

УДК 581.1

АКТИВНОСТЬ ИНВЕРТАЗЫ В ТКАНЯХ СТВОЛА КАРЕЛЬСКОЙ БЕРЕЗЫ

© 2015 г. Н. А. Галибина*, Л. Л. Новицкая*, М. С. Красавина**, Ю. Л. Мощенская*

*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт леса Карельского научного центра РАН, Петрозаводск

**Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Москва

Поступила в редакцию 05.03.2015 г.

Исследовали две формы *Betula pendula* Roth: обычную березу повислую (*B. pendula* var. *pendula*) и карельскую березу (*B. pendula* var. *carelica*), различающиеся по текстуре древесины. Определение активности разных форм инвертазы в тканях ствола березы повислой выполнено впервые. В период активного функционирования камбия во флоэме и ксилеме обеих форм березы присутствовали все три формы инвертазы: вакуолярная, цитоплазматическая и апопластная. Отличительной особенностью флоэмы и ксилемы карельской березы являлась высокая активность апопластной инвертазы. Высказано предположение о том, что изменение программы дифференцировки клеток камбиальной зоны карельской березы, ведущее к повышению степени паренхиматизации проводящих тканей, связано с интенсивным гидролизом сахарозы в апопласте. Полученные данные подтверждают появившееся в литературе мнение о возможном участии инвертазы в синтезе компонентов клеточных стенок.

Ключевые слова: *Betula pendula* var. *carelica* — вакуолярная, цитоплазматическая, апопластная инвертазы — сахароза — фруктоза — глюкоза

DOI: 10.7868/S0015330315060068

ВВЕДЕНИЕ

Карельская береза (*Betula pendula* Roth var. *carelica*) — форма березы повислой (*B. pendula* var. *pendula*), у которой в зонах структурных аномалий ствола значительно повышена степень паренхиматизации проводящих тканей. В ходе камбиального роста в этой области происходит изменение программы клеточной дифференцировки: вместо ситовидных трубок флоэмы и сосудов и волокнистых трахеид ксилемы формируются клетки паренхимы [1]. Включения паренхимы придают древесине карельской березы характерный узор.

Деятельность камбия у березы повислой осуществляется за счет притока сахарозы из фотосинтезирующих листьев [1]. Наши исследования показали, что у березы повислой с обычным строением тканей ствола ростовые процессы сосредоточены главным образом в ксилеме, и ее аттрагирующая сила создается за счет высокой активности сахарозосинтазы (СС) [2] — фермента,

расщепляющего сахарозу на УДФ-глюкозу и фруктозу. Это согласуется с широко распространенным мнением о роли СС в формировании клеточных оболочек, а именно, что форма СС, связанная с плазмалеммой, входит в состав целлюлозосинтазного комплекса и поставляет УДФ-глюкозу для синтеза целлюлозы ([3–5] и др.).

У карельской березы активность СС в ксилеме в период деятельности камбия в 2.6 раза ниже по сравнению с обычной березой повислой [2], тем не менее, синтез компонентов клеточных стенок идет достаточно интенсивно, поскольку формирование паренхимы связано с делением веретеновидных клеток камбиальной зоны с помощью большого числа поперечных перегородок [1]. В работе Gerber с соавт. [6] на трансгенных линиях осины с сильно пониженной активностью СС показано, что этот фермент не является специфичным для реакций биосинтеза целлюлозы, но играет важную роль в распределении общего углерода среди полимерных компонентов клеточных стенок. Возможность синтеза клеточных оболочек при подавлении экспрессии генов СС была продемонстрирована и на трансгенных растениях арабидопсиса [7]. В последнем случае предположили, что пополнение пула УДФ-глюкозы в

Сокращения: АпИнв — апопластная инвертаза; ВакИнв — вакуолярная инвертаза; ЦитИнв — цитоплазматическая инвертаза; СС — сахарозосинтаза; ТФЭ — твердофазная экстракция.

Адрес для корреспонденции: Галибина Наталия Алексеевна. 185910 Петрозаводск, ул. Пушкинская, 11. Институт леса КарНЦ РАН. Электронная почта: galibina@krc.karelia.ru

клетках шло с участием гексоз, образующихся при гидролизе сахарозы с помощью инвертазы.

Инвертаза (КФ 3.2.1.26) — это гидролаза, которая расщепляет молекулу сахарозы на две гексозы — глюкозу и фруктозу. В растении обнаружено три формы инвертазы, отличающиеся по своим биохимическим свойствам и месту локализации, — вакуолярная (ВакИнв), цитоплазматическая (ЦитИнв) и апопластная (АпИнв). Показано, во-первых, что формы инвертазы наряду с СС участвуют в создании концентрационного градиента сахарозы в месте разгрузки флоэмы, но основная роль в регуляции ее транспорта у большого числа растений с апопластной разгрузкой принадлежит АпИнв или инвертазе клеточной стенки и, во-вторых, что соотношение активностей разных форм инвертазы определяет преимущественное включение расщепляемой ими сахарозы в те или иные метаболические пути и как следствие оказывает влияние на направление дифференциации производных камбия [7–15]. Следует отметить, что эти работы выполнены главным образом на травянистых растениях. По древесным растениям публикации немногочисленны и стали появляться лишь в последние десять лет [10, 16–18].

Принимая во внимание пониженную активность СС в ксилеме карельской березы [2], мы предположили, что важная роль в метаболизации сахарозы при формировании проводящих тканей этого древесного растения может принадлежать тем или иным формам инвертазы. В настоящей статье представлены данные, характеризующие активности апопластной, вакуолярной и цитоплазматической инвертаз и содержание растворимых сахаров (сахарозы, глюкозы, фруктозы) в тканях ствола двух форм березы, различающихся по текстуре древесины, — обычной березы повислой и карельской березы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Растительный материал и отбор образцов. Как и в предыдущей работе [2], использовали две формы 40-летних деревьев *Betula pendula*: обычную березу повислую (*Betula pendula* Roth var. *pendula*, далее в тексте — обычная береза) и карельскую березу (*B. pendula* var. *carelica*). Деревья обычной березы повислой имели типичную для вида прямослойную древесину со слабо выраженной текстурой. Среди деревьев карельской березы подбирали экземпляры с высокой степенью узорчатости древесины ствола. Все опытные растения произрастали в одинаковых почвенно-климатических условиях на Агробиологической станции Карельского научного центра РАН в 2 км от Петрозаводска (61°45' с.ш., 34°20' в.д.). Ткани для анализа отбирали в области нижней трети ствола, поскольку именно здесь у “узорчатых” растений

карельской березы аномальность строения тканей выражена наиболее ярко.

