

На правах рукописи



ГАЛИБИНА Наталия Алексеевна

**ЭНДОГЕННЫЕ МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ КСИЛОГЕНЕЗА
У ДРЕВЕСНЫХ РАСТЕНИЙ
НА ПРИМЕРЕ ДВУХ ФОРМ БЕРЕЗЫ ПОВИСЛОЙ**

03.01.05 – «Физиология и биохимия растений»

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

доктора биологических наук

Санкт-Петербург – 2018

Работа выполнена в Институте леса – обособленном подразделении Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра "Карельский научный центр Российской академии наук"

Научный консультант

доктор биологических наук
НОВИЦКАЯ Людмила Людвиговна

Официальные оппоненты:

КОСОБРЮХОВ Анатолий Александрович,
доктор биологических наук,
Федеральное государственное бюджетное
учреждение науки Институт фундаментальных
проблем биологии Российской академии наук,
руководитель группы

НОВИКОВА Галина Викторовна,
доктор биологических наук, профессор,
Федеральное государственное бюджетное
учреждение науки Институт физиологии
растений им. К.А. Тимирязева
Российской академии наук,
ведущий научный сотрудник

ЧИКОВ Владимир Иванович,
доктор биологических наук, профессор,
Федеральное государственное бюджетное
учреждение науки Казанский институт
биохимии и биофизики Казанского
научного центра Российской академии наук,
заведующий лабораторией

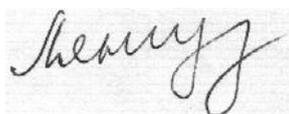
Ведущая организация: Институт леса им. В.Н. Сукачева Сибирского отделения Российской академии наук – обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук».

Защита состоится 17 октября 2018 года в 14:00 на заседании диссертационного совета Д002.211.02 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Ботаническом институте им. В.Л. Комарова Российской академии наук по адресу: 197376, Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д. 2.
Тел. (812)372-54-42, факс (812)372-54-43, disssovet.d00221102@binran.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального государственного бюджетного учреждения науки Ботанического института им. В.Л. Комарова Российской академии наук.

Автореферат разослан “ ” июня 2018 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук



Лянгузова Ирина Владимировна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Древесные растения являются основными продуцентами в лесных экосистемах, а древесина представляет собой важный возобновляемый источник органического углерода. Ксилогенез – процесс формирования древесины (ксилемы) играет ключевую роль в повышении продуктивности лесов. Ксилогенез включает в себя образование структурных элементов ксилемы, которые выполняют разные функции и отличаются между собой по составу компонентов их клеточных стенок. Структурные особенности ксилемы определяют ее физико-механические, технологические, топливные и декоративные свойства. В данной связи поиск путей эффективного управления ксилогенезом актуален как с точки зрения повышения продуктивности растений, так и получения древесины с заданными свойствами.

Карельская береза (*B. pendula* Roth var. *carelica* (Mercl.) Hämet-Ahti), форма березы повислой, представляет собой уникальный объект исследования для познания механизмов морфогенеза древесных растений. Для древесины березы характерен широкий спектр разнообразия структурных элементов: она состоит из сосудов, волокнистых трахеид, волокнистых элементов, приближенных по структуре к волокнам либриформа, и клеток паренхимы. Из всех древесных пород структурные аномалии древесины выражены у карельской березы наиболее ярко, характеризуются большим разнообразием проявления в онтогенезе и высоким уровнем эндогенной изменчивости; их появление, развитие и затухание зависят от воздействия факторов среды (Новицкая, 2008; Novitskaya et al., 2016).

Оригинальная текстура древесины карельской березы формируется в результате отклонений 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).

Камбий – это гетеротрофная ткань, его деятельность осуществляется за счет притока из фотосинтезирующих листьев сахарозы – основной транспортной формы сахаров у березы повислой (Новицкая и др., 2015). Утилизация сахарозы в акцепторных тканях происходит при участии ферментов ее гидролиза – инвертазы (Инв) и сахарозосинтазы (СС) (Курсанов, 1976; Sturm, Tang, 1999; Koch, 2002 и др.). СС присутствует в растении повсеместно, но наибольшая ее активность обнаружена в акцепторных тканях (Coleman et al., 2008). Мембраносвязанная форма сахарозосинтазы образует комплекс с целлюлозосинтазой (Sturm, Tang, 1999; Winter, Huber, 2000; Ruan et al., 2003), что дает возможность прямого использования образуемой в результате активности СС УДФ-глюкозы для биосинтеза целлюлозы. Инвертаза расщепляет молекулу сахарозы на две гексозы – глюкозу и фруктозу. Известны три формы инвертазы – вакуолярная (ВакИнв), цитоплазматическая (ЦитИнв) и апопластная (АпИнв), которые отличаются по своим биохимическим свойствам, месту локализации и, следовательно, выполняемым функциям. В настоящее время функции Инв и СС и пути их регуляции достаточно хорошо изучены на примере травянистых растений (Павлинова, 1971; Павлинова, Прасолова, 1972; Курсанов, 1976; Курсанов и др., 1989; Брускова и др., 2009; Morell, Copeland, 1985; Sander et al., 1996; Springer et al., 1986; Suzuki et al., 1996; Xu et al., 1996; Sturm, 1999;

Sturm, Tang, 1999; Winter, Huber, 2000; Haigler et al., 2001; Albrecht, Mustroph, 2003; Sherson et al., 2003; Matic et al., 2004; Duncan, Huber, 2007; Fan et al., 2009; Persia et al., 2008; Fujii et al., 2010; Zhang et al., 2011; Chen et al., 2015; Palmer et al., 2015; Wei et al., 2015; Nguyen et al., 2016; Tang et al., 2017 и др.). По древесным растениям публикации немногочисленны и стали появляться лишь в последние 10-15 лет (Iraqi et al., 2005; Maurel et al., 2004; Geisler-Lee et al., 2006; Wocock et al., 2008; Canam et al., 2008; Coleman et al., 2009; Zhang et al., 2011; Chen et al., 2015; Xiao et al., 2014; An et al., 2014; Gerber et al., 2014). Слабо изученным остается участие ферментов метаболизации сахарозы в процессах ксилогенеза. Исходя из известного влияния соотношения активности СС и разных форм Инв на преимущественное включение расщепляемой ими сахарозы в те или иные метаболические пути (Roitsch et al., 1995; Barratt et al., 2009; Carlson, Chourey, 1999; Andersen et al., 2002; Heyer et al., 2004; Koch, 2004; Iraqi et al., 2005; Cho et al., 2005; Koonjul et al., 2005; Godt, Roitsch et al., 2000; Jia et al., 2008; Welham et al., 2009 и др.), можно предположить, что этот показатель воздействует на направление дифференциации производных камбия.

В последнее время все больше внимания уделяется изучению молекулярно-генетических механизмов, лежащих в основе регуляции деятельности меристем. К таким механизмам относится синтез CLE-пептидов группы В (CLE-41, CLE-42, CLE-44). CLE пептид TDIF (TRIFEARLY ELEMENT DIFFERENTIATION INHIBITORY FACTOR) и его богатая лейцином рецептор-подобная киназа (LRR-RLK) TDR (TDIF РЕСЕРТОР) являются сигнальными компонентами, которые регулируют камбиальную активность и препятствуют дифференцировке трахеальных элементов (Додуева и др., 2012, 2014; Ito et al., 2006; Fisher, Turner, 2007; Hirakawa et al., 2008; Whitford et al., 2008; Du, Groover, 2010; Etchells, Turner, 2010; Etchells et al., 2012, 2013, 2015; Ye, Zhong, 2015; Nieminen et al., 2015). Имеющиеся в литературе данные свидетельствуют, что различные манипуляции с CLE-TDR могут приводить к увеличению продуктивности древесных растений, а также изменению строения проводящих тканей (Etchells, Turner, 2010; Etchells et al., 2012, 2013, 2015).

Основа структурных и функциональных различий между клетками одного и того же организма – это дифференциальная активность генома, которую регулируют транскрипционные факторы (Медведев, Шарова, 2010). Непосредственный контроль за дифференцировкой элементов ксилемы и флоэмы осуществляют транскрипционные факторы VND6, VND7 с NAC-доменом (VASCULAR-RELATED NAC-DOMAIN), регулирующие синтез вторичной клеточной стенки, развитие и дифференцировку клеток ксилемы, и APL (ALTERED PHLOEM DEVELOPMENT, MYB-белки), который играет роль в развитии флоэмы (Bonke et al., 2003; Kubo et al., 2005; Sieburth, Deyholos, 2006; Truernit et al., 2008; Du, Groover, 2010; Ohashi-Ito et al., 2010; Yamaguchi et al., 2010; Escamez, Tuominen, 2014; Pesquet et al., 2013; Neo et al., 2014; Truernit, 2014; Rodriguez-Villalon et al., 2014; Nieminen et al., 2015; Kondo et al., 2015, 2016). Как правило, авторы рассматривают функции транскрипционных факторов применительно к развитию первичных проводящих тканей ствола и не затрагивают формирование вторичных проводящих тканей.

Таким образом, изучение физиолого-биохимических и молекулярно-генетических закономерностей деятельности камбия на примере карельской березы актуально не только с точки зрения поиска путей эффективного управления ксилогенезом, но является важным для познания механизмов деления, роста и дифференцировки клеток камбиальной зоны древесных растений.

Цель и задачи исследования.

Цель работы состоит в изучении эндогенных механизмов роста и дифференцировки камбиальных производных у двух форм березы повислой, различающихся по структуре древесины.

Для достижения цели необходимо решить следующие задачи:

- изучить годичную динамику сахарозы и активность ферментов ее метаболизации в тканях ствола двух форм березы повислой, различающихся по структуре древесины;
- исследовать пути метаболизации сахарозы в камбиальной зоне карельской березы при формировании древесины с разной степенью узорчатости;
- изучить регуляцию активности сахарозосинтазы и апопластной инвертазы на транскрипционном и посттрансляционном уровнях в камбиальной зоне при разных сценариях ксилогенеза;
- выявить участие сахарозосинтазы в синтезе целлюлозы и крахмала в период камбиального роста при разных сценариях ксилогенеза;
- сравнить активность ферментов утилизации сахарозы у сеянцев двух форм березы повислой;
- оценить участие CLE-пептидов группы В (CLE-41) и транскрипционных факторов, контролирующих дифференцировку элементов ксилемы (VND6, VND7) и флоэмы (APL), в формировании аномальной ксилемы карельской березы;
- выявить влияние почвенного азота на активность ферментов метаболизации сахарозы при разных сценариях ксилогенеза.

