТГ/мг белка и 44 мкмоль ТГ/мг белка соответственно. В возрасте 11 недель активность ПО в листе составила 0.9 мкмоль ТГ/мг белка и 1.1 мкмоль ТГ/мг белка у обычной и карельской березы соответственно. В стебле – 6.2 мкмоль ТГ/мг белка и 13 мкмоль ТГ/мг белка соответственно у изучаемых форм (рис. 14 В).

При изучении ПФО обнаружена аналогичная ПО тенденция. Так, активность ПФО в листе в возрасте 6 недель была 129 усл. ед./мг белка у сеянцев обычной березы повислой, 104 усл. ед./мг белка у сеянцев карельской березы. В стебле 314 усл. ед./мг белка и 210 усл. ед./мг белка соответственно. В возрасте 11 недель активность ПФО в листе 45 усл. ед./мг белка и 51 усл. ед./мг белка у обычной и карельской березы соответственно. В стебле – 227 усл. ед./мг белка и 375 усл. ед./мг белка соответственно (рис. 14 Г).

Отметим явное перераспределение активностей изучаемых ферментов. Так, в стебле 6-недельных сеянцев у растений карельской березы, по сравнению с обычной березой, были выше активности СОД и КАТ и ниже активности ПО и ПФО.

В стебле у 11-недельных сеянцев карельской березы распределение активностей ферментов АОС аналогично взрослым растениям в период активного камбиального роста. А именно, растения с предполагаемыми в будущем признаками структурных аномалий имели более высокие активности изучаемых ферментов (СОД, ПО и ПФО). Получается, что в стебле 11-недельных сеянцев карельской березы уже наблюдается переориентация метаболических процессов на

биохимическом уровне. Кроме того, у 11-недельных растений обычной березы понижение активности ферментов АОС коррелирует с более активными ростовыми процессами (рис. 13, 14). Предполагается, что высокие значения активности ПО и ПФО могут понижать интенсивность ростовых процессов (Laukkanen et al., 1999).

Таким образом, показано, что ферменты АОС могут быть биохимическими маркерами нормального и аномального ксилогенеза у карельской березы уже на ранних стадиях онтогенеза, когда видимые признаки аномальной древесины, конечно, отсутствуют. Протекание процессов нормального ксилогенеза, связанного с образованием прямослойной древесины, сопряжено с более интенсивными ростовыми процессами. Аномальный ксилогенез сопряжен с активными процессами вторичного метаболизма, что подтверждается более высокой активностью ферментов АОС у сеянцев карельской березы.

Активность ферментов АОС в связи с донорно-акцепторными отношениями листового аппарата и акцепторных тканей

Использование активности ферментов АОС в листовом аппарате как признак ранней диагностики узорчатости

Поиск критериев, позволяющих отличить карельскую березу от других форм уже на ранних этапах онтогенеза, когда еще нет видимых признаков аномалий, относится к числу перспективных задач, требующих решения.

Описанные ранее результаты исследования дают основания для возможного использования активности АОС в качестве биохимических маркеров, а листовой аппарат, который связан ДАО с тканями ствола – в качестве тест-объекта для диагностики узорчатости. Для верификации высказанной гипотезы мы провели исследование активности перекись–расщепляющих ферментов (КАТ и ПО) у 10-месячных сеянцев обычной березы повислой и карельской березы на разных стадиях развития листа (рис. 15).

Во-первых, отметим обнаруженные морфологические отличия: более облиственный листовой аппарат сеянцев карельской березы, по сравнению с обычной березой повислой, и равномерность встречаемости листьев разных фаз у

сеянцев карельской березы в связи с интенсивным образованием молодых листьев II и особенно I фаз.

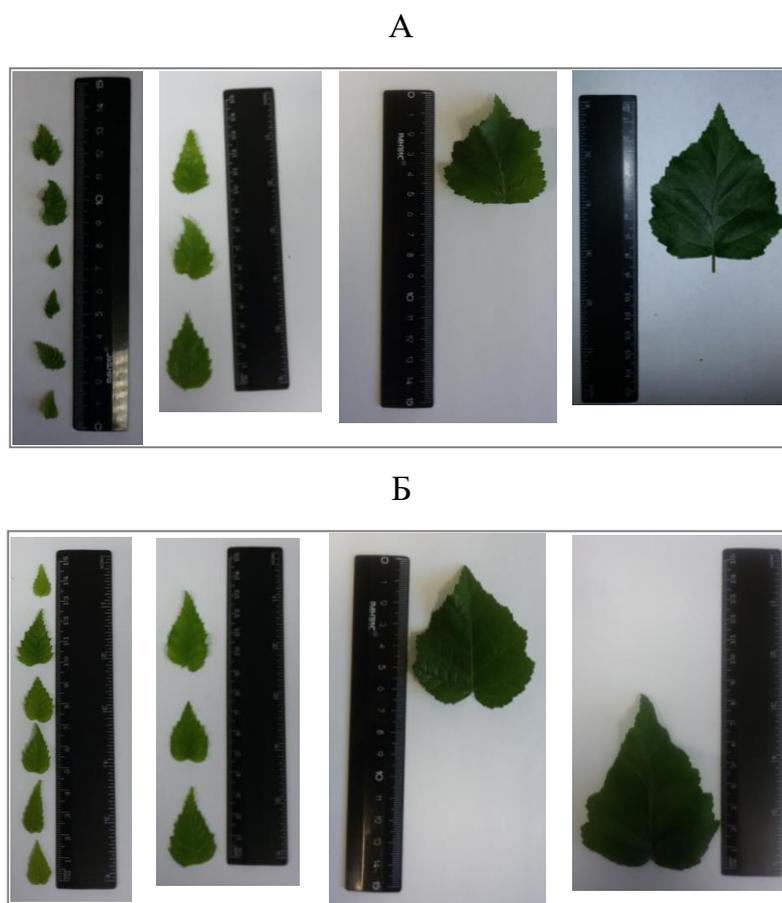


Рис. 15. Внешний вид листьев сеянцев обычной березы повислой (*B. pendula* var. *pendula*) (А) и карельской березы (*B. pendula* var. *carelica*) (Б) I - IV фаз. I фаза – лист 1-2 см, II фаза – лист 3-4 см, III фаза – лист 5-6 см, IV фаза – лист 7-8 см.

Во-вторых, биохимические закономерности поведения изучаемых ферментов у разных форм березы повислой отличались. Общим было то, что у обеих изучаемых форм березы с увеличением длины листовой пластинки активность КАТ в листьях возрастала. У сеянцев обычной березы повислой она изменялась в диапазоне от 93 до 909, а у карельской березы – от 26 до 638 мкмоль H_2O_2 /мг белка (рис. 16).

Отметим, что активность КАТ в листьях обычной березы на всех фазах развития была выше, чем у сеянцев карельской березы. При этом увеличение каталазной активности от молодого к зрелому листу у карельской березы происходило более динамично.

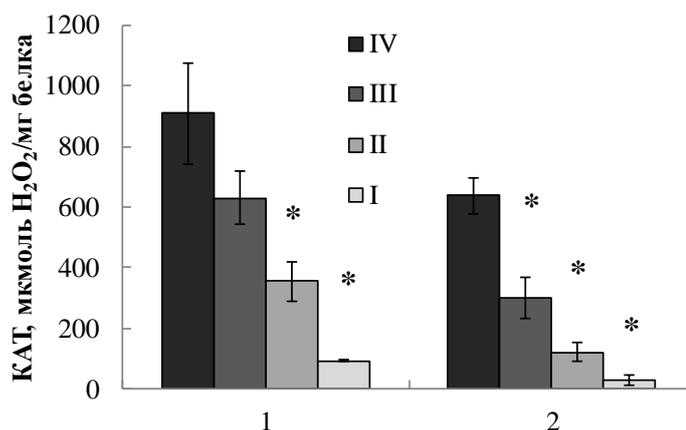


Рис. 16. Активность КАТ (мкмоль H_2O_2 /мг белка) в листьях, отличающихся стадией развития (I-IV), у 10-месячных сеянцев обычной березы повислой (*B. pendula* var. *pendula*) и карельской березы (*B. pendula* var. *carelica*). I фаза – лист 1-2 см, II фаза – лист 3-4 см, III фаза – лист 5-6 см, IV фаза – лист 7-8 см.