У березы повислой в условиях Карелии активное функционирование камбия наблюдается, начиная со второй декады июня и до конца июля [1]. В это время основная масса ассимилятов тратится на новообразование клеток камбиальной зоны и рост клеточной стенки. Образцы собирали в июне (21.06) и июле (19.07) 2010 г. В год отбора образцов в связи с отсутствием дождей и высокими температурами в июле наблюдалось преждевременное торможение деятельности камбия [2].

На стволе березы вырезали окошки 20 × 8 см и отделяли кору от древесины. С обнаженной поверхности древесины лезвием бритвы соскабливали ткани ксилемы, включающие материнские клетки ксилемы и наружные слои прироста ксилемы текущего года. С внутренней поверхности коры отделяли ткани, включающие камбиальную зону, проводящую флоэму и самые внутренние слои непроводящей флоэмы. В дальнейшем эти ткани обозначены как “флоэма”. Все образцы просматривали под световым микроскопом. Ткани для анализа брали с пяти растений каждой формы березы.

Микроскопические исследования. После отделения коры от древесины с внутренней поверхности коры и обнаженной поверхности древесины вырезали кубики тканей объемом 3 мм³. Фиксацию тканей проводили в 70% спирте. С помощью замораживающего микротомы Frigomobil (“Reichert-Jung”, Австрия) изготавливали поперечные срезы ксилемы и флоэмы толщиной 15 мкм. Срезы исследовали под микроскопом AxioImager A1 (“Carl Zeiss”, Германия). В ксилеме и флоэме подсчитывали число рядов структурных элементов, сформированных в текущем году и имеющих явные признаки дифференцировки. В ксилеме выделяли зоны, лишенные сосудов, и подсчитывали число рядов волокнистых трахейд с признаками вторичного утолщения оболочек, во флоэме — число рядов ситовидных трубок. Остановку деятельности камбия в июле определяли по сокращению ширины камбиальной зоны и появлению сплюснутых в радиальном направлении клеток ксилемы, создающих контуры ложного годичного кольца.

Срезы ксилемы окрашивали 1% водным раствором сафранина, что позволило выявлять клеточные оболочки, начиная с ранних этапов лигнификации. Анализ срезов проводили в проходящем свете микроскопа.

При изучении слоев проводящей флоэмы использовали метод выявления каллозы в порах ситовидных трубок. Срезы окрашивали 0.005% раствором анилинового голубого в 0.1 М фосфатном буфере, pH 8.0, и исследовали под микроскопом в проходящем свете и в режиме люминесцен-

ции. Светящиеся отложения каллозы имели ярко-голубую окраску.

Биохимические исследования. Ткани растирали в жидком азоте до однородной массы и гомогенизировали при 4°C в буфере в течение 20 мин. Состав буфера: 50 мМ Нерес-буфер (pH 7.5), 1 мМ ЭДТА, 1 мМ ЭГТА, 3 мМ ДТТ, 5 мМ MgCl₂, 0.5 мМ фенилметилсульфонилфторид (PMSF). Полученный гомогенат центрифугировали при 10000 g в течение 20 мин (центрифуга 2-16РК, "Sigma", Германия), осадок троекратно промывали буфером, супернатант объединяли и диализовали при 4°C в течение 18–20 ч против буфера для гомогенизации, разбавленного в 10 раз.

В полученных после диализа ферментативных препаратах свободные гексозы и сахароза не определялись. В осадке определяли апопластную инвертазу, связанную с клеточной стенкой (АпИнв), в супернатанте — вакуолярную (ВакИнв) и цитоплазматическую (ЦитИнв) инвертазы. Активности ферментов определяли после инкубации полученного препарата при 30°C в течение 30 мин. Инкубационная среда для определения активности инвертазы содержала 100 мМ ацетатный буфер (pH 4.7) (АпИнв и ВакИнв) или 50 мМ Нерес-буфер (pH 7.5) (ЦитИнв), концентрация сахарозы — 25 мМ. Количество образовавшейся в процессе инкубации глюкозы определяли глюкозооксидазным методом (набор реагентов "Глюкоза-Агат", Россия). Активность инвертазы выражали в мкмоль распадавшейся сахарозы/г сырой ткани за 30 мин.

Для определения сахаров весь растительный материал сразу после взятия проб замораживали в жидком азоте и лиофильно высушивали. Выделение и экстракцию сахаров проводили по методике, которая подробно была описана ранее [19]. Углеводы дважды экстрагировали 80% этиловым спиртом при 50°C в течение 30 мин. Спиртовые экстракты объединяли и упаривали на водяной бане при температуре 35–40°C. Полученный сухой остаток, содержащий моно-, ди- и олигосахариды, растворяли в 3–5 мл (в зависимости от предполагаемого количества углеводов) бидистиллированной воды и фильтровали через бумажные фильтры. Полученный фильтрат подвергали тщательной очистке методом твердофазной экстракции (ТФЭ) для освобождения от мешающих компонентов, таких как пигменты, полисахариды, различные соли и органические кислоты. Для этого растворы образцов пропускали через мембранные фильтры ($d = 25$ мм, 0.45 мкм, Nylon) ("ProFill", Германия), а потом через картриджи для ТФЭ (NH₂, 500 мг/6 мл, 55 мкм, 70 Å) ("Phenomenex Strata", США).