Научная новизна. Впервые изучено распределение активности ферментов, метаболизирующих основную транспортную форму углеводов у растений – сахарозу (три формы инвертазы, сахарозосинтаза), в проводящих тканях и камбиальной зоне двух форм березы повислой (*Betula pendula* Roth) при разных сценариях ксилогенеза.

На растениях разного возраста обычной березы повислой (*B. pendula* var. *pendula*, далее обычная береза), у которой формируется нормальная по строению древесина, и карельской березы (*B. pendula* var. *carelica*), у которой в результате нарушения деятельности камбия формируется аномальная по строению древесина, изучена регуляция активности сахарозосинтазы на уровне экспрессии кодирующих ее генов, рассмотрено участие фермента в синтезе целлюлозы и крахмала в период камбиального роста.

Впервые проведено изучение экспрессии генов, кодирующих апопластную инвертазу и ее белковый ингибитор, в процессе нормального и аномального ксилогенеза, рассмотрены возможные пути регуляции активности апопластной инвертазы у растений обычной березы и карельской березы с узорчатой и безузорчатой текстурой древесины.

Впервые при аномальном ксилогенезе изучено распределение экспрессии генов *CLE41* и *PXY*, определяющих направление дифференцировки производных камбия.

При формировании вторичных проводящих тканей ствола березы изучен уровень экспрессии генов, которые кодируют транскрипционные факторы VND6, VND7 с NAC-доменом (VASCULAR-RELATED NAC-DOMAIN), регулирующие синтез вторичной клеточной стенки, развитие и дифференцировку клеток ксилемы, и APL (ALTERED PHLOEM DEVELOPMENT, MYB-белки), играющий роль в развитии флоэмы. Продемонстрирована возможность изменения экспрессии указанных генов при увеличении содержания сахарозы в проводящих тканях.

Впервые установлено, что у карельской березы высокий уровень азотного питания подавляет активность ферментов метаболизации сахарозы, контролирующих формирование узорчатой древесины.

Практическая значимость работы. Активность основных ферментов, утилизирующих сахарозу в камбиальной зоне, можно использовать в качестве биохимического индикатора разных сценариев ксилогенеза: (1) формирование древесины, в составе которой преобладают сосуды и волокна и (2) формирование древесины, для которой характерны крупные включения клеток паренхимы.

Предложены новые методические подходы к экспериментальной регуляции ксилогенеза древесных растений.

Метаболические схемы, разработанные на основе физиолого-биохимических и молекулярно-генетических закономерностей, обнаруженных при разных сценариях ксилогенеза, могут быть использованы при поиске путей эффективного управления этим процессом как с точки зрения увеличения выхода биомассы древесины, так и выращивания древесины с заданными свойствами.

Предложен научный подход к выбору участков под посадки растений карельской березы. Установлена зависимость между степенью насыщенности текстуры древесины карельской березы и уровнем доступного азота в почве. Установлен диапазон содержания азота, способствующий лучшему проявлению узорчатости древесины.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Выявлены метаболические причины формирования узорчатой древесины карельской березы (*Betula pendula* Roth var. *carelica*). Пониженная активность сахарозосинтазы в зоне роста и развития ксилемы карельской березы замедляет использование сахарозы для синтеза клеточных оболочек этой ткани, что тормозит отток дисахарида из флоэмы. Во флоэме появляется избыток сахарозы, который выводится в апопласт и расщепляется с участием апопластной инвертазы. Образующиеся при этом моносахара индуцируют синтез запасных метаболитов и превращение камбиальных производных в клетки запасующей паренхимы, являющиеся структурной основой узорчатых тканей.

2. Выявлены молекулярно-генетические закономерности двух сценариев ксилогенеза древесных растений, связанных с формированием в древесине элементов, выполняющих водопроводящую и механическую функции и функцию запасания. Преобладание дифференцировки сосудов и волокон происходит на фоне высокой активности сахарозосинтазы (СС) под контролем генов *Sus1* и *Sus2* и сопровождается активным синтезом структурных компонентов клеточных стенок (целлюлозы). Формирование древесины, для которой характерны крупные включения клеток запасующей паренхимы, идет на фоне низкой активности СС, вызванной снижением экспрессии генов *Sus1* и *Sus2*, и сопровождается уменьшением содержания целлюлозы.

3. Возрастание активности АпИнв в камбиальной зоне можно рассматривать как компенсаторный механизм, направленный на устранение избыточного содержания сахарозы во флоэме, что важно для поддержания донорно-акцепторных отношений между тканями и органами древесного растения.

4. Разные сценарии ксилогенеза у карельской и обычной березы отличаются по распределению уровня экспрессии генов, кодирующих TDIF-пептид CLE-41 и его рецептор TDR (играют центральную роль в судьбе камбиальных инициалей), транскрипционные факторы VND6, VND7 (регулируют синтез вторичной клеточной

стенки, развитие и дифференцировку клеток ксилемы) и APL (играет роль в развитии флоэмы).

5. Безузорчатые деревья карельской березы, несмотря на отсутствие визуальных различий с обычной березой, отличаются от последней по характеру распределения экспрессии генов, контролирующих развитие камбиальных производных. Безузорчатые деревья карельской березы представляют собой уникальный объект для изучения переходного состояния между нормальным ксилогенезом у *B. pendula* var. *pendula* и его аномальным вариантом у узорчатых растений *B. pendula* var. *carelica*.

6. На ранних этапах онтогенеза обычной и карельской березы, когда видимые различия между ними еще отсутствуют, у сеянцев карельской березы наблюдаются биохимические и молекулярно-генетические особенности, свойственные взрослым растениям. В частности, увеличивается уровень экспрессии генов кодирующих TDIF/CLE-TDR/PXY и ApInv, снижается уровень экспрессии генов, кодирующих изоформы сахарозосинтазы *Sus1* и *Sus2*, появляются метаболические изменения путей утилизации сахарозы.

7. Установлена зависимость между степенью насыщенности текстуры древесины карельской березы и уровнем доступного азота в почве. Выявлен диапазон содержания азота, способствующий лучшему проявлению узорчатости древесины. Показано, что сильный дефицит азота и его избыток приводят к увеличению восстановления нитратов нитратредуктазой в тканях ствола. Повышение ассимиляции нитратов при дефиците азота тормозит ростовые процессы и развитие структурных аномалий (снижение активности сахарозосинтазы в ксилеме и инвертаз во флоэме), при его избытке – ведет к нормализации строения тканей ствола (снижение активности инвертаз во флоэме).

Личный вклад автора. Автором определены цель и задачи исследования, выбраны объекты и методы исследования. Автор лично принимал участие в планировании и постановке экспериментов, сборе экспериментальных данных, в обработке и обсуждении полученных результатов, подготовке публикаций по теме диссертационной работы и представлении результатов на научных конференциях. В диссертации использованы работы, опубликованные в соавторстве.

Апробация работы. Основные результаты работы доложены на международных и российских симпозиумах и конференциях: «Актуальные вопросы экологической физиологии растений в XXI веке» (Сыктывкар, 2001); VI Съезд ОФР и конференция «Современная физиология растений: от молекул до экосистем» (Сыктывкар, 2007); «Дендрэкология и лесоведение» (Красноярск, 2007); «Физико-химические механизмы адаптации растений к антропогенному загрязнению в условиях крайнего севера» (Апатиты, 2009); «Проблемы современной дендрологии» (Москва, 2009); XV Симпозиум по межмолекулярному взаимодействию и конформациям молекул (Петрозаводск, 2010); «Растение и стресс», (Москва, 2010); «Структурные и функциональные отклонения от нормального роста и развития растений под воздействием факторов среды» (Петрозаводск, 2011); «Физиология растений - теоретическая основа инновационных агро- и фитобиотехнологий» (Калининград, 2014); «Растения в условиях глобальных и локальных природно-климатических и антропогенных воздействий» (Петрозаводск, 2015); «Сигнальные системы растений: от рецептора до ответной реакции организма» (Санкт-Петербург, 2016); «The Fourth International Symposium on Plant Signaling and Behavior» (Saint Petersburg, 2016); «Фитоиммунитет и клеточная сигнализация у растений» (Казань,

2016); «Молекулярные аспекты редокс-метаболизма растений» (Уфа, 2017); «Теоретические и прикладные аспекты лесного почвоведения» (Петрозаводск, 2017); «Бореальные леса: состояние, динамика, экосистемные услуги» (Петрозаводск, 2017 года); «Экспериментальная биология растений: фундаментальные и прикладные аспекты» (Крым, Судак, 2017).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано более 80 работ, в том числе 25 статей в рецензируемых журналах, входящих в перечень изданий, рекомендуемых ВАК, среди них 9 статей в журналах из списков Scopus и Web of Science, один патент, одна база данных.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследования, 4 глав экспериментальной части, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Список литературы включает 466 наименований, из них 394 на иностранном языке. Диссертация изложена на 287 страницах машинописного текста, содержит 7 таблиц и 71 рисунок.

Благодарности. Автор выражает глубокую признательность доктору биологических наук Л.Л. Новицкой за неоценимую помощь в проведении работы. Особая благодарность к.б.н. М.С. Красавиной за консультации и помощь в освоении методики определения ферментативной активности. Автор искренне благодарен сотрудникам КарНЦ РАН И.Н. Софроновой, к.б.н. Ю.Л. Мощенской, К.М. Никеровой, М.Н. Подгорной и к.б.н. Е.В. Мошкиной, совместно с которыми получены обсуждаемые в работе результаты, к.б.н. Л.В. Топчиевой за ценные советы при проведении ПЦР анализа, сотруднику Карельской лесосеменной станции М.Л. Щуровой за помощь при подборе объектов исследования.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1. Обзор литературы

Описаны отклонения от нормы в камбиальной зоне, происходящие при формировании аномальной древесины карельской березы. Показаны пути регуляции деятельности камбия у древесных растений, рассмотрены факторы транскрипции, обуславливающие дифференцировку камбиальных производных по тому или иному пути. Обсуждены основные функции сахарозосинтазы и апопластной инвертазы в камбиальной зоне древесных растений, показаны возможные пути регуляции их активности. Рассмотрена роль азотных соединений в регуляции ксилогенеза древесных растений.

Глава 2. Объекты и методы исследования

2.1. Растительный материал

Объектами исследования были две формы березы повислой разного возраста: обычная береза повислая – *Betula pendula* Roth var. *pendula* и карельская береза – *B. pendula* var. *carelica*. В некоторых случаях для сравнительной характеристики использовали березу пушистую (*B. pubescence* Ehrh).

40-45-летние растения обычной и карельской березы – изучение в тканях ствола годичной динамики содержания сахаров, крахмала и активности ВаКИнв, ЦитИнв, АпИнв, СС, неспецифической гексокиназы (ГК); в период камбиального роста определение уровня экспрессии генов, кодирующих пептид CLE-41 (*CLE41*) и его рецептор (*PXY*).