Рассмотрим закономерности изменения активности ПО. В результате проведенных экспериментов установлено, что у обеих изучаемых форм березы повислой активность фермента в листьях убывала с увеличением длины листовой пластинки. У сеянцев обычной березы повислой она изменялась в диапазоне от 26 до 95 мкмоль ТГ/мг белка, а у карельской березы – от 16 до 35 мкмоль ТГ/мг белка (рис. 17).

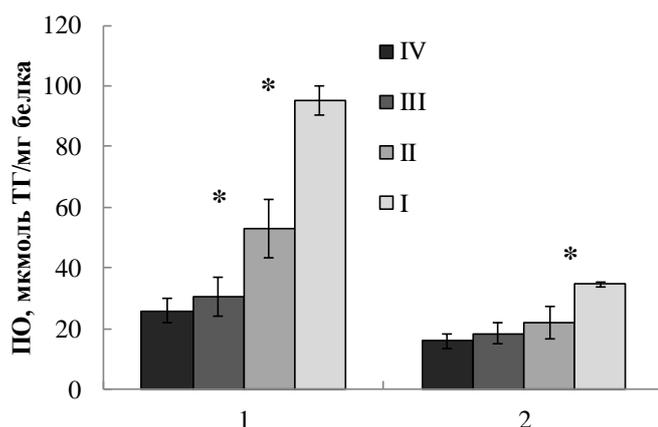


Рис. 17. Активность ПО (мкмоль ТГ/мг белка) в листьях, отличающихся стадией развития (I-IV), у 10-месячных сеянцев обычной березы повислой (*B. pendula* var. *pendula*) и карельской березы (*B. pendula* var. *carelica*). I фаза – лист 1-2 см, II фаза – лист 3-4 см, III фаза – лист 5-6 см, IV фаза – лист 7-8 см.

Так же как КАТ, активность ПО в листьях обычной березы на всех фазах развития была выше, чем у сеянцев карельской березы. При этом уменьшение пероксидазной активности от молодого к зрелому листу более динамично происходило, напротив, у сеянцев обычной березы повислой.

Анализируя данные по активности КАТ и ПО на разных стадиях развития листа, можно заключить, что более яркую индикаторную роль имела КАТ, различия между изучаемыми формами и фазами развития листа были достоверны. ПО, в основном, выполняла компенсаторную роль. Кроме того, именно КАТ играет огромную роль в клетках и тканях сеянцев (Willekens et al., 1995). Так, установлено, что у сеянцев обычной и карельской березы возрастание активности КАТ согласовывалось с увеличением длины листа. У многих растений активности ферментов АОС возрастают от молодого листа к зрелому (Prochazkova et al., 2001) из-за интенсификации дыхательных процессов и активизации метаболизма (Мазей и др., 2009; Sairam et al., 2003).

Определение каталазной активности в листовом аппарате имеет особое значение с точки зрения функционирования листа в целостной системе ДАО. На уровне целого организма они регулируется за счет усиления потребления акцепторами ассимилятов на разных уровнях структурной организации (Климов, 1987, 1997; Климов и др., 1990). Акцепторные зоны (зоны роста или запасаения), в нашем случае – это формирующиеся ствольные ткани, получают ассимиляты, которые образовались в листе в ходе фотосинтеза и дыхания (Шелякин и др., 2016).

Визуально изученные сеянцы карельской березы были более облиственными, онтогенез листа, связанный с образованием новых листьев, протекал у них интенсивнее. Таким образом, вероятно, это могло повлиять на интенсивный приток фотоассимилятов, особенно сахарозы, в формирующиеся ткани ствола, что могло привести в последствие к нарушению камбиальной деятельности и развитию структурных аномалий. Предыдущие исследования показали, что во флоэме 2-летних сеянцев карельской березы, по сравнению с обычной березой, содержание сахарозы было выше (Галибина и др., 2014). Подтверждением этому также может служить тот факт, что у сеянцев обычной и карельской березы уже в возрасте нескольких месяцев в стебле выявлены различия моделей распределения активности СС и АпИнв – главных ферментов утилизации сахарозы (Мощенская, 2016). Мы показали, что разница в количественных

значениях активности КАТ между I и IV фазами развития листа у сеянцев карельской березы превышает таковую у сеянцев обычной березы, что может быть следствием более интенсивно протекающих метаболических процессов в связи с донорной функцией листа.

Таким образом, обычная и карельская формы березы повислой на начальных стадиях онтогенеза различаются по активности ПО и, особенно, по активности КАТ в листовом аппарате. Данные закономерности могут лечь в основу ферментативной диагностики признака узорчатости древесины у березы в раннем онтогенезе, когда внешние признаки отсутствуют. Так, лист может использоваться как орган первичной диагностики (тест-объект) для выявления предрасположенности к возникновению структурных аномалий у березы повислой.

Активность АОС в листовом аппарате у взрослых безузорчатых и узорчатых растений карельской березы

На уровне целого организма ДАО регулируется за счет усиления потребления акцепторами (в нашем случае тканями ствола) ассимилятов на разных уровнях структурной организации (Климов, 1987, 1997; Климов и др., 1990). Ранее было экспериментально показано и обосновано то, что листовым аппаратом, участвующим в формировании ДАО с тканями ствола, также отражает различный метаболический статус сеянцев березы повислой двух форм – обычной и карельской. Поэтому встал вопрос, сохраняется ли данная метаболическая закономерность в листовом аппарате у взрослых растений? Кроме того, предыдущие исследования показали, что взрослые растения карельской березы отличались по общему количеству листьев (особенно брахибластов и их площади) и по суммарной ассимилирующей поверхности в большую сторону по сравнению с растениями обычной березы (Николаева, Новицкая, 2007), в связи с чем лучше снабжали ствольные ткани ассимилятами. У 8-летних растений карельской березы было выше суммарное содержание фотосинтетических пигментов и их количество в светособирающем комплексе, по сравнению с обычной березой (Галибина и др., 2013).

Мы отобрали для анализа листья брахибластов у взрослых 25-летних безузорчатых и узорчатых растений карельской березы в период активного роста и определили в них активность всего комплекса исследуемых ферментов АОС.

Узорчатые растения карельской березы при исследовании не разделяли по баллам узорчатости (рис. 18).