Содержание растворимых углеводов в экстракте анализировали на ВЭЖХ системе серии Стайер ("Аквилон", Россия) при следующих

условиях: колонка — Rezex RCM-Monosaccharide ("Phenomenex", США), элюент — бидистиллированная вода, скорость потока элюента — 0.6 мл/мин, детектор — рефрактометр. Критерием идентификации пиков служило время удерживания стандартных веществ: сахарозы, глюкозы, фруктозы ("Panreac", Испания). Содержание углеводов выражали в мг/г сухой ткани.

Все исследования проведены на оборудовании ЦКП "Аналитическая лаборатория" ИЛ КарНЦ РАН.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Активность камбия по образованию слоев ксилемы и флоэмы у *B. pendula* var. *pendula* и *B. pendula* var. *carelica*

У обычной березы повислой активность камбия по окружности ствола была примерно одинаковой, поэтому на поперечных микроскопических срезах строение ксилемы и флоэмы вдоль камбиальной зоны почти не менялось. В первый срок фиксации материала (21 июня) у обычной березы прирост ксилемы текущего года составил в среднем 23.2 ± 4.3 ряда волокнистых трахеид с характерными признаками дифференцировки. Во флоэме в это время насчитывалось в среднем 2 ряда ситовидных трубок. У березы повислой реактивация камбия начиналась с дифференцировки клеток флоэмы, непосредственно прилегающих к камбию и зимующих в недифференцированном состоянии. Без дополнительного деления эти клетки сильно вакуолизировались и превращались в ситовидные трубки, функционирование которых обеспечивало ассимилятами дальнейшую камбиальную активность. Таким образом, в первый срок фиксации ситовидные трубки проводящей флоэмы обычной березы, очевидно, представляют собой элементы, сформированные из клеток, которые были отложены камбием в прошлом году.

В зонах структурных аномалий ствола карельской березы деятельность камбия нарушалась. Годичные кольца древесины имели изогнутые очертания. Со стороны коры в древесину вдавались килевидные углубления. На поперечных срезах ксилемы и флоэмы размеры структурных элементов в разных участках среза сильно варьировали, часто они приобретали свилеватую форму, их ориентация могла меняться от вертикальной до поперечной. Все это затрудняло оценку текущих приростов тканей. Тем не менее, можно отметить, что в зонах максимального прироста ксилемы количество рядов структурных элементов близко к тому, что было отмечено для обычной березы; в других участках среза оно было значительно меньше (9–13 рядов). Во флоэме имелись зоны активного деления клеток, где количество сито-

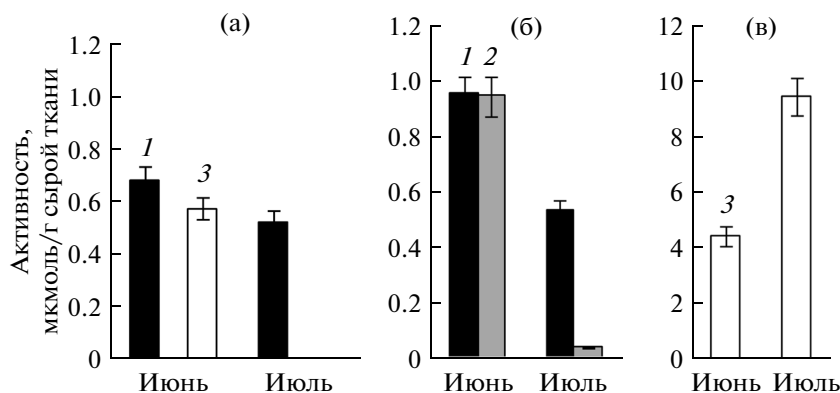


Рис. 1. Активность ферментов метаболизма сахарозы в тканях ксилемы (а) и флоэмы (б, в) у *B. pendula* var. *pendula* в период активного функционирования камбия (июнь) и торможения камбиального роста погодными условиями (июль).

1 — вакуолярная инвертаза; 2 — цитоплазматическая инвертаза; 3 — апопластная инвертаза. Приведены средние значения из пяти биологических повторностей. Бары — стандартное отклонение.

видных трубок было существенно снижено. В этих местах формировался прогиб тканей флоэмы в сторону ксилемы.

Активность инвертазы в ксилеме и флоэме *B. pendula* var. *pendula*

В конце июня, в период активного камбиального роста, в ксилеме обычной березы повислой активны были только кислые инвертазы (вакуолярная и апопластная), активность их составила 0.7 и 0.6 мкмоль распадавшейся сахарозы/г сырой ткани (рис. 1а). В тканях флоэмы в этот период активность внутриклеточных инвертаз (ЦитИнв и ВакИнв) достигала ~1 мкмоль/г сырой ткани (рис. 1б). При этом во флоэме наблюдали высокую активность АпИнв. Значения ее достигали 4.9 мкмоль/г сырой ткани (рис. 1в).

В июле, в период торможения деятельности камбия, в ксилеме березы повислой в 1.3 раза снижалась активность ВакИнв и практически полностью исчезала активность АпИнв (рис. 1а). Во флоэме АпИнв была более активной, чем в июне, значение ее возросло в 2.1 раза (рис. 1в), но при этом снижалась активность ВакИнв (до 0.5 мкмоль/г сырой ткани) и особенно ЦитИнв (почти до 0) (рис. 1б). Снижение активностей двух последних форм инвертазы соответствовало затуханию процессов роста клеток растяжением.

Активность инвертазы в ксилеме и флоэме *B. pendula* var. *carelica*

В период активного камбиального роста в ксилеме карельской березы, по сравнению с обычной березой, активность всех форм инвертаз была выше. Значения ее для АпИнв, ВакИнв и ЦитИнв достигали, соответственно, 2.5, 1.2 и 0.8 мкмоль/г

сырой ткани (рис. 2а). Во флоэме карельской березы в этот период активность АпИнв превышала таковую во флоэме обычной березы повислой и достигала 10.4 мкмоль/г сырой ткани (рис. 2в). Еще одна отличительная особенность карельской березы — это высокая активность во флоэме вакуолярной инвертазы. В июне ее значения были в 4 раза выше у карельской березы по сравнению с таковыми у обычной березы повислой (рис. 2б).