25-летние растения карельской березы с разной степенью узорчатости древесины (0 баллов – безузорчатые растения и 1-3 балла – узорчатые растения

(Галибина и др., 2016)), произрастающие в лесных культурах на территории Карелии, – изучение содержания сахаров, крахмала и целлюлозы, активности АпИInv, СС, ГК и нитратредуктазы (НР), уровня экспрессии генов *Sus1*, *Sus2*, *CWIN1*, *CWIN1.1*, *CWIN4*, *CIF*, *CLE41*, *PXY*, *Ces8*, *Ces 7*, *Ces 3* и генов, кодирующих факторы транскрипции VND6, 7 и APL, переносчики гексоз (*Hex1*, *Hex2*) в камбиальной зоне в период активного камбиального роста; изучение влияния плодородия почвы на соотношение апопластного и сахарозосинтазного пути метаболизации сахарозы в камбиальной зоне.

10- и 11-летние растения обычной березы, безузорчатые растения карельской березы, узорчатая и безузорчатая части ствола узорчатых растений карельской березы – изучение содержания сахаров, крахмала и целлюлозы, активности АпИInv и СС, уровня экспрессии генов, кодирующих СС (*Sus1*, *Sus2*, *Sus3*), АпИInv (*CWIN1*, *CWIN1.1*, *CWIN4*), белковый ингибитор АпИInv (*CIF*), целлюлозосинтазу (*Ces8*, *Ces 7*, *Ces3*) пептид CLE-41 (*CLE41*) и его рецептор (*PXY*) во флоэме и ксилеме в период камбиального роста.

6-летние растения обычной березы и карельской березы с разной степенью узорчатости древесины – в период камбиального роста исследование фотосинтетической активности листьев, содержания сахаров, крахмала, активности АпИInv и СС в листьях, флоэме, ксилеме, корнях; изучение влияния экзогенного нитрата на метаболизацию сахарозы в тканях ствола.

2-4 летние сеянцы обычной и карельской березы и для получения межвидовой сравнительной характеристики растения березы пушистой (*B. pubescence* Ehrh) – изучение в течение вегетационного сезона динамики сахаров, крахмала в органах и тканях растений. Все растения были выращены из семян, полученных от контролируемого опыления, и произрастали в одинаковых почвенно-климатических условиях на Биостанции КарНЦ РАН.

2-17-недельные сеянцы обычной и карельской березы, выращенные на питательном грунте Terra Vita (N – 0.91%, P – 0.2%, K – 0.094%) в камере при температуре 23°C, 16-часовом фотопериоде, освещенности 8 клк – исследование активности ВакИInv, ЦитИInv, АпИInv, СС, уровня экспрессии генов *Sus1*, *Sus2*, *CWIN1*, *CIF*, *CLE41*, *PXY*. Сеянцы выращены из семян, полученных от контролируемого опыления. Семена карельской березы получены от родительских деревьев с ярко выраженными признаками узорчатости древесины. Для анализа брали стебли и корни.

Экспериментальные подходы.

Для изучения влияния разных концентраций сахарозы на развитие тканей проведен эксперимент с введением в ткани ствола деревьев растворов сахарозы разной концентрации (1%, 2.5% 5%, 10% и 20 %) (Новицкая, Кушнир, 2005; Novitskaya, Kushnir, 2006). Эксперимент проводили на Биологической станции КарНЦ РАН на 25-летних растениях обычной березы. На стволе вырезали наружные слои коры в виде длинных узких полосок (10x2 см), оставляя нетронутыми внутренние слои непроводящей флоэмы, проводящую флоэму и камбиальную зону. После удаления коры ствол в зоне ранения сразу покрывали водонепроницаемым материалом. В созданные таким образом камеры регенерации с помощью медицинского шприца вводили растворы сахарозы. Начало эксперимента 07.07.2009, окончание 21.08.2009. По окончании обработок из зоны экспериментального воздействия отбирали растительный материал, который делили на три слоя. В наружный слой (1-й слой) входили ткани раневой паренхимы и часть непроводящей флоэмы, средний слой (2-й слой) включал проводящую флоэму и камбиальную зону,

внутренний слой (3-й слой) – ткани ксилемы текущего года. С деревьев, которые не участвовали в опыте, препарировали слои тканей по той же схеме и использовали их в качестве контроля (к). В отобранных тканях ствола определяли активность ВаКИнв, ЦитИнв, АпИнв и СС.

Для изучения камбиального роста в условиях различной обеспеченности тканей ассимилянтами нарушали нисходящий транспорт сахарозы путем кольцевания стволов деревьев. Для исследования использовали 22-летние растения обычной березы, произрастающие на Биологической станции КарНЦ РАН. Часть деревьев была оставлена без каких-либо воздействий, их использовали в качестве контрольных. На стволах опытных деревьев в период активных делений в камбиальной зоне (19.06.2017) было выполнено двойное кольцевание по методике Daudet et al. (2005). По окончании эксперимента (10 дней) в тканях ствола изучали содержание сахаров, уровень экспрессии генов *Sus1*, *Sus2*, *CWIN1*, *CWIN1.1*, *CWIN4*, *CIF*, *CLE41*, *PXY*, *Ces8*, *Ces 7*, *Ces 3*, *VND6*, *VND7*, *APL*, *Hex1*, *Hex 2*.

2.2. Отбор образцов

Из стволов берез препарировали ткани флоэмы и ксилемы. В ткани флоэмы входили материнские клетки флоэмы и проводящая флоэма, в ткани ксилемы – материнские клетки ксилемы и ксилема текущего года. Клетки камбиальной зоны в зависимости от сезона отходили то к флоэме, то к ксилеме. Весь растительный материал сразу замораживали в жидком азоте и впоследствии хранили в низкотемпературной морозильной камере при – 70°C.

2.3. Микроскопические исследования

Фиксацию тканей проводили в 70% спирте. На замораживающем микротоме Frigomobil (Австрия) изготавливали поперечные срезы ксилемы и флоэмы толщиной 15 мкм. Срезы исследовали с помощью микроскопа AxioImager A1 (Carl Zeiss, Германия) в проходящем свете. Срезы ксилемы окрашивали 1%-ным водным раствором сафранина, что позволило выявлять клеточные оболочки, начиная с ранних этапов лигнификации.

При изучении слоев проводящей флоэмы использовали метод выявления каллозы на порах ситовидных трубок. Срезы окрашивали 0.005%-ным раствором анилинового голубого в 0.1М буфере с рН 8.0 и исследовали под микроскопом в проходящем свете и в режиме люминесценции. Светящиеся отложения каллозы имели ярко голубую окраску.

2.4. Химический анализ почвы

Образцы отбирали из генетических горизонтов почв и анализировали по общепринятым методикам (Аринушкина, 1970). Содержание общего азота и углерода определяли на СНNS-анализаторе (Perkin-Elmer, model 2400, США). Содержание подвижного фосфора – спектрофотометрически (СФ-2000, Россия) с молибдатом аммония, подвижного калия – методом атомно-абсорбционной спектрофотометрии (Shimadzu AA 7000, Япония). В горизонтах почвы рассчитывали запасы доступных для растения азота, фосфора и калия. Для подстилки расчет вели с учетом запаса подстилки, для минеральных горизонтов учитывали их мощность. Запасы азота, фосфора, калия подстилки суммировались с запасами в минеральной части и рассчитывались на слой 0-25 см. Запасы элементов, полученные для отдельных почв, пересчитывали на площадь (га) (Бахмет, 2012).

2.5. Биохимические исследования

Определение содержания пигментов проводили спектрофотометрическим методом (спектрофотометр СФ 2000, Россия). Хлорофилл экстрагировали из свежих

листьев 80% ацетоном, полученный экстракт анализировали в диапазоне длин волн 410–700 нм. Содержание пигментов рассчитывали по формулам Н.К. Lichtenthaler (1987). Расчет доли хлорофиллов в светособирающем комплексе (ССК) от их суммы производили с учетом того, что весь хлорофилл *в* находится в ССК (Lichtenthaler, 1987).

Определение сахаров. Для определения сахаров весь растительный материал лиофильно высушивали. Экстракцию углеводов проводили 80% этиловым спиртом при 50°C. Содержание растворимых углеводов в экстракте анализировали на системе высокоэффективной жидкостной хроматографии серии «Стайер» (Аквилон, Россия). Содержание углеводов выражали в мг/г сухой ткани.

Определение крахмала. Крахмал экстрагировали из растительных тканей хлорной кислотой по методу Пьючера (Pucher et al., 1948). Содержание крахмала определяли глюкозооксидазным методом по количеству глюкозы, образовавшейся в результате кислотного гидролиза.

Определение целлюлозы. Целлюлозу выделяли по методу Кюршнера-Хоффера смесью концентрированной азотной кислоты и этилового спирта в соотношении 1:4 (по объему). Содержание целлюлозы определяли гравиметрическим методом.

Анализ активности ферментов. Для определения активности ферментов растительные ткани растирали в жидком азоте до однородной массы и гомогенизировали при 4°C в буфере следующего состава: 50 мМ Нерес (pH 7.5), 1 мМ ЭДТА, 1 мМ ЭГТА, 3 мМ DTT, 5 мМ MgCl₂, 0.5 мМ PMSF. После 20-минутной экстракции гомогенат центрифугировали при 10000 g в течение 20 минут (центрифуга MPW-351R, Польша). Осадок троекратно промывали буфером. Осадок и объединенный супернатант диализовали при 4°C в течение 18-20 часов против буфера для гомогенизации, разбавленного в 10 раз. В осадке определяли АпИInv, в супернатанте – ВакИInv, ЦитИInv, СС, неспецифическую гексокиназу (ГК) и нитратредуктазу (НР). Активности ферментов определяли после инкубации полученного препарата при 30°C в течение 30 минут.

Инкубационная среда для определения активности инвертазы содержала 100 мМ ацетатный буфер, pH 4.7 (АпИInv и ВакИInv) или 50 мМ Нерес, pH 7.5 (ЦитИInv), 25 мМ сахарозу. Количество образовавшейся в процессе инкубации глюкозы определяли глюкозооксидазным методом. Активность инвертазы выражали в мкмоль распавшейся сахарозы на г сырой ткани и/или на мг белка.

Инкубационная среда для определения активности СС в сторону распада сахарозы содержала 70 мМ Нерес (pH 7.4), 5 мМ MgCl₂, 1 мМ уридиндифосфат, 1 мМ пиродифосфат, 1 мМ НАДФ, 50 мМ сахарозу, 1 U глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, 2 U фосфоглюкомутазы. Активность СС в направлении распада сахарозы определяли спектрофотометрически по восстановлению НАДФ при $\lambda = 340$ нм (спектрофотометр СФ-2000, "ОКБ Спектр", Россия). Активность СС выражали в мкмоль распавшейся сахарозы на г сырой ткани и/или на мг белка.