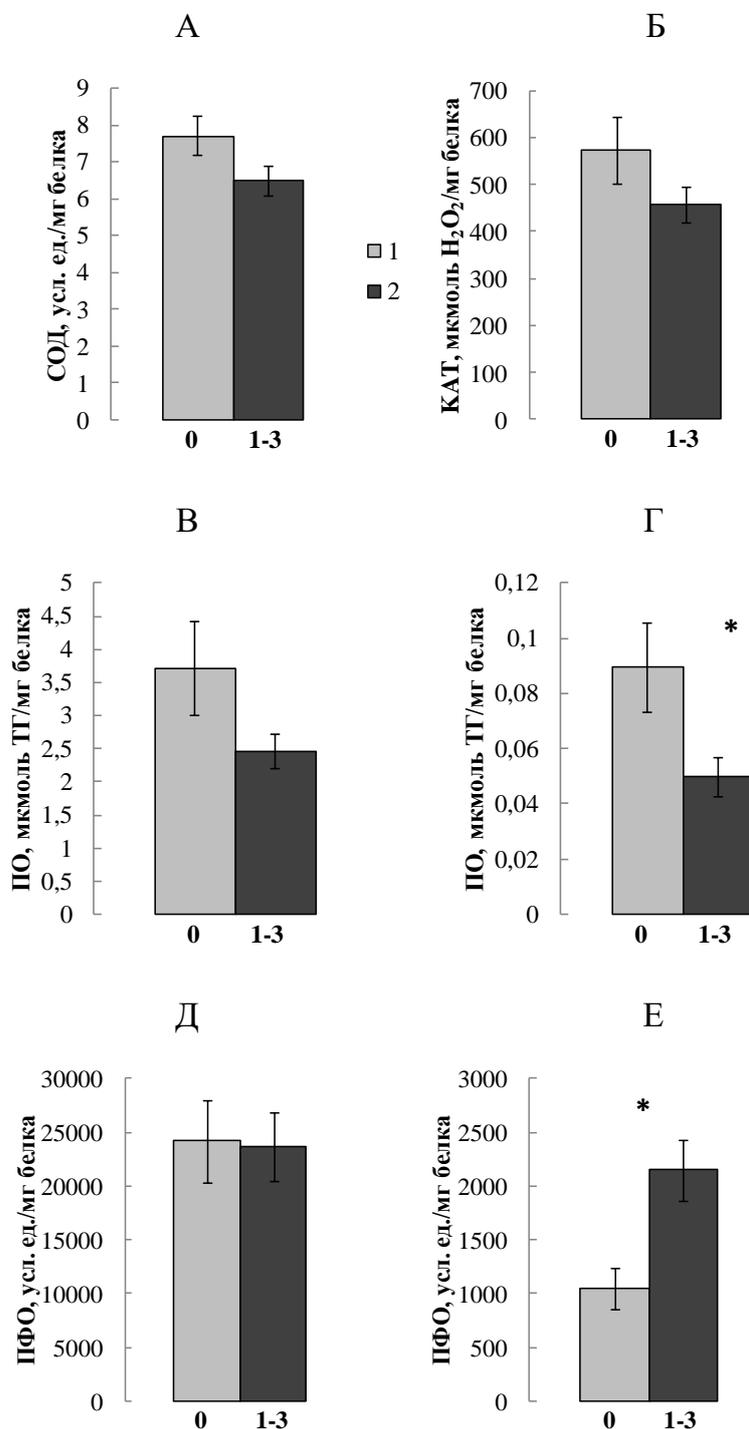


Рис. 18. Активность СОД (А), КАТ (Б), ПО при pH 5 (В) и ПО при pH 7.8 (Г), ПФО при pH 5 (Д) и ПФО при pH 7.8 (Е) в листьях брахибластов у безузорчатых (0 баллов) (1) и узорчатых растений карельской березы (*B. pendula* var. *carelica*) (1–3 балла) (2) в период камбиального роста. Баллы указаны по оси абсцисс.

Так, активность СОД у безузорчатых растений составила 7.7 усл. ед./мг белка, при этом у узорчатых 6.5 усл. ед./мг белка (рис. 18 А). Отметим, что наблюдаемые значения превышают таковые для данного фермента в тканях ствола.

Активность КАТ имела значения 573 и 457 мкмоль H_2O_2 /мг белка у безузорчатых и узорчатых растений соответственно (рис 18 Б).

Активность кислых изоформ ПО составила 3.7 и 2.5 мкмоль ТГ/мг белка, а цитоплазматических 0.09 и 0.05 мкмоль ТГ/мг белка у безузорчатых и узорчатых растений соответственно (рис. 18 В, Г). Отметим, что значения заметно ниже, чем в тканях ствола.

Активность кислых изоформ ПФО не отличалась у исследуемых растений и достигала значений соответственно 24184 и 23657 усл. ед./мг белка у безузорчатых и узорчатых растений карельской березы. Эти значения в десятки раз выше тех, что мы наблюдали в тканях ствола. А активность цитоплазматической ПФО и вовсе была выше у узорчатых растений и составила 2149 усл. ед./мг белка против 1049 усл. ед./мг белка у безузорчатых растений (рис. 18 Д, Е).

Так, у взрослых растений мы наблюдали те же биохимические стратегии активности ферментов АОС в листовом аппарате, что и у сеянцев. Кроме индикаторной роли ПО и КАТ, которые имеют более низкие значения в листьях брахибластов у узорчатых растений, такую же зависимость имеет и СОД, которая является пусковым механизмом для образования перекиси водорода, которая затем нейтрализуется ПО и КАТ.

Известно, что повышенное накопление продуктов фотосинтеза приводит к более интенсивному синтезу вторичных соединений (Климов и др., 1990; Климов, 1997; 2008). Поэтому, вероятно, такая активность ПФО здесь, была обусловлена тем, что активная работа фотосинтетического аппарата у узорчатых растений, которая может быть связана с «запросом» на ассимилянты, в том числе фенольной природы, со стороны тканей ствола, привела к их «избытку» в листовом аппарате, что и привело к повышению активности ПФО.

Таким образом, у взрослых безузорчатых и узорчатых растений карельской березы активность СОД, КАТ и ПО в листьях брахибластов, которые связаны ДАО с тканями ствола, имеет индикаторную роль. Развитие структурных

аномалий связано с понижением активности данных ферментов у узорчатых растений карельской березы.

Биохимические стратегии ферментов АОС при формировании косослойной древесины у сосны обыкновенной

Понимание процессов ксилогенеза необходимо как с научной, так и с практической точки зрения. Результаты исследования характеризуют биохимическое поведение комплекса ферментов АОС в ряду растений карельской березы с разной степенью узорчатости. Формирование узорчатости тесно сопряжено с процессами вторичного метаболизма у древесного растения, что отражается в повышении активности ферментов АОС.

Однако узорчатость – это лишь частный случай аномального ксилогенеза у древесных растений. Различные модели сахарозного метаболизма, которые путем цепи биохимических реакций вовлекают в данный процесс ферменты АОС, лежат в основе общих механизмов формирования различных типов древесины по пути более интенсивного образования целлюлозы или лигнина (Savidge, 1996).

Кроме того, в литературе имеются данные о регуляции ксилогенеза, связанной с окислительным стрессом (Ros-Barceló, 1998, 1999; 2005; Ros et al., 2006; Novo-Uzal et al., 2013). Многими авторами подчеркивается наличие определенных маркеров ксилогенеза, то есть различных цитологических, биохимических и молекулярно-генетических показателей, которые могли бы идентифицировать переходы между различными стадиями ксилогенеза (Fucuda, 1996).

Чтобы понять, насколько универсальными могут являться обнаруженные нами диагностические свойства изученных ферментов АОС, мы исследовали активность комплекса ферментов АОС при формировании косослойной древесины у сосны обыкновенной *Pinus sylvestris* L. и поставили вопрос, существует ли общность обнаруженных биохимических основ формирования различных типов древесины у разных древесных растений.

На рисунке 19 представлены фотографии окоренных частей ствола деревьев сосны обыкновенной без признаков аномалий и с развитой косослойной древесиной.