В июле у карельской березы, как и у повислой, в ксилеме существенно снизилась активность всех форм инвертаз (рис. 2а), а во флоэме активности ВакИнв и ЦитИнв (рис. 2б). Активность АпИнв во флоэме карельской березы оставалась почти такой же высокой, как в июне, и составила 9.4 мкмоль/г сырой ткани (рис. 2в).

Содержание сахаров в тканях ствола *B. pendula* var. *pendula*

В тканях ксилемы в период активного камбиального роста основное количество сахаров было представлено сахарозой и составило 70.1 мг/г (рис. 3а). Содержание гексоз (суммарное количество глюкозы и фруктозы) достигало 23.8 мг/г, при этом количество фруктозы было в 1.3. раза больше, чем глюкозы (рис. 3б). В тканях флоэмы по сравнению с ксилемой содержание сахарозы было значительно более высоким (144.6 мг/г), при этом содержание моносахаров (глюкозы и фруктозы) было примерно в 2 раза меньше (рис. 3в, 3г).

В июле количество сахарозы как в ксилеме, так и во флоэме практически не изменилось (рис. 3а, 3в). В ксилеме в июле содержание гексоз снизилось до 17.4 мг/г, а соотношение фруктоза/глюкоза стало близко к единице (рис. 3б). Во

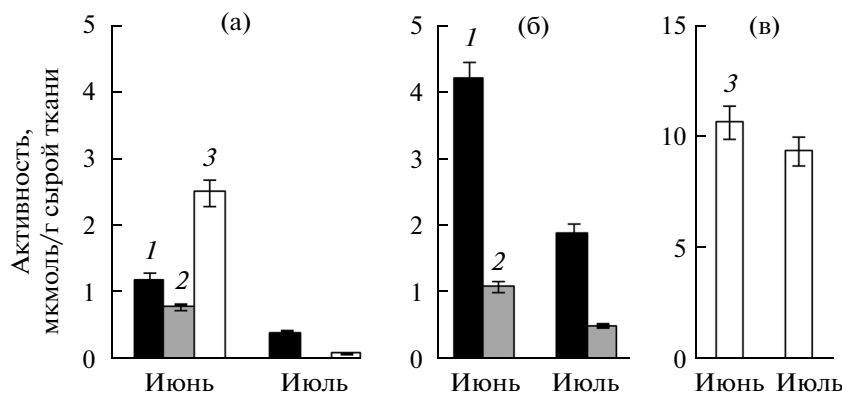


Рис. 2. Активность ферментов метаболизма сахарозы в тканях ксилемы (а) и флоэмы (б, в) у *B. pendula* var. *carelica* в период активного функционирования камбия (июнь) и торможения камбиального роста погодными условиями (июль). Обозначения, как на рис. 1.

флоэме временное торможение камбиальной активности не привело к существенному изменению в содержании моносахаров, а соотношение фруктоза/глюкоза, как и в июне, было ~ 1 (рис. 3г).

Содержание сахаров в тканях ствола *B. pendula* var. *carelica*

В ксилеме у карельской березы в период активного камбиального роста содержание сахарозы и особенно моносахаров было выше, по сравнению с обычной березой, и составило 81.4 и 46.2 мг/г соответственно. Торможение камбиальной активности в июле сопровождалось увеличением содержания сахарозы до 102.5 мг/г и снижением количества моносахаров до 28.5 мг/г. При этом соотношение фруктоза/глюкоза в ксилеме на протяжении всего периода исследования у карельской березы было близко к 1, в отличие от обычной березы (рис. 4а, 4б).

В тканях флоэмы у карельской березы динамика содержания сахаров отличалась от таковой у обычной березы. В период активного камбиального роста было меньше сахарозы (104.5 мг/г) и больше моносахаров (19.3 мг/г), при этом количество фруктозы преобладало над глюкозой в 1.4 раза. При торможении ростовых процессов в камбии количество сахарозы во флоэме возросло в 2 раза, и содержание фруктозы снизилось в 1.6 раз и при этом соотношение фруктоза/глюкоза стало ~ 1 (рис. 4в, 4г).

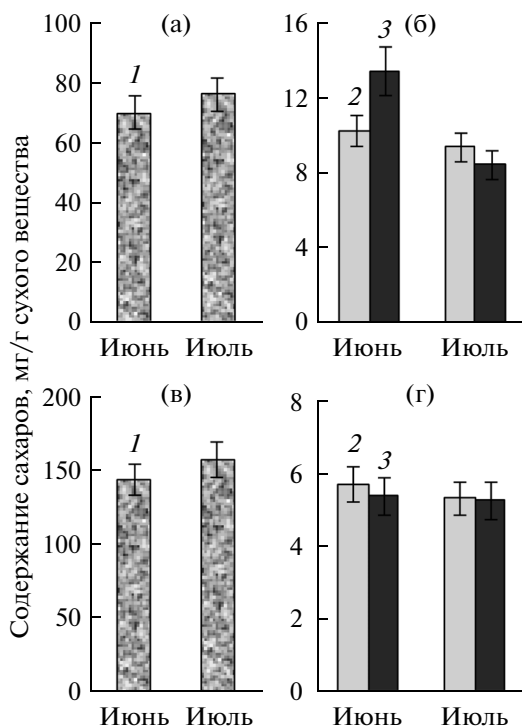


Рис. 3. Содержание сахаров в тканях ствола *B. pendula* var. *pendula* в период активного функционирования камбия (июнь) и торможения камбиального роста погодными условиями (июль).

а, в — сахароза (1); б, г — глюкоза (2) и фруктоза (3) в ксилеме (а, б) и флоэме (в, г). Приведены средние значения из пяти биологических повторностей. Бары — стандартное отклонение.