Инкубационная среда для определения активности СС в сторону синтеза сахарозы содержала 73 мМ трис-НСl (pH 7.5), 2.5 мМ УДФ-глюкозу, 20 мМ фруктозу, 5 мМ MgCl₂, 3 мМ DTT. Количество образовавшейся сахарозы определяли спектрофотометрически по резорциновому методу Роэ (спектрофотометр СФ-2000, "ОКБ Спектр", Россия) (Nilsson et al., 2010). Активность сахарозосинтазы выражали в мкмоль образовавшейся сахарозы на мг белка.

Инкубационная среда для определения активности ГК содержала 50 мМ трис-НСl (pH 8), 5 мМ MgCl₂, 5 мМ АТФ, 1 мМ НАДФ⁺, 5 мМ глюкозу, 1 единицу глюкозо-

б-фосфатдегидрогеназы (Глю-б-Ф-ДГ). Содержание белка фермента составляло 500 мкл на общий объем инкубационной среды 1000 мкл. Активность ГК выражали в нмоль превращенного субстрата на мг белка (Курсанов и др., 1989).

Инкубационная среда для определения активности НР содержала 50 мМ фосфатный буфер (рН 7.6), 10 мМ KNO₃, 0.7 мМ НАДФ-Н, 0.5 мМ EDTA, 0.625 мМ цистин, 25 мкМ Na₂MoO₄ (Friemann et al., 1992). Количество образовавшегося нитрита определяли спектрофотометрически с реактивом Грисса. Активность НР выражали как мкмоль образовавшегося нитрита на мг белка. Суммарное содержание белка в тканях определяли по методу Бредфорд.

2.6. Определение уровня экспрессии генов

Накопление транскриптов генов анализировали при помощи полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени. Для анализа были выбраны гены, кодирующие изоформы СС (*Sus1*, *Sus2*), изоформы АпИнов (*CWIN 1*, *CWIN 1.1*, *CWIN 4*), белковый ингибитор АпИнов/ВакИнов (*Cif*), изоформы целлюлозосинтазы (*Ces 8*, *Ces 7*, *Ces 3*), переносчики сахарозы (*Suc*) и гексоз (*Hex1*, *Hex 2*), CLAVATA-подобный пептид 41/44 (*CLE41/44*) и его рецептор (*PXY*), а также транскрипционные факторы *VND6*, *VND7* с NAC-доменом (VASCULAR-RELATED NAC-DOMAIN), контролирующие синтез вторичной клеточной стенки, развитие и дифференцировку клеток ксилемы и APL (ALTERED PHLOEM DEVELOPMENT, MYB-белки), которые играют роль в развитии флоэмы.

Подбор праймеров. Специфические праймеры для амплификации участков исследуемых генов (Табл.1) (Евроген, Россия) конструировали с помощью программного обеспечения Primer Express Software (Applied Biosystems) на основе последовательностей генов (<https://genomevolution.org/CoGe/GenomeInfo.pl?gid=35079>), идентифицированных для *Betula pendula* Roth (Salojärvi et al., 2017). Эффективность ПЦР для праймеров референсных и целевых генов определяли путем проведения ПЦР с последовательными разбавлениями исследуемого образца кДНК (Ребриков и др., 2011). Специфичность полученных продуктов ПЦР была оценена с помощью кривых плавления. В качестве референсного гена для расчета относительной экспрессии использовали ген актина (Табл.1). Для оценки пригодности данного транскрипта в качестве референсного определяли стабильность экспрессии гена при помощи прикладной программы для Microsoft Excel – BestKeeper (Pfaffl et al., 2004).

Выделение тотальной РНК и синтез комплементарной ДНК. Процедуру выделения тРНК проводили с помощью реагента Extract RNA (Евроген, Россия) согласно протоколу производителя. кДНК синтезировали, используя набор реактивов для обратной транскрипции MMLV RT kit (Евроген, Россия).

ПЦР в режиме реального времени. Амплификацию образцов проводили в приборе iCycler с оптической приставкой iQ5 («Bio-Rad», США), используя наборы для амплификации с интеркалирующим красителем SYBR Green («Евроген», Россия). Относительный уровень транскриптов генов (RQ) вычисляли по формуле:

$$RQ = 2^{\Delta C_t}$$

где ΔC_t – разница значений пороговых циклов для референсного и целевого генов, 2 – эффективность ПЦР. Уровень экспрессии специфичных генов выражали в относительных единицах (отн. ед.), нормализованных к уровню экспрессии референсного гена.

Таблица 1. Нуклеотидная последовательность праймеров для проведения ПЦР в режиме реального времени.

Ген	Прямой праймер (5'→3')	Обратный праймер (5'→3')	Локус (Salojärvi et al., 2017)
<i>Actin</i>	GGTGGTGAATGAGTAGC C	TTCTTTCCCTTTATGCC	Bpev01.c0427.g0027
<i>CWIN1</i>	TATCAGACTCAAGCACCC AG	ATTACACGCCCAGAACAGAC	Bpev01.c0237.g0050
<i>CWIN1.1</i>	AGTGCCCCGATTTCTTCC CTG	GTCCACCTGCCCTTGTCCG	Bpev01.c0333.g0031
<i>CWIN4</i>	GCTCTACCACAATCCTCC CA	GCACTCGCATTCATCCCCTC	Bpev01.c0516.g0006
<i>Sus1</i>	TAGCATCAACCCCTGTCC CT	GTTCAAGTTCCTCAACCGTCA	Bpev01.c0294.g0013
<i>Sus2</i>	CTGCTAACCGCAACGAA AT	ACCGCCAAGGCAACCCAC	Bpev01.c0051.g0185
<i>CLE41/44</i>	ATGGCAGCCGATTGTTGT	TGCTCCTCTTGCTTGTTA	Bpev01.c0016.g0065
<i>PXY</i>	TGCTCGTTCACGGATGTT	CACGCAGTTCGCTACCAC	Bpev01.c0169.g0033
<i>Cif</i>	GCAAGCAGACACCSTTTT AT	GTTTAGTTTTGGGCTACCGT	Bpev01.c0932.g0004
<i>Ces8</i>	TGCTCCATACGATGCGAC T	CCTTCCATCTGCTGCTCTG	Bpev01.c0196.g0006
<i>Ces3</i>	TGTCTGCTGCATCACCTG	AAAGAGTCATCCACAAGCAC AT	Bpev01.c0777.g0012
<i>Ces7</i>	GTAATAGCCGGTGGTAG ATCC	TGCTCGAAGCAATCGGTA	Bpev01.c0603.g0003
<i>VND7</i>	CCACTGCTGCTGGATTC	TACCATTGGGTGCTCGT	Bpev01.c0411.g0006
<i>VND6</i>	TGAGTCGCTCCCGTGTT	GTCTTCATCGGCAGGCT	Bpev01.c1773.g0004
<i>APL</i>	GAAGCTCAAGCTGGTCAC	GGAGAAAGCCTGTCAAAC	Bpev01.c0189.g0073
<i>Hex1</i>	GGGGTGGTTGATTCCTA	TCCAGCAGAGCATTGTG	Bpev01.c0329.g0008
<i>Hex 2</i>	GGATTTGCTTGGTCATGG GGTCC	ATTTATACCCTTGGTCTCTGG	Bpev01.c0151.g0005
<i>Suc</i>	CTTCATCTGGCTCTGCG	GGTTTTCGTCGTCTTGTC	Bpev01.c0594.g0012

2.7. Статистическая обработка

Статистическую обработку результатов исследования проводили с использованием пакетов программ StatGraphics для Windows, PAST. Данные представлены в виде средних арифметических значений по биологической повторности в количестве 5-10 деревьев каждой группы. Аналитическая повторность трехкратная. Различия в распределении показателей между группами растений определяли методом оценки значимости различий средних величин (t-критерий Стьюдента). Статистически значимыми считались различия при $p < 0.05$.

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

Глава 3. Биохимические индикаторы разных сценариев ксилогенеза

3.1. Годичная динамика сахарозы и активность ферментов ее метаболизации в тканях ствола двух форм березы повислой, различающихся по структуре древесины

Проанализированы годичные изменения в содержании сахарозы и активности ферментов ее метаболизации в тканях ствола у двух форм 46-летних растений березы повислой. Даты отбора были приурочены к различным фенофазам (период покоя, выход из состояния покоя, сокодвижение, камбиальный рост, подготовка к состоянию покоя).

В период покоя (26.01, 16.02) из-за воздействия низких температур транспортные процессы в тканях ствола отсутствуют. В этот период метаболиты в клетках представлены в виде сахаров, а также высокомолекулярными запасными соединениями в виде крахмала, липидов, танинов, белков (Курсанов, 1976; Новицкая, 1985; Софронова, 1985). Отличительная особенность тканей ствола карельской березы – это в 2 раза большее содержание сахарозы в ксилеме и высокая активность АпИнв как в ксилеме, так и во флоэме.

Выход из состояния покоя (29.03) сопровождается гидролизом отложенных с осени запасных соединений, что приводит к увеличению содержания сахарозы в тканях ствола (Курсанов, 1976; Судачкова, 1977; Ameglio, 2002; Schrader, Sauter, 2002; Guu, 2003; Wong et al, 2003). Сахароза выходит в апопласт и метаболизируется там АпИнв (Кретович, 1986; Курсанов, 1976; Copeland, 1990; Koch, 1996; Tymowska-Lalanne, Kreis, 1998; Галибина и др., 2011 и др.). Сахароза и полученные при ее расщеплении гексозы по градиенту концентрации перемещаются по апопласту до ксилемы и с ксилемным потоком поступают к набухающим почкам. Самая высокая активность АпИнв наблюдалась при выходе растений из состояния покоя как в тканях флоэмы, так и в ксилеме. Значения ее достигали у обычной березы 18 и 4 мкмоль сахарозы на г ткани, а у карельской березы 31 и 6 мкмоль сахарозы на г ткани во флоэме и ксилеме соответственно.

В период камбиального роста (25.05-10.08) происходит увеличение содержания сахарозы у березы, особенно во флоэме, по ситовидным трубкам которой она поступает в ткани ствола из фотосинтезирующих листьев. У карельской березы количество сахарозы (90-130 мг/г) было меньше, по сравнению с обычной березой (140-200 мг/г). Основным акцептором дисахарида в это время служит камбиальная зона и дифференцирующаяся ксилема (Новицкая и др., 2015).