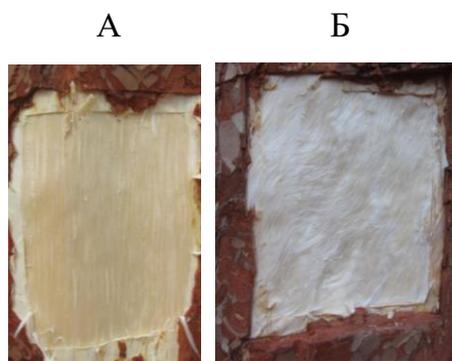


Рис. 19. Деревья сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris*) с прямослойной (А) и косослойной (Б) древесиной.

Закономерности изменения активности АОС у растений сосны обыкновенной с прямослойной и косослойной древесиной

В ксилеме активность СОД значимо не отличалась у прямослойных и косослойных растений сосны обыкновенной, значения достигали 5.4 и 4.7 усл. ед./мг белка (рис. 20 А).

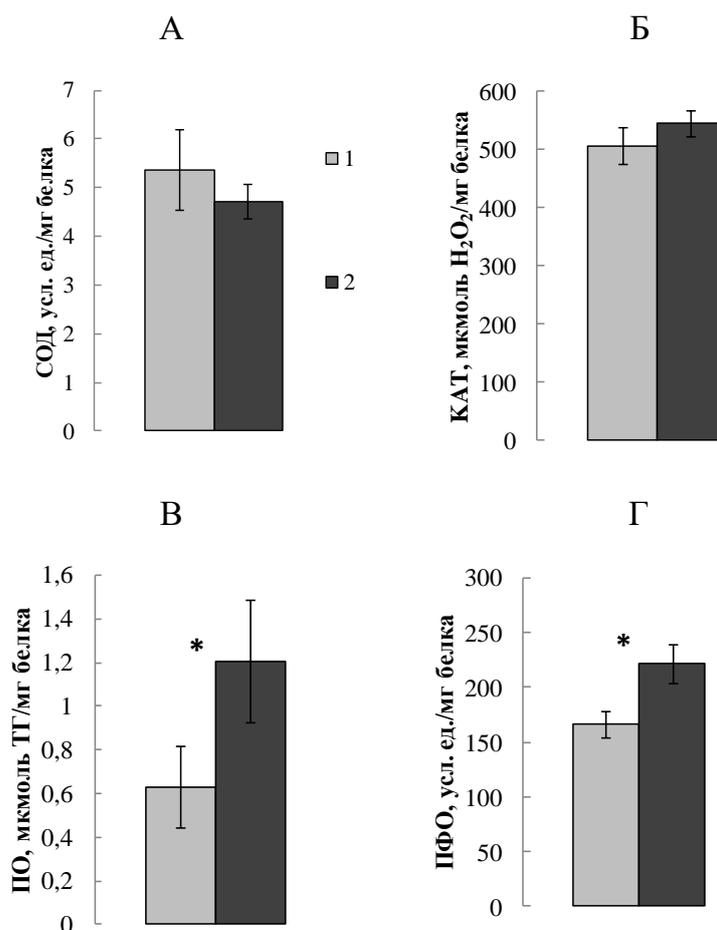


Рис. 20. Активность СОД (А), КАТ (Б), ПО (В) и ПФО (Г) в ксилеме у растений сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris*) с прямослойной (1) и косослойной (2) древесиной.

Активность КАТ была соответственно 507 и 544 мкмоль H_2O_2 /мг белка у растений с нормальной и аномальной древесиной (рис. 20 Б). Активность основных ферментов фенольного метаболизма – ПО и ПФО – была достоверно выше у растений, которые имели признаки косослойной древесины. Так ПО у косослойных растений была выше в 1.9 раза по сравнению с растениями без признаков структурных аномалий и составила 0.63 и 1.2 мкмоль ТГ/мг белка соответственно, а ПФО была выше в 1.3 раза и достигла значений 167 и 222 усл. ед./мг белка соответственно (рис. 20 В, Г).

Во флоэме активность СОД также значимо не отличалась у прямослойных и косослойных растений сосны обыкновенной, значения достигали 5.6 и 5.8 усл. ед./мг белка (рис. 21 А).

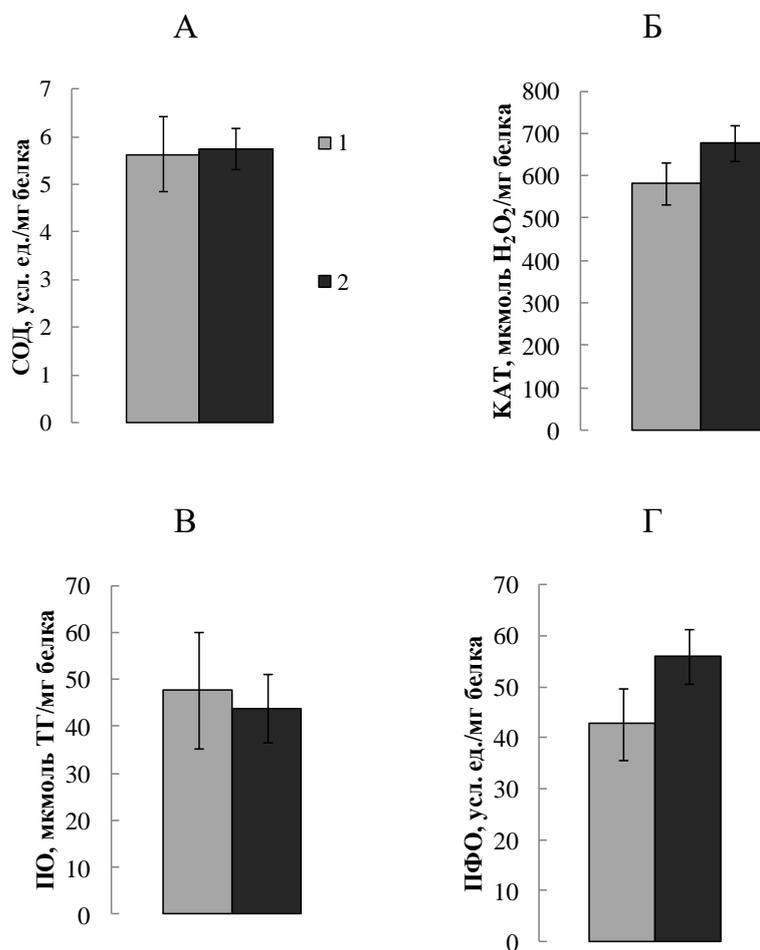


Рис. 21. Активность СОД (А), КАТ (Б), ПО (В) и ПФО (Г) во флоэме у растений сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris*) с прямослойной (1) и косослойной (2) древесиной.

Активность КАТ была соответственно 583 и 677 мкмоль H_2O_2 /мг белка у растений с нормальной и аномальной древесиной (рис. 21 Б). Активность ПО и ПФО во флоэме также значимо не отличалась. Так, ПО у прямослойных и косослойных растений составила 48 и 44 мкмоль ТГ/мг белка соответственно, а ПФО – 43 и 56 усл. ед./мг белка соответственно (рис. 21 В, Г).

Поведение ферментов АОС как вероятный биохимический маркер развития структурных аномалий у древесных растений

Для косослойной древесины сосны обыкновенной биохимическими индикаторами проявили себя активности ПО и ПФО в ксилеме. Отметим, что прямослойные деревья имели гораздо больший прирост древесины, нежели деревья с выраженным пороком, что уже изначально подчеркивает тот факт, что у деревьев без признаков аномалий интенсивнее протекали ростовые процессы, а у косослойных растений преобладали процессы вторичного метаболизма (Никерова и др., 2017).