ОБСУЖДЕНИЕ

В июне—июле фотосинтезирующие листья становятся донорами ассимилятов. У обычной березы основным местом потребления ассимилятов являются растущие и дифференцирующиеся клетки ксилемы [1]. Микроскопический анализ показал, что в июне у обычной березы наблюдалось нормальное для данного периода течение ростовых процессов — наибольшая их активность была сосредоточена в ксилеме, из чего можно заключить, что основной фонд поступающих ассимилятов (сахарозы) расходовался на прирост древесины.

Наряду с данными микроскопического анализа для характеристики интенсивности ростовых процессов в камбиальной зоне мы рассмотрели изменение отношения фруктоза/глюкоза. Неоднократно было показано на растениях *Pinus sylvestris* [20], *Sasa palmata* [21] и других объектах, что в камбии в период активного роста содержание фруктозы значительно превышало содержание глюкозы, из чего следует, что в зонах активного деления и растяжения клеток глюкоза быстрее расходуется в метаболических процессах. В зоне утолщения клеточных оболочек, где рост клеток уже прекращался, отношение фруктоза/глюкоза становилось равным 1 [20, 21].

В ксилеме обычной березы в июне отношение фруктоза/глюкоза было >1 , во флоэме — равно 1 (рис. 3б, 3г), что указывает на преимущественные ростовые процессы со стороны ксилемы. У карельской березы в этот период ситуация прямо противоположная: в ксилеме отношение фруктоза/глюкоза равно 1, во флоэме этот показатель >1 (рис. 4б, 4г). Это может означать, что у карельской березы в июне ростовые процессы были преимущественно со стороны флоэмы. Сделанные выводы находятся в соответствии с величиной градиента сахарозы между флоэмой и ксилемой у двух форм березы. У обычной березы этот показатель $(144.6 - 70.1 = 74.5 \text{ мг/г})$ (рис. 3а, 3в) в 3.2 раза больше, чем у карельской березы $(104.5 - 81.4 = 23.1 \text{ мг/г})$ (рис. 4а, 4в). Таким образом, у обычной березы происходит интенсивный отток сахарозы из флоэмы в ксилему, где она расходуется на формирование структурных элементов древесины, а у карельской березы отток сахарозы из флоэмы замедлен и ее использование в значительной степени происходит во флоэме.

На отношение фруктоза/глюкоза, помимо интенсивности использования гексоз в растущих тканях, влияет также соотношение активности инвертаз и СС, поскольку инвертаза дает одинаковый выход глюкозы и фруктозы, а СС участвует только в образовании фруктозы. Ранее мы установили, что у обычной березы формирование ксилемы связано с высокой активностью СС [2], что, возможно, является одной из причин преувеличения содержания фруктозы над глюкозой в этой ткани.

Продуктом реакции СС кроме фруктозы является УДФ-глюкоза, играющая важную роль в синтезе полимерных компонентов клеточных стенок [4, 6, 9, 22–24]. Поскольку СС — это цитоплазматический фермент, можно предположить, что у обычной березы разгрузка ситовидных трубок и латеральный транспорт сахарозы до зоны роста и развития ксилемы осуществляются главным образом по симпласту. На это указывает значительное преобладание в ксилеме сахарозы над гексозами (в июне уровень сахарозы — 70.1 мг/г , глюко-

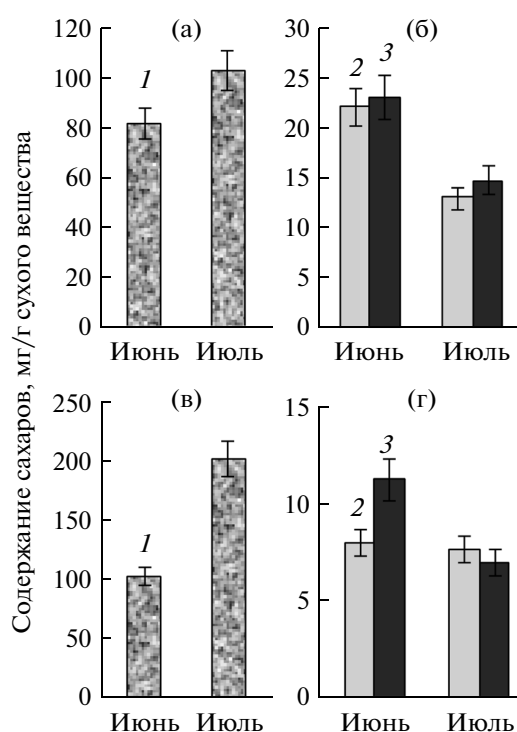


Рис. 4. Содержание сахаров в тканях ствола *B. pendula* var. *carelica* в период активного функционирования камбия (июнь) и торможения камбиального роста погодными условиями (июль). Обозначения, как на рис. 3.

зы — 10.3 мг/г , фруктозы — 13.5 мг/г) (рис. 3а, 3б), а также очень низкая активность АпИнв ($0.6 \text{ мкмоль/г сырой ткани}$) (рис. 1а) по сравнению с активностью СС ($18.6 \text{ мкмоль/г сырой ткани}$) [2]. Во флоэме у обычной березы на фоне высокого содержания сахарозы активность ферментов ее метаболизации и количество гексоз были ниже по сравнению с ксилемой. Это указывает на основную функцию клеток флоэмы в этот период — обеспечение транспорта ассимилятов в зону дифференциации ксилемы.

У карельской березы в июне активность СС в ксилеме была в 2.6 раза ниже, чем у обычной березы [2], при этом уровень сахарозы был выше лишь в 1.3 раза (рис. 4а). Последнее можно объяснить деятельностью инвертаз, суммарная активность которых по сравнению с обычной березой была в 3.6 раза выше. Особенно высоких значений достигала активность АпИнв (рис. 2а). Повышенная активность инвертазы клеточной стенки указывает на то, что сахароза выходит в апопласт, т.е. кроме отмеченных выше отличий можно предположить, что у карельской березы изменяется способ разгрузки флоэмы — в дополнение к симпластному пути, как у обычной березы, появляется апопластный путь. Более высокая активность ВаКИнв и ЦитИнв в дифференцирующейся

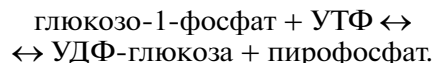
ксилеме карельской березы (рис. 2а) предполагает повышение внутриклеточного уровня сахарозы. Таким образом, в ксилеме карельской березы в период активного камбиального роста меньшая метаболизация сахарозы по сахарозосинтазному пути компенсируется увеличением ее метаболизации по инвертазному пути.