У обычной березы утилизация сахарозы в камбиальной зоне и дифференцирующейся ксилеме происходит, в основном, с участием ЦитИнв и СС. В период активного деления клеток камбиальной зоны (15.06) сахароза метаболизируется ЦитИнв с образованием фруктозы и глюкозы. Последняя увеличивает уровень экспрессии генов, кодирующих циклины D-типа, повышая митотическую активность клеток (Rolland et al., 2006; Ruaan, 2014). Переход к фазе дифференциации связан с возрастанием активности СС (середина июля). Образующаяся в результате сахарозосинтазного расщепления УДФ-глюкоза активно расходуется на синтез компонентов клеточной стенки (Amor et al., 1995; Koch, 2004; Coleman et al., 2009; Haigler et al., 2001; Bieniawska et al., 2007). Интенсивная метаболизация сахарозы с участием ЦитИнв и СС и последующая быстрая утилизация УДФ-глюкозы поддерживают разгрузку сахарозы из ситовидных трубок, что создает градиент концентрации, необходимый для нормального осуществления флоэмного транспорта. Наличие интенсивного симпластного потока ограничивает выход сахарозы в апопласт клеток флоэмы, поэтому активность АпИнв во флоэме

обычной березы в период камбиального роста ниже, по сравнению с другими фазами, несмотря на самое высокое в этот период содержание сахарозы.

У карельской березы, по сравнению с обычной березой, в период активного формирования тонкостенных клеток ксилемы (ранняя древесина) (15.06) активность ЦитИнв и СС ниже в 1.6 раза, в период интенсивного формирования вторичной клеточной стенки (середина июля) активность ЦитИнв ниже в 4 раза, а СС в 10 раз. Наряду с СС в создании концентрационного градиента сахарозы в месте разгрузки флоэмы может участвовать АпИнв. Ее активность у карельской березы в период камбиального роста превосходила таковую у обычной березы в 2-4 раза. Несмотря на повышение активности АпИнв, метаболизация сахарозы в ксилемной части камбиальной зоны у карельской березы существенно ниже, по сравнению с обычной березой.

В период подготовки растений к состоянию покоя (13.09-19.10) в стволе в результате осеннего оттока ассимилятов из кроны происходит накопление сахарозы. Содержание дисахарида во флоэме достигало 130 и 57 мг/г у обычной и карельской березы соответственно. При этом повышается активность АпИнв, что указывает на интенсивный поток сахарозы из внутриклеточного пространства в апопласт. Гексозы, образующиеся в апопласте, транспортируются в клетку, где они через гликолиз, цикл трикарбоновых кислот и пентозофосфатный путь используются на синтез запасных веществ неуглеводной природы (Курсанов, 1976; Roitsch et al., 1995; Koch, 1996). У карельской березы активность АпИнв во флоэме (36 мкмоль сахарозы / г ткани) была в 1.8 раза выше, чем у обычной березы (20 мкмоль сахарозы / г ткани), что коррелирует с меньшим содержанием у нее сахарозы и, очевидно, способствует запасанию большего количества веществ в тканях ствола. Осенью наблюдали самую высокую активность АпИнв и в тканях ксилемы у карельской березы (5 мкмоль сахарозы / г ткани). Этот факт можно связать с наличием в ксилеме узорчатых растений аномальных прослоек паренхимы, где также могут откладываться запасные вещества.

Таким образом, более высокая активность АпИнв в течение всего сезона как в ксилеме, так и во флоэме, – важная отличительная характеристика ферментативной активности тканей ствола узорчатых растений карельской березы.

3.2. Участие апопластной инвертазы и сахарозосинтазы в поддержании аттрагирующей способности камбиальной зоны

Для выяснения роли СС и АпИнв в поддержании транспорта сахарозы из флоэмы к камбиальной зоне и дифференцирующейся ксилеме исследовали активность ферментов у 40-летних растений обычной и карельской березы в период камбиального роста и период временного его торможения погодными условиями.

У обычной березы в период функционирования камбия (конец июня) СС принимает активное участие в формировании древесины ствола, ее активность в ксилеме составила 18.6 мкмоль сахарозы на г сырой ткани, в то время как активность АпИнв достигала всего 0.6 мкмоль сахарозы на г сырой ткани. Во флоэме обычной березы активность СС была существенно ниже (0.02 мкмоль сахарозы на г сырой ткани), чем в ксилеме (рис. 1). Известно, что экспрессия генов, кодирующих фермент СС, органоспецифична и зависит от стадии развития растения (Sturm, Tang, 1999; Kládník et al., 2005), наиболее высокая активность СС наблюдается в акцепторных тканях (Coleman et al., 2008; Coleman et al., 2010). Во флоэме активность АпИнв достигала 4.9 мкмоль сахарозы на г сырой ткани (рис. 1).

У карельской березы в зонах структурных аномалий ствола формирование ксилемы происходило менее интенсивно, чем у обычной березы: активность СС в ксилеме была в 2.5 раза ниже, по сравнению с обычной березой, что является важной отличительной особенностью узорчатых растений. Меньшая метаболизация сахарозы по сахарозосинтазному пути компенсировалась увеличением ее метаболизации по инвертазному пути. Активность АпИInv в ксилеме карельской березы была в 2.5 раза больше, по сравнению с обычной березой. Пониженная активность СС в ксилеме может способствовать появлению избытка сахарозы во флоэме узорчатых растений, где активность АпИInv достигала 10.4 мкмоль сахарозы на г сырой ткани (рис. 1).

Таким образом, в период камбиального роста у обычной березы имеет место интенсивный поток сахарозы из флоэмы в ксилему, где она расходуется на формирование структурных элементов древесины. У карельской березы отток сахарозы из флоэмы замедлен, и ее использование в значительной степени происходит во флоэме.

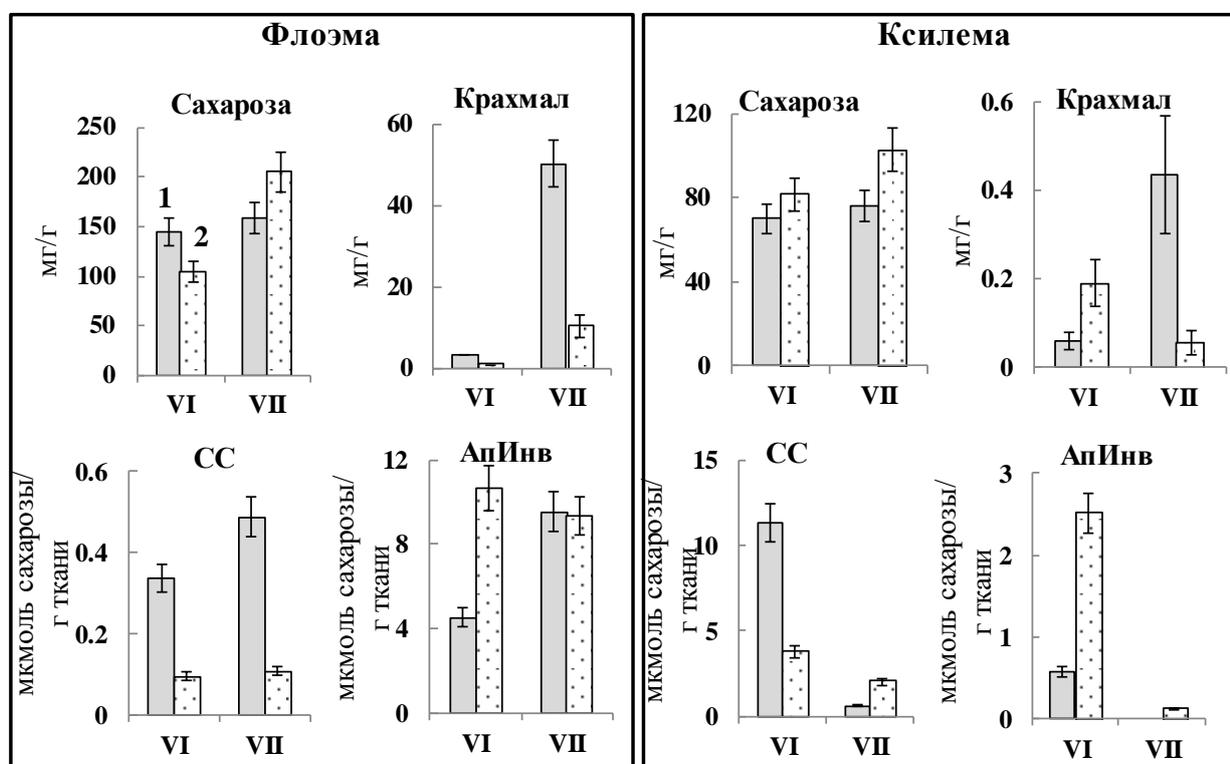


Рисунок 1. Содержание сахарозы, крахмала, активность сахарозосинтазы (СС), апопластной инвертазы (АпИInv) в тканях ствола 40-летних растений обычной (1) и карельской (2) березы. Представлены средние значения и их стандартные ошибки.

В июле погодные условия вызвали остановку деятельности камбия (Галибина и др., 2015а). В этих условиях запрос на ассимиляты со стороны ксилемы сильно ослабевает. В ксилеме обычной березы в 27 раз снизилась активность СС, и практически полностью исчезла активность АпИInv. У карельской березы активность СС снизилась в 3 раза, а активность АпИInv – в 25 раз (рис. 1). У обычной березы снижение запроса на сахарозу со стороны ксилемы сопровождалось 2-кратным увеличением активности АпИInv во флоэме (рис. 1). 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 АпИндв во флоэме карельской березы является следствием пониженной аттрагирующей способности ксилемы, вызванной низкой активностью СС.

С прекращением клеточных делений в камбиальной зоне меняется основной путь утилизации сахарозы: преимущественное ее использование на новообразование клеток сменяется тратой в реакциях запасного метаболизма. Одним из наиболее лабильных способов удаления излишка сахарозы является синтез крахмала (Курсанов, 1976; Мокроносов, 1983; Роньжина, Мокроносов, 1994; Коровин и др., 2003). Содержание крахмала и в ксилеме и во флоэме обычной березы в июне было низким и не превышало 0.1 мг/г. Временное торможение ростовых процессов приводило у обычной березы к накоплению крахмала, особенно во флоэме (~ 50 мг/г) (рис. 1). Временное накопление крахмала в паренхимных клетках флоэмы обычной березы можно рассматривать как один из механизмов поддержания концентрации сахарозы в проводящих путях на определенном уровне. В период торможения деятельности камбия, по сравнению с активным камбиальным ростом, у обычной березы содержание сахарозы как в ксилеме, так и во флоэме практически не изменилось.