Исследования ферментов углеводного обмена (СС и АпИнв), которые также были проведены в растительных образцах сосны обыкновенной (неопубликованные данные) позволили обнаружить разный механизм утилизации сахарозы у деревьев с прямослойной древесиной и наличием косослоя. У растений с признаками косослоя отмечена тенденция на понижение активности СС в тканях ствола, что говорит об уменьшении роли СС в расщеплении сахарозы. У косослойных растений сахароза выходит в апопласт и утилизируется там за счет деятельности АпИнв. За увеличением активности АпИнв последовало возрастание активности ферментов ПО и ПФО, вызванное образованием субстратов фенольной природы и АФК в ходе включения продуктов расщепления сахарозы – глюкозы и фруктозы – работой АпИнв в цикл Кребса и пентозофосфатный цикл.

Таким образом, метаболические стратегии, обнаруженные при исследовании комплекса ферментов АОС при формировании косослойной древесины, не противоречат тем, что были обнаружены при формировании структурных аномалий у карельской березы. Повышение активности ПО и ПФО при образовании косослойной древесины может служить биохимическим маркером развития данного вида структурных аномалий.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное исследование активности ферментов АОС на примере двух форм березы повислой – обычной березе (*Betula pendula* var. *pendula*) и карельской березе (*B. pendula* Roth var. *carelica* (Mercl.) Hämet-Ahti), у которой в пределах одного дерева, наряду с формированием нормальной по строению древесины, происходит также образование узорчатой древесины, позволило выявить биохимические стратегии ферментов АОС при разных сценариях ксилогенеза древесных растений. Показано, что у взрослых растений изучаемых форм различается путь утилизации перекиси водорода. У растений обычной березы повислой перекись утилизируется преимущественно за счет высокой активности КАТ, а у растений с проявившимися признаками структурных аномалий – за счет высокой активности ПО, которой предшествует метаболизация сахарозы с участием АпИInv. Эти закономерности прослеживаются и в возрасте активного формирования структурных аномалий. В пределах одного дерева карельской березы в безузорчатых участках ствола также наблюдается преобладание каталазного способа утилизации перекиси водорода. В узорчатых участках ствола утилизация перекиси водорода происходит преимущественно за счет повышения активности ПО, как было показано на взрослых растениях. Кроме того, активный процесс накопления в паренхимных клетках узорчатых тканей веществ фенольной природы приводит к повышению активности ПФО. Исследования, проведенные в период активного камбиального роста, показали, что увеличение степени узорчатости древесины у карельской березы коррелирует с возрастанием активности СОД, КАТ, ПО и ПФО, и позволили установить корреляционную взаимосвязь активности изучаемых ферментов АОС между собой, что свидетельствует о взаимосвязанной каскадной работе изучаемых ферментов при разных сценариях ксилогенеза у карельской березы. Особенно интересным и важным фактом проведенного исследования является то, что обнаруженные биохимические закономерности проявились в раннем онтогенезе. Уже с возраста нескольких месяцев, когда внешние видимые признаки аномального ксилогенеза отсутствуют, у сеянцев карельской березы наблюдалась переориентация АОС на процессы вторичного метаболизма, а у сеянцев обычной березы повислой преобладали ростовые процессы. Установлено, что активность изучаемых

ферментов АОС в листовом аппарате, как у взрослых растений карельской березы, так и у сеянцев, понижена, что связано с усилением «запроса» на потребление ассимилятов тканями ствола – акцепторами, в связи с чем активность ферментов АОС в листовом аппарате, участвующем в формировании ДАО с тканями ствола, также отражает различный метаболический статус, наблюдаемый при разных сценариях ксилогенеза. Поэтому, лист может рассматриваться как тест-объект для определения наличия структурных аномалий, а в раннем онтогенезе, как орган первичной диагностики для выявления предрасположенности к возникновению узорчатой структуры древесины.

Таким образом, в ходе проведенной работы установлено разнонаправленное поведение ферментов АОС при разных сценариях ксилогенеза у березы повислой. Формирование узорчатости тесно сопряжено с процессами вторичного метаболизма у древесного растения, что отражается в повышении активности ферментов АОС. Полученные данные показали возможность использования ферментов АОС в качестве биохимических маркеров аномального ксилогенеза. Однако узорчатость – это лишь частный случай аномального ксилогенеза у древесных растений. Исследование активности ферментов АОС при образовании косослойной древесины у сосны обыкновенной подтвердили общность обнаруженных биохимических основ при формировании различных типов древесины у древесных растений.

ВЫВОДЫ:

1. Изменение активности ферментов АОС у карельской березы является следствием нарушения углеводного обмена и метаболизации сахарозы с участием АПИнв.
2. Аномальный ксилогенез у карельской березы сопровождается утилизацией перекиси водорода преимущественно за счет высокой активности ПО.
3. В период активного формирования структурных аномалий у карельской березы наблюдается повышение активностей ПО и ПФО, участвующих в метаболизации запасных веществ фенольной природы, которые накапливаются в паренхимных клетках.

4. В период активного камбиального роста активность СОД, КАТ, ПО и ПФО коррелирует с возрастанием степени узорчатости древесины, что позволяет считать ферменты АОС биохимическими маркерами структурных аномалий.
5. Активность ферментов АОС может являться тест-признаком для диагностики аномального ксилогенеза у карельской березы уже на самых ранних этапах онтогенеза.
6. Лист может рассматриваться как тест-объект для первичной диагностики структурных аномалий в строении древесины у березы повислой.
7. Метаболические стратегии, обнаруженные при исследовании комплекса ферментов АОС при формировании косослойной древесины, не противоречат тем, что были обнаружены при формировании структурных аномалий у карельской березы.

Благодарности

Автор выражает глубокую благодарность научному руководителю, доктору биологических наук Н. А. Галибиной за неоценимую научную и человеческую помощь, искреннюю поддержку на всех этапах проведенного исследования; за любовь, привитую к объекту исследования, и биохимии растений в целом; за доверие и понимание. Особая благодарность д.б.н. Л. Л. Новицкой и д.б.н. Е. Ф. Марковской за необходимые интереснейшие консультации на всех этапах работы. Теплые слова благодарности И. Н. Софроновой за помощь в освоении большого спектра биохимических методов и совместно с М. Н. Бородиной их совершенствовании, получении большого массива экспериментальных данных. Автор искренне благодарен научным сотрудникам ИЛ КарНЦ РАН к.б.н. Ю. Л. Мощенской, к.б.н. С. М. Синькевичу, к.б.н. Е. В. Мошкиной, к.б.н. Н. Н. Николаевой, совместно с которыми были получены данные для настоящего исследования при проведении экспедиций и последующей лабораторной обработки данных, также за их грамотную помощь в интерпретации результатов. Отдельная благодарность сотруднику Карельской лесосеменной станции М. Л. Щуровой за помощь при подборе объектов исследования. Огромная признательность сотрудникам лаборатории аналитической КарНЦ РАН за человеческую помощь на

всех этапах работы, ценные советы по методической части работы. Отдельное спасибо моей Маме, Е. Ю. Никеровой, за веру и всестороннюю моральную поддержку.