Во флоэме карельской березы суммарная активность инвертаз в 2.5 раза выше, чем у обычной березы, причем, как и в ксилеме, основная доля активности здесь приходится на АпИнв. Более того, из всех проведенных в настоящем исследовании измерений абсолютное значение активности АпИнв в данном случае было самым высоким (10.7 мкмоль/г сырой ткани) (рис. 2в), что наблюдалось и для ВакИнв (4.2 мкмоль/г сырой ткани) (рис. 2б).

Объяснение причин выявленных особенностей метаболического статуса тканей ствола карельской березы возможно по двум сценариям. Первый сценарий: пониженная акцептирующая активность СС в ксилеме уменьшает отток сахарозы из флоэмы, следствием чего становится повышение во флоэме уровня дисахарида и, соответственно, активности инвертаз. И, наоборот, второй сценарий подразумевает, что повышенная активность инвертаз во флоэме уменьшает количество сахарозы, поступающей в ксилему, что приводит к снижению активности СС. Вторым вариантом развития событий требует ответа на вопрос: является ли повышение активности инвертаз во флоэме следствием усиления притока сахарозы из листьев. С другой стороны, следует иметь в виду, что инвертаза клеточной стенки сама может усиливать приток сахаров в зоны разгрузки, способствуя выходу сахарозы из ситовидных элементов проводящей флоэмы и поддержанию концентрационного градиента между донором (фотосинтезирующие листья) и акцептором (камбиальная зона) ассимилятов, регулируя тем самым дальний транспорт сахаров [8–10]. Ответы на поставленные вопросы мы предполагаем найти в ходе дальнейших исследований.

Очень долго господствовало представление о том, что синтез полисахаридов клеточных стенок в основном осуществляется с помощью СС, мембраносвязанная форма которой образует комплекс с целлюлозосинтазой, что дает возможность прямого использования УДФ-глюкозы для биосинтеза целлюлозы [3, 25–27]. В последнее время появились работы, в которых показано, что рост и формирование клеточных стенок могут идти при полном ингибировании СС [6, 7, 28], тогда как отсутствие у трансгенных растений *Arabidopsis thaliana* 2 из 9 изоформ нейтральных инвертаз приводит к сильному ингибированию роста [7]. Известно, что в образовании УДФ-глюкозы наря-

ду с СС принимает участие УДФ-глюкоза-пирофосфорилаза:



При этом пул глюкозо-1-фосфата через ряд последовательных реакций (рис. 5) пополняется за счет глюкозы, образующейся при метаболизации сахарозы инвертазой. На растениях тополя было показано, что экспрессия гена УДФ-глюкоза-пирофосфорилазы повышается на конечной стадии роста клетки в период формирования вторичной клеточной стенки [29], что согласуется с предположением об участии этого фермента в обеспечении клетки субстратом для синтеза компонентов клеточной оболочки. Учитывая результаты, полученные на карельской березе, нельзя исключить, что гексозы, необходимые для синтеза УДФ-глюкозы, могут поступать в клетку из апопласта, где они образуются в ходе реакции, катализируемой АпИнв. Изменение соотношения активности СС и АпИнв на этапе синтеза клеточной стенки должно отразиться на составе полимерных компонентов клеточных оболочек [6, 27]. Результаты химического анализа показали, что в составе клеточных стенок карельской березы, по сравнению с обычной березой, содержалось на 13% меньше целлюлозы и на 6% больше лигнина (наши неопубликованные данные).

В июле погодные условия вызвали остановку деятельности камбия. Прекращение камбиального роста нашло отражение в величине отношения фруктоза/глюкоза в ксилеме и флоэме, которое стало равно 1. В этих условиях запрос на ассимиляты со стороны ксилемы сильно ослабевает, что подтверждается снижением активности СС у обычной березы в 27 раз, у карельской – в 3 раза [2]. У обычной березы снижение запроса на сахарозу со стороны ксилемы сопровождалось 2-кратным увеличением активности АпИнв во флоэме (рис. 1в). Возросшая активность АпИнв, очевидно, является причиной того, что уровень сахарозы во флоэме обычной березы по сравнению с июнем увеличился незначительно. Сходство путей метаболизации сахарозы в тканях ствола обычной березы в период торможения камбиального роста (июль) и карельской березы в период активных ростовых процессов (июнь) свидетельствует в пользу предположения о том, что высокая активность АпИнв во флоэме карельской березы является следствием пониженной аттрагирующей способности ксилемы, вызванной низкой активностью СС.

У карельской березы в июле содержание сахарозы во флоэме увеличилось в 2 раза (рис. 4в), в ксилеме в 1.3 раза (рис. 4а). Это привело к увеличению градиента сахарозы между флоэмой и ксилемой, который по сравнению с июнем стал в 5 раз больше. Учитывая низкую активность всех форм