У карельской березы в результате торможения деятельности камбия в июле накопление крахмала во флоэме происходило в 5 раз слабее, чем у обычной березы, а в ксилеме его содержание снижалось с 0.4 мг/г в июне до 0.1 мг/г в июле (рис. 1). Возможно, что меньшее накопление крахмала у карельской березы во флоэме в июле связано с необходимостью утилизации большего количества сахарозы, которая в данном случае перерабатывается в более энергоемкие вещества, в частности, липиды и танины (Новицкая, 2008; Novitskaya, Kushnir, 2006).

Таким образом, снижение активности СС в ксилеме растений обычной березы, вызванное погодными условиями в июле, сопровождалось увеличением метаболизации сахарозы во флоэме по апопластному пути. Возрастание активности АпИндв можно рассматривать как компенсаторный механизм, направленный на устранение избыточного содержания сахарозы во флоэме и поддержание донорно-акцепторных отношений между органами и тканями растения.

3.3. Донорно-акцепторные отношения в системе «лист-стебель-корень» в период камбиального роста у растений березы повислой при альтернативных сценариях ксилогенеза

В период активного роста фотосинтезирующие листья являются основным донором ассимилятов в растении. У березы формируется два основных типа побегов: удлиненные – ауксибласты (АУ) и укороченные – брахибласты (БР). Рост АУ продолжается в течение всего вегетационного периода, фотоассимиляты, образующиеся в листьях АУ, используются в ходе роста апикальных меристем побегов и способствуют увеличению линейных параметров кроны. На БР разворачивание листьев происходит очень быстро, после чего БР становятся источником ассимилятов для обеспечения вторичного (камбиального) роста ветвей и ствола (Kozłowski, Clausen, 1966; Николаева, Новицкая, 2007).

В период активного роста сахарозосинтазная активность в листе смещена в сторону синтеза сахарозы, которая поступает во флоэму и по ней оттекает к акцепторным тканям (Chikov, Bakirova, 2004; Zhang et al., 2014). Утилизация сахарозы по инвертазному пути в листе приводит к образованию глюкозы и фруктозы, которые не могут загружаться во флоэму и расходуются в метаболизме клеток листа (Zhang et

al., 2014). У двух форм березы активность СС в листьях АУ и БР преобладала над активностью АпИInv в 2-3 раза (рис. 2), из чего можно заключить, что отток сахарозы из листьев побегов к акцепторным тканям был очень высоким и значительно превышал использование дисахарида в листе.

У карельской березы, по сравнению с обычной березой, содержание сахарозы в листьях АУ и БР было меньше в 4.4 и 2.6 раза соответственно (рис. 2). Известно, что высокая интенсивность фотосинтеза листа обеспечивается не только посредством оттока продуктов фотосинтеза к акцепторным органам, но и за счет перевода избытка первичных метаболитов фотосинтеза в запасную форму – крахмал (Климов и др., 1990). У карельской березы содержание крахмала было выше в 4 раза в листьях АУ и в 1.2 раза в листьях БР, по сравнению с обычной березой (рис. 2). Накопление крахмала в листьях карельской березы, вероятно, было причиной меньшего количества в них сахарозы.

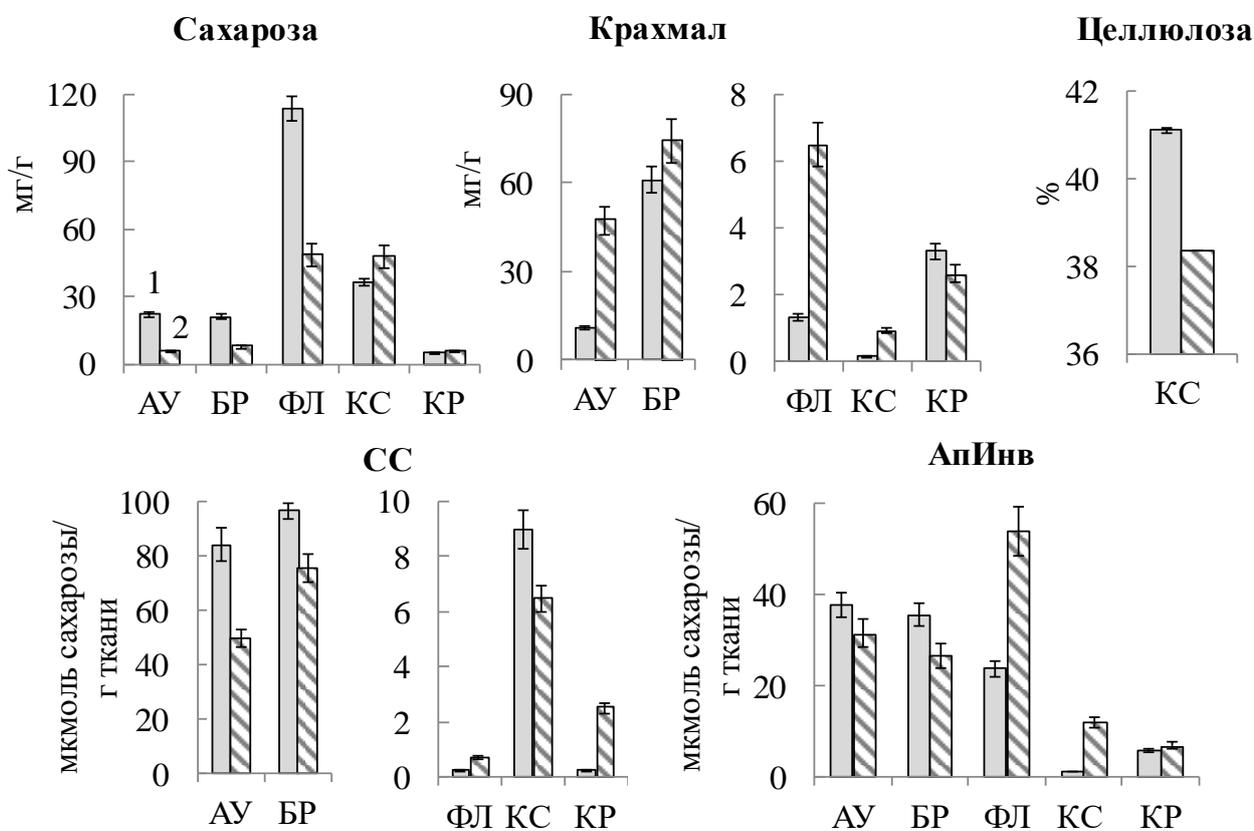


Рисунок 2. Содержание сахарозы, крахмала и активность сахарозосинтазы (СС), апопластной инвертазы (АпИInv) в листьях ауксибластов (АУ), брахибластов (БР), флоэме (ФЛ), ксилеме (КС), корне (КР) и содержание целлюлозы в ксилеме (КС) у 6-летних растений обычной (1) и карельской (2) березы. Представлены средние значения и их стандартные ошибки. Различия значимы при $p < 0.05$.

Основным акцептором ассимилятов в период камбиального роста становится камбиальная зона и дифференцирующаяся ксилема, развитие которой, особенно на стадии отложения вторичной клеточной стенки, требует больших субстратных и энергетических затрат (Антонова, 1999; 2011). Именно акцепторам ассимилятов принадлежит ведущая роль в функционировании донорно-акцепторной системы растения (Мокроносов, 1983). Связь между донорами и акцепторами осуществляется посредством флоэмного транспорта. Сила запроса на ассимиляты определяется

интенсивностью разгрузки ситовидных элементов в акцепторных тканях, то есть тесно связана со скоростью утилизации поступающей по флоэме сахарозы (Роньжина, Мокронос, 1994). У обычной березы содержание сахарозы во флоэме было в 3 раза больше, чем в ксилеме (рис. 2), что хорошо согласуется с ее главной функцией – проведение ассимилятов к местам их потребления. Высокий градиент сахарозы между флоэмой и ксилемой ($113.6 \text{ мг/г} - 36.3 \text{ мг/г} = 77 \text{ мг/г}$) свидетельствует в пользу активного использования дисахарида на формирование структурных элементов древесины. Основную роль в метаболизации сахарозы в ксилеме обычной березы играет СС: ее активность в 9 раз выше активности АпИнв (рис. 2).

Формирование аномальной узорчатой древесины карельской березы происходит на фоне сравнительно низкой активности СС (рис. 2), что коррелирует со снижением содержания целлюлозы (рис. 2). При этом активность АпИнв здесь была примерно в 2 раза выше, по сравнению с активностью СС, и примерно в 12 раз выше, чем у обычной березы. Содержание сахарозы в ксилеме карельской березы достоверно не отличалось от такового у обычной березы, а во флоэме было в 2 раза меньше, в связи с чем градиент сахарозы между флоэмой и ксилемой составил всего 0.8 мг/г ($49 \text{ мг/г} - 48.2 \text{ мг/г} = 0.8 \text{ мг/г}$) (рис. 2). Еще одна особенность карельской березы – высокая активность АпИнв во флоэме, значение ее превосходило таковую у обычной березы в 2 раза (рис. 2). Высокая активность АпИнв свидетельствует о выходе большого количества сахарозы в апопласт, что обычно имеет место при появлении избытка сахарозы в клетке. Как указывалось ранее, важным механизмом утилизации сахарозы является синтез крахмала. У карельской березы содержание крахмала было в 5 и 4.5 раза больше во флоэме и ксилеме соответственно, по сравнению с обычной березой (рис. 2).

Комплекс приведенных выше данных свидетельствует о том, что при формировании узорчатой древесины карельской березы имеет место смена приоритетного направления утилизации сахаров в клетках ксилемы. В данном случае процессы, связанные с синтезом/распадом сахарозы и крахмала, начинают преобладать над синтезом структурных компонентов вторичных клеточных стенок. Такая направленность метаболизма характерна для клеток, сохраняющих живой протопласт. В аномальных участках древесины карельской березы вместо волокон и сосудов наблюдается активная дифференцировка клеток запасающей паренхимы. Формирование клеток паренхимы происходит как в результате дифференцировки производных камбия, так и за счет активных повторных делений ранее сформированных паренхимных клеток. Следствием такой перестройки метаболизма является сохранение и, вероятно, даже усиление аттрагирующей силы тканей ствола. Последнее должно находить отражение в структурно-функциональных особенностях донора фотоассимилятов – листьев брахибластов. Известно, что у карельской березы они имеют более крупные размеры (Николаева, Новицкая, 2007), по сравнению с аналогичными побегами обычной березы.

3.4 Отличие путей метаболизации сахарозы в камбиальной зоне при формировании древесины с разной степенью узорчатости

При любом варианте скрещивания родительских форм в потомстве карельской березы появляются особи как с узорчатой, так и безузорчатой текстурой древесины (Любавская, 1978; Ермаков, 1986; Машкина и др., 2000; Новицкая, 2008). Для выяснения взаимосвязи между степенью узорчатости древесины ствола и путем утилизации сахарозы исследовали 25-летние растения карельской березы,

произрастающие в лесных культурах, и 11-летние растения обычной и карельской березы, произрастающие на Биологической станции КарНЦ РАН. Отбор образцов (начало июля 2016 г.) пришелся на период активного утолщения клеточной стенки.