**СПИСОК ОСНОВНЫХ НАУЧНЫХ ПУБЛИКАЦИЙ, В КОТОРЫХ
ИЗЛОЖЕНЫ РЕЗУЛЬТАТЫ НАУЧНО-КВАЛИФИКАЦИОННОЙ РАБОТЫ**
Статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК РФ

1. Галибина Н. А., Новицкая Л. Л., Никерова К. М. Избыток экзогенных нитратов подавляет формирование аномальной древесины у карельской березы. *Онтогенез*. 2016. Т. 47. № 2. С. 83-91. **РИНЦ, Web of Science, Scopus**
2. Галибина Н. А., Новицкая Л. Л., Никерова К. М., Мощенская Ю. Л., Бородина М. Н., Софронова И. Н. Регуляция активности апопластной инвертазы в камбиальной зоне карельской березы. *Онтогенез*. 2019. Т. 50. № 2. С. 53-64. **РИНЦ, Web of Science, Scopus**
3. Мощенская Ю. Л., Галибина Н. А., Новицкая Л. Л., Никерова К. М. Роль сахарозосинтазы в акцепторных органах древесных растений. *Физиология растений*. 2019. Т. 66. № 1. С. 13-25. **РИНЦ, Web of Science, Scopus**
4. Галибина Н. А., Новицкая Л. Л., Никерова К. М. Донорно-акцепторные отношения органов и тканей березы повислой при альтернативных сценариях ксилогенеза. *Физиология растений*. 2019. Т. 66. № 2. С. 128-136. **РИНЦ, Web of Science, Scopus**
5. Никерова К. М., Галибина Н. А., Мощенская Ю. Л., Новицкая Л. Л., Подгорная М. Н., Софронова И. Н. Участие каталазы и пероксидазы в процессах ксилогенеза у карельской березы. *Лесоведение*. 2019. № 2. С. 115-127. **РИНЦ, Scopus**
6. Ludmila L. Novitskaya, Tatiana V. Tarelkina, Natalia A. Galibina, Yulia L. Moshchenskaya, Nadezhda N. Nikolaeva, Kseniya M. Nikerova, Marina N. Podgornaya, Irina N. Sofronova, Ludmila I. Semenova. The Formation of Structural Abnormalities in Karelian Birch Wood is Associated with Auxin Inactivation and Disrupted Basipetal Auxin Transport. *Journal of Plant Growth Regulation*. 2019. P. 1-17. **Web of Science, Scopus**
7. 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). Серия: Естественные и технические науки. 2013. С. 7-13. **РИНЦ**

8. Новицкая Л. Л., Галибина Н. А., Никерова К. М. Транспорт и запасание сахаров во флоэме *Betula pendula* Roth var. *pendula* и var. *carelica*. Труды КарНЦ РАН. No 11. Сер. Экспериментальная биология. 2015. С. 35-47. **РИНЦ**
9. Галибина Н. А., Мошкина Е. В., Никерова К. М., Мощенская Ю. Л., Знаменский С. Р. Активность пероксидазы как индикатор степени узорчатости древесины карельской березы. Лесоведение. 2016. № 4. С. 294-304. **РИНЦ**
10. Мощенская Ю. Л., Галибина Н. А., Новицкая Л. Л., Никерова К. М., Подгорная М. Н., Софронова И. Н. Активность ферментов диссимиляции сахарозы в раннем онтогенезе разных форм березы повислой. Труды КарНЦ РАН. No 11. Сер. Экспериментальная биология. 2016. С. 78-87. **РИНЦ**
11. Никерова К. М., Галибина Н. А., Мощенская Ю. Л., Новицкая Л. Л., Подгорная М. Н., Софронова И. Н. Каталазная активность в листовом аппарате у сеянцев березы повислой разных форм (*Betula pendula* Roth): var. *pendula* и var. *carelica* (Mercklin). Труды КарНЦ РАН. No 11. Сер. Экспериментальная биология. 2016. С. 68-77. **РИНЦ**
12. Никерова К. М., Галибина Н. А. Влияние нитратного азота на пероксидазную активность в тканях *Betula pendula* Roth var. *pendula* и *B. pendula* var. *carelica* (Mercklin). Сибирский лесной журнал. 2017. № 1. С. 15-24. **РИНЦ**
13. Марковская Е. Ф., Галибина Н. А., Ильинова М. К., Никерова К. М., Шмакова Н. Ю. Состав липидов и функциональное состояние мембранных систем *Stellaria humifusa*. Труды КарНЦ РАН. No 5. Сер. Экспериментальная биология. 2017. С. 99-110. **РИНЦ**
14. Никерова К. М., Галибина Н. А., Мощенская Ю. Л., Новицкая Л. Л., Подгорная М. Н., Софронова И. Н. Ферменты антиоксидантной системы – индикаторы разных сценариев ксилогенеза: в раннем онтогенезе и во взрослом состоянии (на примере *Betula pendula* Roth). Труды КарНЦ РАН. No 6. Сер. Экспериментальная биология. 2018. С. 68-80. **РИНЦ**
15. Никерова К. М., Галибина Н. А., Мощенская Ю. Л., Новицкая Л. Л., Бородина М. Н., Софронова И. Н. Окисление кверцетина пероксидазой

карельской березы. Труды КарНЦ РАН. No 12. Сер. Экспериментальная биология. 2018. С. 65-75. **РИНЦ**

16. Никерова К. М., Галибина Н. А., Мощенская Ю. Л., Бородина М. Н., Софронова И. Н. Определение активности супероксиддисмутазы и полифенолоксидазы в древесине *Betula pendula* var. *carelica* (*Betulaceae*) при разной степени нарушения ксилогенеза. Растительные ресурсы. 2019. Т. 55. № 2. С. 213-230. **РИНЦ**

Публикации в других изданиях

17. Никерова К. М., Галибина Н. А. Влияние экзогенного нитрата на активность пероксидазы карельской березы. Биология - наука XXI века: 18-я Междунар. Пущинская школа-конф. молодых ученых (Пущино, 21-25 апреля 2014 г.). Сб. тезисов. Пущино. 2014. С. 393-394.
18. Никерова К. М., Галибина Н. А. Функциональная роль пероксидазы в органах и тканях карельской березы. 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. 332-334.
19. Никерова К. М., Галибина Н. А. Окисление кверцетина пероксидазой карельской березы. Материалы докладов 9-го международного симпозиума. Фенольные соединения: фундаментальные и прикладные аспекты. М. 2015. С. 386-390.
20. Никерова К. М., Галибина Н. А. Изменение пероксидазной активности у карельской березы в зависимости от степени насыщенности текстуры древесины. Растения в условиях глобальных и локальных природно-климатических и антропогенных воздействий: Тез. докл. Всерос. науч. конф. с международным участием и школы для мол. ученых (21-26 сент. 2015 г.). Петрозаводск: Карельский научный центр РАН. 2015. С. 378.
21. Никерова К. М., Галибина Н. А. Донорно-акцепторные отношения листового аппарата и тканей ствола у разных форм березы повислой (*Betula pendula* Roth): var. *pendula* и var. *carelica* (Mercklin). 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. Изд-во Санкт-Петербургского государственного университета, 2016. – С. 241-242.
22. Галибина Н. А., Новицкая Л. Л., Мощенская 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. Изд-во Санкт-Петербургского государственного университета, 2016. – С. 37-38.
23. Новицкая Л. Л., Галибина Н. А., Мощенская Ю. Л., Никерова К. М. Гормональная и генетическая регуляция дифференцировки структурных элементов древесины карельской березы. 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. Изд-во Санкт-Петербургского государственного университета, 2016. – С. 123-125.
24. Novitskaya L. L., Galibina N. A., Moschenskaya Yu. L., Nikerova K. M. The role of glucose in the modulation of the auxin signaling pathway during the formation of Karelian birch figured wood. Proceedings of Fourth International Symposium on Plant Signaling and Behavior / Project management: Vadim Demidchik, Olga Voitsekhovskaja, Elena Tyutereva, Gregory Pozhvanov. - Saint Petersburg: SINEL Co.Ltd., 2016. P.147.
25. Никерова К. М. Модульное обучение как средство реализации интеграции науки и образования (на материале разработки модуля «Современные методы исследования в физиологии и биохимии растений»). Научно-исследовательская работа обучающихся и молодых ученых: материалы 68-й Всероссийской (с международным участием) научной конференции обучающихся и молодых ученых [Электронный ресурс]. – Петрозаводск: Издательство ПетрГУ, 2016. – С. 245-248.
26. Галибина Н. А., Новицкая Л. Л., Мощенская 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.
27. Никерова К. М., Галибина Н. А., Новицкая Л. Л., Мощенская Ю. Л. Гваякол-пероксидаза карельской березы как компонент сигнальной системы во взаимоотношениях почва-растение. IV Российский симпозиум с международным участием «Фитоиммунитет и клеточная сигнализация у растений». Казань, 2016. С. 107-108.
28. Мощенская Ю. Л., Галибина Н. А., Новицкая Л. Л., Никерова К. М. Дифференциальная экспрессия генов сахарозосинтазного и инвертазного семейства у сеянцев *Betula pendula* Roth. IV Российский симпозиум с международным участием «Фитоиммунитет и клеточная сигнализация у растений». Казань, 2016. С. 101-102.
29. Никерова К. М., Галибина Н. А., Мощенская Ю. Л., Новицкая Л. Л. Ферменты антиоксидантной системы в разных сценариях ксилогенеза. Материалы II Международного симпозиума «Молекулярные аспекты редокс-метаболизма растений» и Международной научной школы «Роль активных форм кислорода в жизни растений» (Уфа, 26 июня – 1 июля 2017 г.) / ред. И.В. Максимов и др. Уфа: ООО «Первая типография», 2017. С. 188-191.
30. Галибина Н. А., Новицкая Л. Л., Мощенская Ю. Л., Никерова К. М., Подгорная М. Н., Софронова И. Н. Физиолого-биохимические и молекулярно-генетические особенности разных сценариев ксилогенеза древесных растений. Тезисы докладов Всероссийской научной конференции с международным участием, посвященной 60-летию Института леса Карельского научного центра РАН (Петрозаводск, 11-15 сентября 2017 года). Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 2017. С. 67-69.
31. Мощенская Ю. Л., Галибина Н. А., Новицкая Л. Л., Никерова К. М. Распределение углерода в акцепторных органах сеянцев березы повислой. Тезисы докладов Всероссийской научной конференции с международным участием, посвященной 60-летию Института леса Карельского научного центра РАН (Петрозаводск, 11-15 сентября 2017 года). Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 2017. С. 196-197.