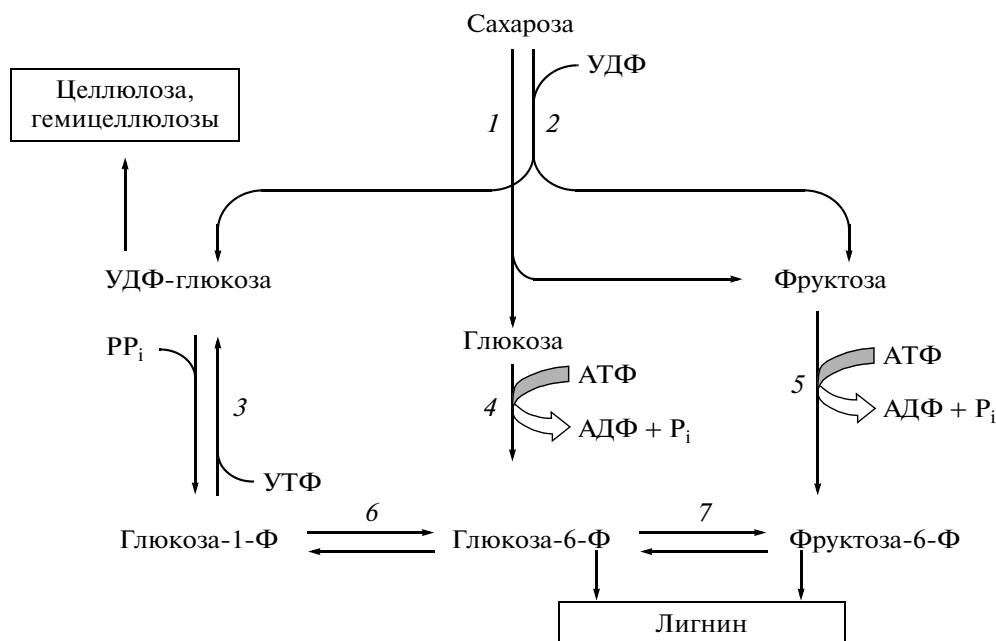


Рис. 5. Участие ферментов в путях метаболизма сахарозы в акцепторной клетке, приводящих к распределению углерода в компонентах клеточной стенки.

1 — инвертаза; 2 — сахарозосинтаза; 3 — УДФГ-пирофосфорилаза; 4 — гексокиназа; 5 — фруктокиназа; 6 — фосфоглюкомутаза; 7 — глюкозофосфатизомераза.

инвертаз в ксилеме в этот период (рис. 2а), можно заключить, что поддержание градиента сахарозы со стороны ксилемы осуществлялось за счет СС, активность которой, как было отмечено выше, хоть и снизилась, но в 9 раз слабее, чем у обычной березы.

С прекращением клеточных делений в камбиальной зоне меняется основной путь утилизации сахарозы: ее преимущественное использование на новообразование клеток сменяется тратой в реакциях “запасного метаболизма” и вторичного утолщения клеточных стенок. В наших предыдущих исследованиях было установлено, что по сравнению с обычной березой в тканях ксилемы карельской березы на фоне высокой активности пероксидазы [30] повышается жесткость структуры клеточной стенки за счет увеличения доли компонентов фенольной природы как в составе лигнина, так и в виде поперечных диферуловых мостиков [31].

В заключение необходимо отметить, что данные о распределении в тканях ствола сахаров и активности инвертаз, представленные в настоящей статье, и результаты выполненного ранее исследования активности СС [2] позволили выявить существенные отличия в путях метаболизации сахарозы у обычной березы и карельской березы в период камбиального роста. Наиболее важными из них являются следующие. Во-пер-

вых, формирование древесины у обычной березы идет на фоне высокой активности СС, и, следовательно, синтеза УДФ-глюкозы и фруктозы. Во-вторых, у карельской березы активность СС в ксилеме понижена, в то же время отмечена высокая активность АпИнв в ксилеме и особенно во флоэме, что ведет к усиленной генерации в них гексоз. Полученные данные свидетельствуют о том, что изменение программы дифференцировки клеток камбиальной зоны карельской березы, ведущее к повышению степени паренхиматизации проводящих тканей, связано с интенсивным гидролизом сахарозы в апопласте. Повышенная активность АпИнв в тканях ствола карельской березы в период камбиального роста на фоне сниженной активности СС подтверждает высказанные другими авторами предположения [6, 7, 28] о возможном участии инвертазы в синтезе компонентов клеточных стенок.

Выражаем благодарность И.Н. Софроновой за помощь в проведении биохимических исследований.

Работа выполнена в рамках государственного задания ИЛ КарНЦ РАН — 2014-2016, при поддержке грантов Российского фонда фундаментальных исследований (№ 09-04-01643, № 09-04-90735-моб_ст, № 10-04-90834-моб_ст) и проекта Программы фундаментальных исследований Президиума РАН “Живая природа: современное со-