Узорчатые особи карельской березы, произрастающие в лесных культурах, обладали высоким уровнем индивидуальной изменчивости по расположению и плотности рисунка в стволе. Все растения по степени проявления узорчатости были поделены на группы согласно способу диагностики узорчатой текстуры древесины (Галибина и др., 2016), предложенному В.И. Ермаковым (1986). Каждой группе растений был присвоен балл от 0 до 3. Безузорчатые растения карельской березы (0 баллов) характеризовались следующим метаболическим статусом: диссимиляция сахарозы происходила преимущественно по сахарозосинтазному пути (активность СС 2.7 и 1.5 мкмоль/мг белка в ксилеме и во флоэме соответственно); существенное расщепление сахарозы в апопласте наблюдалось только в тканях флоэмы (активность АпИInv 6 мкмоль/г сырой ткани) (рис. 3).

Показано, что у растений карельской березы с увеличением степени узорчатости древесины снижалась метаболизация сахарозы по СС-пути в ксилеме (активность СС 2.0, 2.0 и 1.7 мкмоль сахарозы на мг белка у растений со степенью узора 1, 2 и 3 балла соответственно) и во флоэме (активность СС 0.7, 0.6 и 0.4 мкмоль сахарозы на мг белка у растений со степенью узора 1, 2 и 3 балла соответственно) (рис. 3). При этом, повышалась активность АпИInv в ксилеме (0.8, 2.4 и 4.2 мкмоль сахарозы на г ткани у растений со степенью узора 1, 2 и 3 балла соответственно) и во флоэме (25, 42 и 72 мкмоль сахарозы на г ткани у растений со степенью узора 1, 2 и 3 балла соответственно) (рис. 3).

Корреляция между баллом узорчатости и активностью ферментов метаболизации сахарозы была обнаружена только для АпИInv как во флоэме (коэффициент корреляции Спирмена (ρ) = 0.99, при $p < 0.01$), так и в ксилеме ($\rho = 0.97$, при $p < 0.05$). Существенных отличий между растениями с разной степенью узорчатости древесины по активности СС не обнаружено.

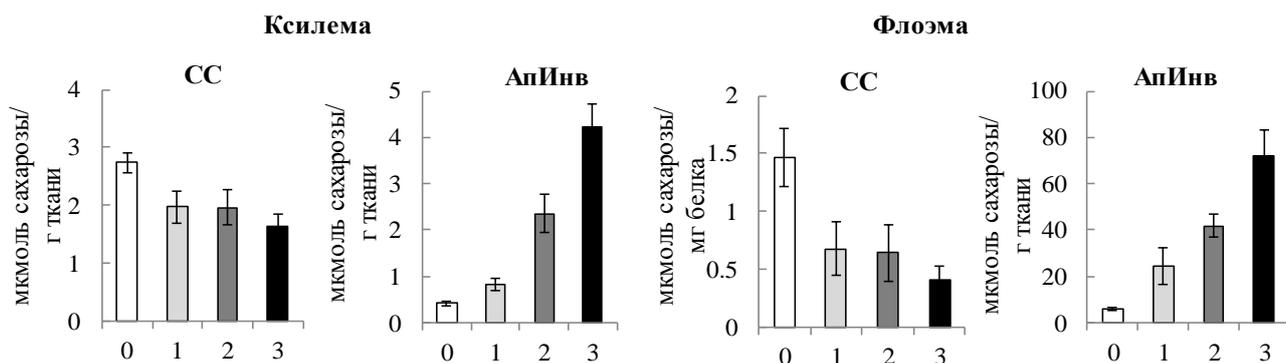


Рисунок 3. Активность сахарозосинтазы (СС) и апопластной инвертазы (АпИInv) в ксилеме и флоэме 25-летних безузорчатых (0 баллов) и узорчатых (1-3 балла степень узорчатости) растений карельской березы, произрастающих в лесных культурах. По оси абсцисс – степень узорчатости растений (баллы). Представлены средние значения и их стандартные ошибки.

Изучение активности ферментов метаболизации сахарозы в камбиальной зоне узорчатых и безузорчатых участков одного ствола узорчатых 11-летних растений карельской березы показало, что повышенная активность АпИInv в камбиальной зоне наблюдается только в местах образования узора. В узорчатой части ствола карельской

березы, по сравнению с обычной березой, в камбиальной зоне выявленные метаболические отличия были подобны тем, что показаны ранее (разделы 3.1-3.3). Во флоэме на фоне меньшего (в 1.2 раза) содержания сахарозы выше активность ферментов ее утилизации – АПИИИВ (в 2.6 раза) и СС (в 1.6 раза). При этом, в ксилеме утилизация сахарозы ниже в 3.8 раза по СС-пути и выше в 1.6 раза по апопластному пути; также возрастает в 2.2 раза количество крахмала (рис. 4).

В безузорчатой части ствола карельской березы, как и у обычной березы, активность АПИИИВ была ниже в 2 раза в ксилеме и во флоэме, по сравнению с узорчатой частью. Утилизация сахарозы по СС-пути превосходила таковую не только в узорчатой части ствола карельской березы (в 5 раз), но и у обычной березы (в 1.3 раза). Еще одна особенность безузорчатой части ствола узорчатых растений – это накопление крахмала в дифференцирующейся ксилеме, количество его было выше, чем у обычной березы и в узорчатой части ствола (рис. 4).

В период камбиального роста у обычной березы в ксилеме запасание крахмала происходило слабо. Его содержание не превышало 0.2 мг/г сухой ткани. Низкие значения содержания крахмала в ксилеме наблюдали на фоне высокой активности в них СС. В ксилеме узорчатых растений карельской березы, наоборот, крахмал накапливался (0.5 и 0.4 мг/г в безузорчатой и узорчатой частях ствола соответственно). Накопление крахмала в безузорчатой части ствола происходило на фоне высоких значений активности СС, в узорчатой части, напротив, – на фоне снижения активности фермента (рис. 4).

Подобные закономерности получены для 6-летних и 10-летних растений обычной и карельской березы.

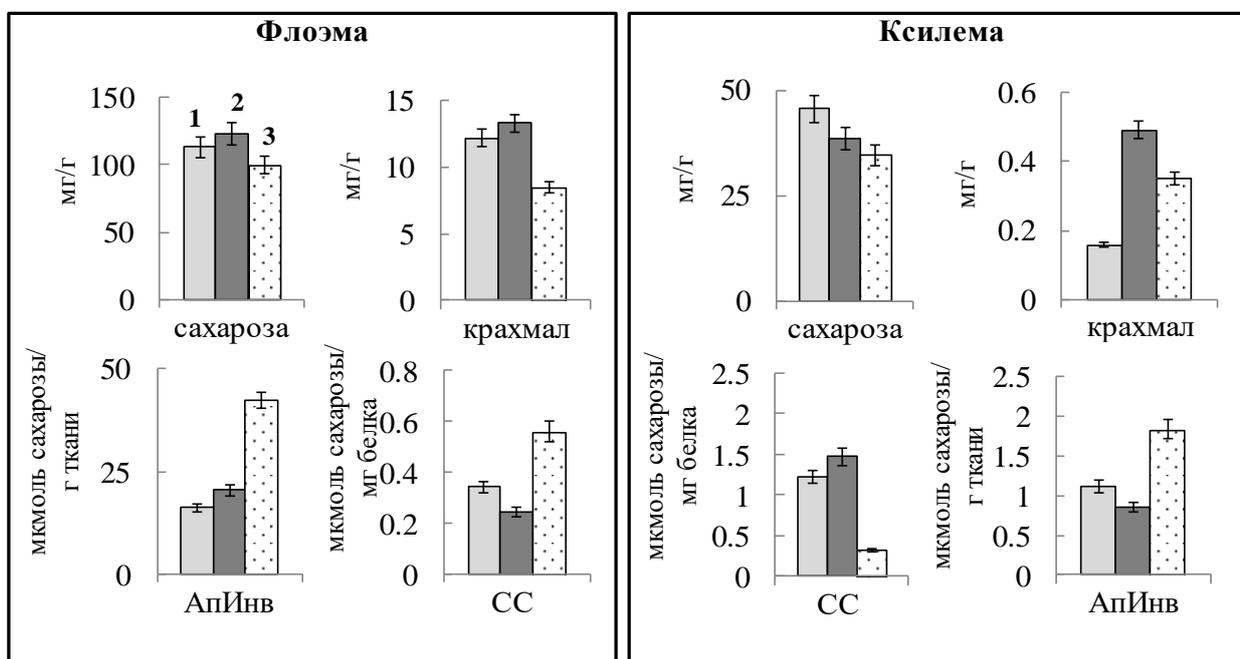


Рисунок 4. Содержание сахарозы и крахмала, активность апопластной инвертазы (АПИИИВ) и сахарозосинтазы (СС) у 11-летних растений *B. pendula* var. *pendula* (1) и *B. pendula* var. *carelica* в узорчатых (3) и безузорчатых (2) участках одного ствола. Представлены средние значения и их стандартные ошибки.

Таким образом, изменение соотношения активности СС/АПИИИВ в сторону увеличения активности последней – отличительная особенность узорчатых растений,

по сравнению с безузорчатыми растениями карельской березы и с растениями обычной березы. Увеличение степени узорчатости древесины коррелирует с возрастанием метаболизма сахарозы по апопластному пути. В тканях ствола узорчатых растений снижение активности СС и возрастание активности АпИInv происходит локально, только в местах структурных аномалий. Выявленные метаболические нарушения можно использовать в качестве биохимического индикатора степени узорчатости древесины.

3.5. Содержание сахаров и соотношение активности ферментов утилизации сахарозы у сеянцев двух форм березы повислой

Исследование активности СС и АпИInv в органах и тканях на начальных этапах онтогенеза проводили на 7- и 17-недельных сеянцах, выращенных из семян обычной и карельской березы. У 7-недельных растений корень является основным потребляющим органом (метаболизация сахарозы в корнях выше, по сравнению со стеблем) (рис. 5). Высокая акцепторная сила корня поддерживается, в основном, за счет активности СС, что согласуется с литературными данными (Никитин, Измайлов, 2016; Coleman et al., 2008, 2010). Активность СС в корне превосходила таковую в стебле в 2.2 и 3 раза у обычной и карельской березы соответственно (рис. 5).

У 7-недельных сеянцев карельской березы, по сравнению с растениями обычной березы, активность СС выше как в корне (в 2 раза), так и в стебле (в 1.5 раза), что может свидетельствовать о более интенсивном протекании у нее процессов структурообразования на ранних этапах развития.