32. Никерова К. М., Галибина Н. А., Синькевич С. М., Мощенская Ю. Л., Подгорная М. Н., Софронова И. Н. Биохимические аспекты формирования косослойной древесины у сосны обыкновенной. Тезисы докладов Всероссийской научной конференции с международным участием, посвященной 60-летию Института леса Карельского научного центра РАН (Петрозаводск, 11-15 сентября 2017 года). Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 2017. С. 200-201.
33. Новицкая Л. Л., Галибина Н. А., Мощенская Ю. Л., Николаева Н. Н., Никерова К. М., Тарелкина Т. В. Регуляция продуктивности древесных растений через изменение углеводного и гормонального статусов камбиальной зоны. Тезисы докладов Всероссийской научной конференции с международным участием, посвященной 60-летию Института леса Карельского научного центра РАН (Петрозаводск, 11-15 сентября 2017 года). Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 2017. С. 202-204.
34. Галибина Н. А., Новицкая Л. Л., Мошкина Е. В., Мощенская Ю. Л., Никерова К. М., Подгорная М. Н., Софронова И. Н. Влияние уровня плодородия почвы на реализацию генетической программы у карельской березы. Теоретические и прикладные аспекты лесного почвоведения: Сборник материалов VII Всероссийской научной конференции по лесному почвоведению с международным участием. Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 2017. С. 371-374.
35. Мощенская Ю. Л., Кикеева А. В., Галибина Н. А., Мошкина Е. В., Никерова К. М., Подгорная М. Н., Софронова И. Н., Новицкая Л. Л. Физиологическая роль микоризы в адаптации растений карельской березы к бедным по уровню плодородия почвам. Теоретические и прикладные аспекты лесного почвоведения: Сборник материалов VII Всероссийской научной конференции по лесному почвоведению с международным участием. Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 2017. С. 394-397.
36. Никерова К. М., Галибина Н. А., Мощенская Ю. Л., Новицкая Л. Л. Древесные растения, произрастающие на разных по уровню плодородия почвах, отличаются по активности ферментов АОС. Сборник материалов докладов Годичного собрания Общества физиологов растений России

- Научной конференции и школы для молодых ученых «Экспериментальная биология растений: фундаментальные и прикладные аспекты», 18-24 сентября 2017 г., Крым, Судак. – Москва, 2017. С. 242.
37. Мощенская Ю. Л., Галибина Н. А., Новицкая Л. Л., Никерова К. М., Подгорная М. Н., Софронова И. Н. Участие сахарозосинтазы в распределении углерода в период камбиального роста древесных растений. Сборник материалов докладов Годичного собрания Общества физиологов растений России Научной конференции и школы для молодых ученых «Экспериментальная биология растений: фундаментальные и прикладные аспекты», 18-24 сентября 2017 г., Крым, Судак. – Москва, 2017. С. 223.
38. Новицкая Л. Л., Галибина Н. А., Мощенская Ю. Л., Николаева Н. Н., Тарелкина Т. В., Никерова К. М. Роль полярного транспорта ауксина в регуляции продуктивности древесных растений. Сборник материалов докладов Годичного собрания Общества физиологов растений России Научной конференции и школы для молодых ученых «Экспериментальная биология растений: фундаментальные и прикладные аспекты», 18-24 сентября 2017 г., Крым, Судак. – Москва, 2017. С. 245.
39. Галибина Н. А., Новицкая Л. Л., Мощенская Ю. Л., Никерова К. М. Сверхэкспрессия апопластной инвертазы в камбиальной зоне приводит к изменению сценария ксилогенеза и сопровождается снижением продуктивности древесных растений. Сборник материалов докладов Годичного собрания Общества физиологов растений России Научной конференции и школы для молодых ученых «Экспериментальная биология растений: фундаментальные и прикладные аспекты», 18-24 сентября 2017 г., Крым, Судак. – Москва, 2017. С. 31.
40. Мамаев А. В., Шibaева Т. Г., Галибина Н. А., Никерова К. М. Влияние мелатонина на рост и развитие побегов и корней у двух форм *Betula pendula*. Сборник материалов докладов Годичного собрания Общества физиологов растений России Научной конференции и школы для молодых ученых «Экспериментальная биология растений: фундаментальные и прикладные аспекты», 18-24 сентября 2017 г., Крым, Судак. – Москва, 2017. С. 220.