стояние и проблемы развития” (п/программа “Биоразнообразие: состояние и динамика”).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Новицкая Л.Л. Карельская береза: механизмы роста и развития структурных аномалий. Петрозаводск, 2008. 144 с.
2. Галибина Н.А., Новицкая Л.Л., Красавина М.С., Мошеченская Ю.Л. Активность сахарозосинтазы в тканях ствола карельской березы в период камбиального роста // Физиология растений. 2015. Т. 62. № 3. С. 410–419.
3. Amor Y., Haigler C.H., Johnson S., Wainscott M., Delmer D.P. A membrane-associated form of sucrose synthase and its potential role in synthesis of cellulose and callose in plants // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1995. V. 92/93. P. 53–57.
4. Ruan Y.L., Llewellyn D.J., Furbank R.T. Suppression of sucrose synthase gene expression represses cotton fiber cell initiation, elongation, and seed development // Plant Cell Online. 2003. V. 15. P. 952–964.
5. Song D.L., Shen J.H., Li L.G. Characterization of cellulose synthase complexes in *Populus* xylem differentiation // New Phytol. 2010. V. 187. P. 777–790.
6. Gerber L., Zhang B., Roach M., Rende U., Gorzsas A., Kumar M., Burgert I., Niittylla T., Sundberg B. Deficient sucrose synthase activity in developing wood does not specifically affect cellulose biosynthesis, but causes an overall decrease in cell wall polymers // New Phytol. 2014. V. 203. P. 1220–1230.
7. Barratt D.H., Derbyshire P., Findlay K., Pike M., Wellner N., Lunn J., Feil R., Simpson C., Maule A.J., Smith A.M. Normal growth of *Arabidopsis* requires cytosolic invertase but not sucrose synthase // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2009. V. 106. P. 13 124–13 129.
8. Carlson S.C., Chourey P.S. A re-evaluation of the relative roles of two invertases, INCW2 and IVR1, in developing maize kernels and other tissues // Plant Physiol. 1999. V. 121. P. 1025–1035.
9. Sturm A., Tang G.Q. The sucrose-cleaving enzymes of plants are crucial for development, growth and carbon partitioning // Trends Plant Sci. 1999. V. 4. P. 401–407.
10. Iraqi D., Le V.Q., Lamhamedi M.S., Tremblay F.M. Sucrose utilization during somatic embryo development in black spruce: involvement of apoplastic invertase in the tissue and of extracellular invertase in the medium // J. Plant Physiol. 2005. V. 162. P. 115–124.
11. Cho J.I., Lee S.K., Ko S.H., Kim H.K., Jun S.H., Lee Y.H., Bhoo S.H., Lee K.W., An G., Hahn T.R., Jeon J.S. Molecular cloning and expression analysis of the cell-wall invertase gene family in rice (*Oryza sativa* L.) // Plant Cell Rep. 2005. V. 24. P. 225–236.
12. Koonjul P.K., Minhas J.S., Nunes C., Sheoran I.S., Saini H.S. Selective transcriptional down-regulation of anther invertase precedes the failure of pollen development in water-stressed wheat // J. Exp. Bot. 2005. V. 56. P. 179–190.
13. Godt D.E., Roitsch T. The developmental and organ specific expression of sucrose cleaving enzymes in sugar beet suggests a transition between apoplastic and symplasmic phloem unloading in the tap roots // Plant Physiol. Biochem. 2006. V. 44. P. 656–665.
14. Jia L., Zhang B., Mao C., Li J., Wu Y., Wu P., Wu Z. OsCYT-INV1 for alkaline/neutral invertase is involved in root cell development and reproductivity in rice (*Oryza sativa* L.) // Planta. 2008. V. 228. P. 51–59.
15. Welham T., Pike J., Horst I., Flemetakis E., Katinakis P., Kaneko T., Sato S., Tabata S., Perry J., Parniske M., Wang T.L. A cytosolic invertase is required for normal growth and cell development in the model legume, *Lotus japonicus* // J. Exp. Bot. 2009. V. 60. P. 3353–3365.
16. Maurel K., Leite G.B., Bonhomme M., Guillot A., Rageau R., Petel G., Sakr S. Trophic control of bud break in peach (*Prunus persica*) trees: a possible role of hexoses // Tree Physiol. 2004. V. 24. P. 579–588.
17. Bock P.N., Morse A.M., Dervinis C., Davis J.M. Evolution and diversity of invertase genes in *Populus trichocarpa* // Planta. 2008. V. 227. P. 565–576.
18. Canam T., Mak S.W.Y., Mansfield S.D. Spatial and temporal expression profiling of cell-wall invertase genes during early development in hybrid poplar // Tree Physiol. 2008. V. 28. P. 1059–1067.
19. Галибина Н.А., Новицкая Л.Л., Софронова И.Н. Динамика сахаров в тканях ствола *Betula pendula* (Betulaceae) при выходе из зимнего покоя // Растит. ресурсы. 2012. Т. 48. С. 554–564.
20. Uggla C., Magel E., Moritz T., Sundberg B. Function and dynamics of auxin and carbohydrates during early-wood/latewood transition in Scots pine // Plant Physiol. 2001. V. 125. P. 2029–2039.
21. Magel E., Kruse S., Lütje G., Liese W. Soluble carbohydrates and acid invertases involved in the rapid growth of developing culms in *Sasa palmata* (Bean) Camus // Bamboo Sci. Cult. J. Am. Bamboo Soc. 2006. V. 19. P. 23–29.
22. Winter H., Huber U. Regulation of sucrose metabolism in higher plants: localization and regulation of activity of key enzymes // Crit. Rev. Plant Sci. 2000. V. 19. P. 31–67.
23. Tuskan G.A., Difazio S., Jansson S., Bohlmann J., Grigoriev I., Hellsten U., Putnam N., Ralph S., Rombauts S., Salamov A. The genome of black cottonwood *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray) // Science. 2006. V. 313. P. 1596–1604.
24. An X., Chen Zh., Wang J., Ye M., Ji L., Wang J., Liao W., Ma H. Identification and characterization of the *Populus* sucrose synthase gene family // Gene. 2014. V. 539. P. 58–67.
25. Haigler C.H., Ivanova-Datcheva M., Hogan P.S., Salnikov V.V., Hwang S., Martin K., Delmer D.P. Carbon partitioning to cellulose synthesis // Plant Mol. Biol. 2001. V. 47. P. 29–51.
26. Koch K.E. Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development // Curr. Opin. Plant Biol. 2004. V. 7. P. 235–246.

27. Coleman H.D., Yan J., Mansfield S.D. Sucrose synthase affects carbon partitioning to increase cellulose production and altered cell wall ultrastructure // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2009. V. 106. P. 13 118–13 123.
28. Bieniawska Z., Barratt D.H.P., Garlick A.P., Thole V., Kruger N.J., Martin C., Zrenner R., Smith A.M. Analysis of the sucrose synthase gene family in Arabidopsis // Plant J. 2007. V. 49. P. 810–828.
29. Hertzberg M., Aspeborg H., Schrader J., Andersson A., Erlandsson R., Blomqvist K., Bhalerao R., Uhlen M., Teeri T.T., Lundeberg J., Sundberg B., Nilsson P., Sandberg G. A transcriptional roadmap to wood formation // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2001. V. 98. P. 14732–14737.
30. Галибина Н.А., Целищева Ю.Л., Андреев В.П., Софронова И.Н., Никерова К.М. Активность пероксидазы в органах и тканях деревьев березы повислой // Уч. записки ПетрГУ. Сер. Естественные и технические науки. 2013. № 4. С. 7–13.
31. Галибина Н.А., Теребова Е.Н. Физико-химические свойства клеточных стенок тканей ствола деревьев *Betula pendula* Roth // Уч. записки ПетрГУ. Сер. Естественные и технические науки. 2014. № 4. С. 19–25.