41. Никерова К. М., Галибина Н. А. Мощенская Ю. Л., Новицкая Л. Л., Подгорная М. Н., Софронова И. Н. Активность пероксидазы и полифенолоксидазы повышается при альтернативном сценарии ксилогенеза. Фенольные соединения: функциональная роль в растениях: сборник научных статей по материалам X Международного симпозиума «Фенольные соединения: фундаментальные и прикладные аспекты», Москва, 14-19 мая 2018 г. / отв. ред. Н. В. Загоскина – М.: ИФР РАН, – 2018. С. 300-305.
42. Никерова К.М., Галибина Н. А., Мощенская Ю. Л., Новицкая Л. Л., Подгорная М. Н., Софронова И. Н. Изменение активности ферментов АОС – биохимический индикатор сценария ксилогенеза при разном соотношении подвижных форм азота и фосфора в почве. Сборник материалов докладов Годичного собрания Общества физиологов растений России Всероссийской научной конференции с международным участием и школы молодых ученых «Механизмы устойчивости растений и микроорганизмов к неблагоприятным условиям среды», 10-15 июля 2018 г., Иркутск. С. 549-553.
43. Галибина Н. А., Новицкая Л. Л., Мощенская Ю. Л., Никерова К. М., Подгорная М. Н., Софронова И. Н. Основные регуляторы развития стволовых клеток камбия у древесных растений. Сборник материалов докладов Годичного собрания Общества физиологов растений России Всероссийской научной конференции с международным участием и школы молодых ученых «Механизмы устойчивости растений и микроорганизмов к неблагоприятным условиям среды», 10-15 июля 2018 г., Иркутск. С. 207-210.
44. Новицкая Л. Л., Галибина Н. А., Мощенская Ю. Л., Никерова К. М., Тарелкина Т. В., Подгорная М. Н., Софронова И. Н., Семенова Л. И. Физиолого-биохимические реакции камбиальной зоны березы повислой на нарушение транспорта ассимилятов. Сборник материалов докладов Годичного собрания Общества физиологов растений России Всероссийской научной конференции с международным участием и школы молодых ученых «Механизмы устойчивости растений и микроорганизмов к неблагоприятным условиям среды», 10-15 июля 2018 г., Иркутск. С. 558-562.
45. Kseniya Nikerova, Natalya Galibina, Julia Moschenskaya, Ludmila Novitsky, Marina Borodina, Irina Sofronova. The increase in the activity of AOS enzymes is

an indicator of abnormal growth of woody plants, which differ in the heartwood/sapwood ratio. 10th International Conference «Photosynthesis and Hydrogen Energy Research for Sustainability-2019» in honor of Kimiyuki Satoh, Tingyun Kuang, Cesare Marchetti, and Anthony Larkum Eds. Suleyman Allahverdiev, Ilya Naydov. Saint Petersburg, Russia, 2019, P. 80.

СПИСОК ВСЕРОССИЙСКИХ И МЕЖДУНАРОДНЫХ КОНФЕРЕНЦИЙ, НА КОТОРЫХ БЫЛИ ПРЕДСТАВЛЕНЫ РЕЗУЛЬТАТЫ НАУЧНО-КВАЛИФИКАЦИОННОЙ РАБОТЫ

1. 18 Международная Пушкинская школа-конференция молодых ученых «Биология – наука XXI века (Пушино, 21-25 апреля 2014 г.)
Влияние экзогенного нитрата на активность пероксидазы карельской березы (устный доклад).
2. Годичное собрание 2014 г. Международная научная конференция и школа молодых ученых «Физиология растений – теоретическая основа инновационных агро- и фитобиотехнологий» (Калининград, 19-25 мая 2014 г.)
Функциональная роль пероксидазы в органах и тканях карельской березы (заочное участие).
3. IX Международный Симпозиум «Фенольные соединения: фундаментальные и прикладные аспекты» (Москва, 20-25 апреля 2015 г.)
Окисление кверцетина пероксидазой карельской березы (устный доклад).
4. VIII Съезд ОФР Всероссийская научная конференция с международным участием «Растения в условиях глобальных и локальных природно-климатических и антропогенных воздействий» (Петрозаводск, 21-26 сентября 2015 г.)
Изменение пероксидазной активности у карельской березы в зависимости от степени насыщенности текстуры древесины (устный доклад).
5. 68 Всероссийская (с международным участием) научная конференция обучающихся и молодых ученых (Петрозаводск, 11-29 апреля 2016 г.)
Модульное обучение как средство реализации интеграции науки и образования (на материале разработки модуля «Современные методы исследования в физиологии и биохимии растений») (устный доклад).
6. Годичное собрание 2016 г. Научная конференция с международным участием и школа молодых ученых «Сигнальные системы растений: от рецептора до ответной реакции организма» (Санкт-Петербург, 21–24 июня 2016 г.)

Донорно-акцепторные отношения листового аппарата и тканей ствола у разных форм березы повислой (*Betula pendula* Roth): var. *pendula* и var. *carelica* (Mercklin) (устный доклад).

7. IV Российский симпозиум с международным участием «Фитоиммунитет и клеточная сигнализация у растений» (Казань, 20-23 сентября 2016 г.)
Гваякол-пероксидаза карельской березы как компонент сигнальной системы во взаимоотношениях почва-растение (заочное участие).
8. II Международный симпозиум «Молекулярные аспекты редокс-метаболизма растений» и международная научная школа «Роль активных форм кислорода в жизни растений» (Уфа, 26 июня – 1 июля 2017 г.)
Ферменты антиоксидантной системы в разных сценариях ксилогенеза (заочное участие).
9. Всероссийская научная конференция с международным участием «Бореальные леса: состояние, динамика, экосистемные услуги» (Петрозаводск, 11-15 сентября 2017 г.)
Биохимические аспекты формирования косослойной древесины у сосны обыкновенной (устный доклад).
10. Годичное собрание 2017 г. Научная конференция и школа для молодых ученых «Экспериментальная биология растений: фундаментальные и прикладные аспекты» (Судак, 18-24 сентября 2017 г.)
Древесные растения, произрастающие на разных по уровню плодородия почвах, отличаются по активности ферментов АОС (стендовый доклад).
11. Международная конференция «Young biologists science Week-2017» (Петрозаводск, 20-25 ноября 2017 г.)
The search of effective ways to control cambial activity to obtain wood with desired properties (устный доклад).
12. X Международный Симпозиум «Фенольные соединения: фундаментальные и прикладные аспекты» (Москва, 14-19 мая 2015 г.)
Активность пероксидазы и полифенолоксидазы повышается при альтернативном сценарии ксилогенеза (устный доклад).

13. Годичное собрание 2018 г. Научная конференция и школа для молодых ученых «Механизмы устойчивости растений и микроорганизмов к неблагоприятным условиям среды» (Иркутск, 10-15 июля 2018 г.)

Изменение активности ферментов АОС – биохимический индикатор сценария ксилогенеза при разном соотношении подвижных форм азота и фосфора в почве (заочное участие).

14. 10th International Conference Photosynthesis and Hydrogen Energy Research for Sustainability (Saint Petersburg, June 23-28 2019).

The increase in the activity of AOS enzymes is an indicator of abnormal growth of woody plants, which differ in the heartwood/sapwood ratio» (устный доклад).

СПИСОК КОНКУРСНЫХ ПРОЕКТОВ, В РАМКАХ КОТОРЫХ ВЫПОЛНЯЛИСЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Инактивация фитогормонов как возможный механизм аномального камбиального роста карельской березы (2016-2018 г.г., рук. Новицкая Л. Л., РФФИ, 16-04-01191-а).
2. Научно-исследовательская работа по теме «Разработка технологии диагностики аномальной (декоративной, дефективной) древесины у растений различных древесных пород» в рамках гранта за победу в конкурсе «Участник молодежного научно-инновационного конкурса» («УМНИК»). (2016-2017 г.г., рук. Никерова К. М.)
3. Изучение механизмов эндогенной регуляции аномального ксилогенеза у карельской березы (2016-2018 г.г., рук. Галибина Н. А., РФФИ, 16-04-100639-р_а).
4. Развитие структурных аномалий древесины на примере карельской березы: особенности синтеза, транспорта и инактивации ауксина (2019-2021 г.г., рук. Новицкая Л. Л., РФФИ, 19-04-00622_а)

СПИСОК СОЗДАНЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ

Галибина Н. А., Никерова К. М. Способ диагностики узорчатой текстуры древесины карельской березы. Патент на полезную модель № 2596013. Официальный бюллетень «Изобретения. Полезные модели». № 24 (27.08.2016). 2016.