У 17-недельных растений, по сравнению с 7-недельными, основным акцептором ассимилятов становится стебель. Атрагирующая способность стебля возрастает по мере роста и развития древесных растений, при этом клеточные стенки ксилемы становятся основными аккумуляторами биомассы (Антонова, 2011). В стебле 17-недельных сеянцев обычной березы, по сравнению с 7-недельными растениями, в 7 раз выше активность СС и в 3.6 раза – активность АпИInv. В корнях к 17-ти неделям в 2.5 раза возрастает активность СС. У 17-недельных сеянцев карельской березы, по сравнению с 7-недельными растениями, в стебле метаболизация сахарозы СС увеличивается всего в 1.5 раза, в то время как активность АпИInv возрастает в 6.3 раза. В корнях отмечается снижение активности СС до 20 мкмоль/г сырой ткани (рис. 5).

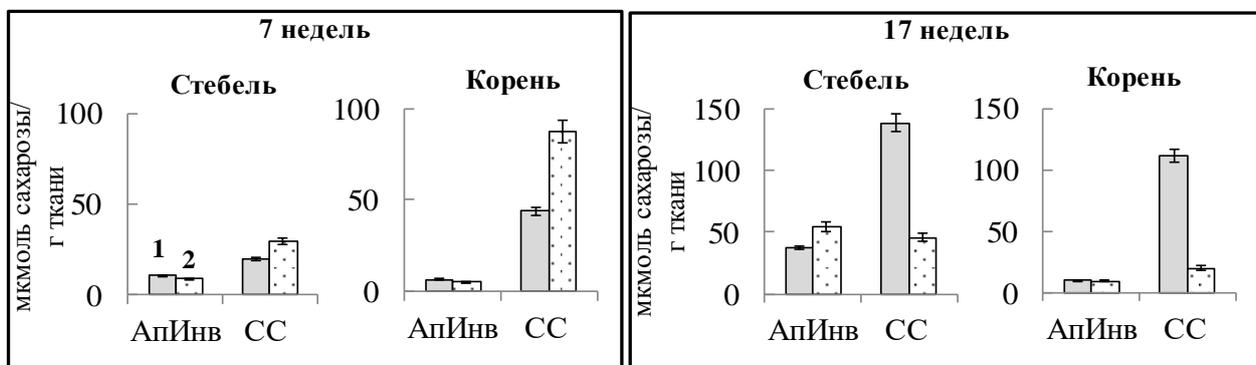


Рисунок 5. Активность апопластной инвертазы (АпИInv) и сахарозосинтазы (СС) в стебле и корне 7- и 17-недельных сеянцах *B. pendula* var. *pendula* (1) и *B. pendula* var. *carelica* (2). Различия значимы при $p < 0.05$.

У 17-недельных сеянцев обычной березы, как и у 7-недельных растений, в стебле и в корне выше активность СС, а активность АпИнв значимо ниже. У 17-недельных сеянцев карельской березы, напротив, в стебле на фоне меньшей активности СС (в 4 раза по сравнению с обычной березой) возрастает активность апопластного фермента (в 1.5 раза по сравнению с обычной березой) (рис. 5).

Таким образом, уже на ранних этапах развития (до появления видимых отличий) у карельской березы уменьшение метаболизации сахарозы по СС-пути компенсируется увеличением ее утилизации по инвертазному пути.

ГЛАВА 4. Молекулярно-генетические механизмы регуляции разных сценариев ксилогенеза

4.1. Регуляция активности сахарозосинтазы на уровне экспрессии кодирующих ее генов в период камбиального роста

На 25-летних деревьях карельской березы, различающихся по степени узорчатости древесины и произрастающих на лесосеменной плантации, провели сравнительное изучение активности СС и уровня экспрессии кодирующих ее генов (*Sus1* и *Sus2*). Отбор образцов пришелся на период активного формирования ранней тонкостенной древесины. Было показано, что у безузорчатых растений в развивающейся ксилеме бóльшая в 1.7 раза активность СС, по сравнению с узорчатыми растениями, была обусловлена бóльшим содержанием транскриптов мРНК генов *Sus1* и *Sus2* в 1.7 и 1.9 раза соответственно. Между узорчатыми растениями, различающимися по степени насыщенности узора, достоверных отличий по активности СС не обнаружено. При этом между растениями со степенью узорчатости 3 балла и растениями со степенью узорчатости 1-2 балла наблюдались отличия в содержании транскриптов мРНК генов *Sus1* и *Sus2*, уровень экспрессии которых у высокоузорчатых растений (3 балла) был выше (рис. 6).

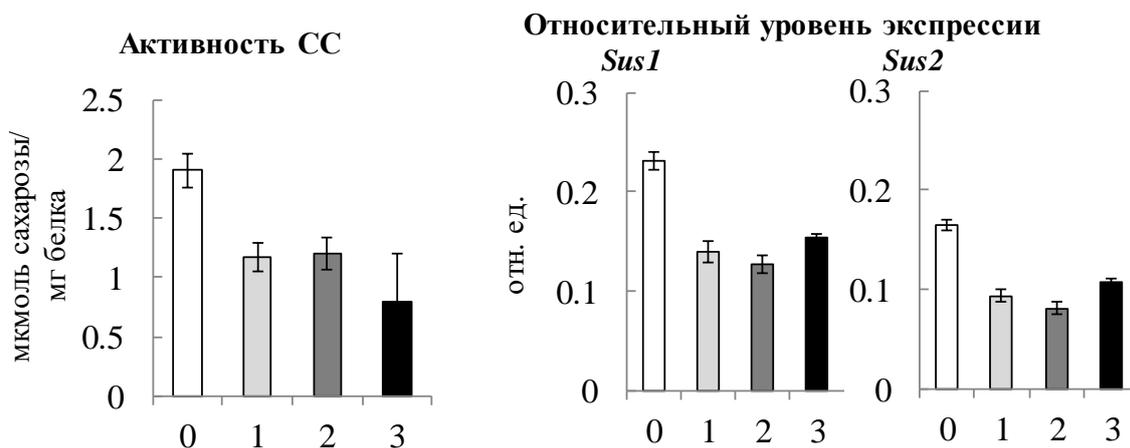


Рисунок 6. Активность сахарозосинтазы (СС) и относительный уровень экспрессии кодирующих ее генов *Sus1*, *Sus2* в зоне формирования ксилемы 25-летних безузорчатых (0 баллов) и узорчатых (1-3 балла степень узорчатости) растений карельской березы, произрастающих в лесных культурах. По оси абсцисс – степень узорчатости растений (баллы). Представлены средние значения и их стандартные ошибки. Различия значимы при $p < 0.05$.

Еще одна особенность высокоузорчатых растений карельской березы (3 балла) – это большая индивидуальная изменчивость активности СС. Значения ее варьировали от 0.3 до 1.8 мкмоль сахарозы / мг белка у растений, произрастающих на разных по почвенным условиям участках. При разной активности СС уровень экспрессии кодирующих ее генов *Sus1* и *Sus2* у высокоузорчатых растений карельской березы не различался. Из этого следует, что регуляция активности СС у этих растений осуществляется не только на уровне транскрипции, но и на посттрансляционном уровне. Влияние на активность СС плодородия почвы рассмотрено в главе 6. Закономерности, полученные на 25-летних растениях, подтвердились на 10-летних растениях обычной и карельской березы.

Исследование выявило, что биохимические и молекулярные различия между растениями обычной и карельской березы закладываются еще на ранних этапах развития, т.е. до начала формирования характерной аномальной по структуре древесины. В стебле 5-10-недельных сеянцев обычной березы активность СС с возрастом увеличивалась от 0.4 до 2 мкмоль сахарозы/мг белка, что сопровождалось увеличением уровня экспрессии кодирующих ее генов *Sus1* и *Sus2*. В стебле 5-, 6-недельных сеянцев карельской березы активность СС была в 1.5-2 раза ниже, к 7 неделям возрастала до уровня обычной березы, снижалась в 2 раза к 8 неделям и оставалась на этом уровне у 10-недельных сеянцев. При этом количество транскриптов мРНК генов *Sus1* и *Sus2* было примерно в 2-3 раза ниже, по сравнению с обычной березой (рис. 7).

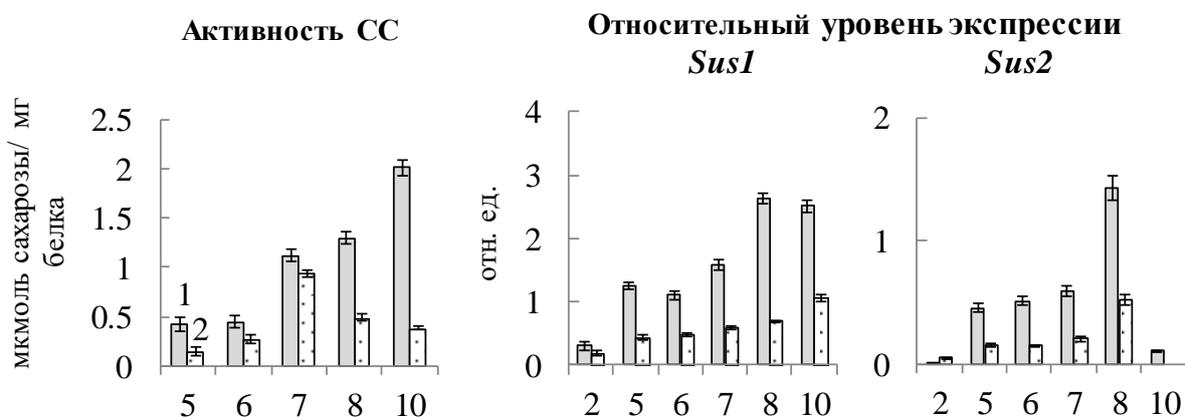


Рисунок 7. Активность сахарозосинтазы (СС) и относительный уровень экспрессии кодирующих ее генов *Sus1* и *Sus2* в сеянцах разного возраста растений *B. pendula* var. *pendula* (1) и *B. pendula* var. *carelica* (2). По оси абсцисс – возраст сеянцев (недели). Различия значимы при $p < 0.05$.

Таким образом, уже на начальных этапах развития уровень экспрессии генов, кодирующих изоформы *Sus1* и *Sus2*, у карельской березы ниже, при этом интересным является факт возрастания активности СС у 7-недельных сеянцев карельской березы в стебле. В этом возрасте у сеянцев карельской березы активность СС в корне была в 2 раза выше, по сравнению с таковой у обычной березы (раздел 3.5, рис. 5). То есть 7-недельные сеянцы можно рассматривать как растения, находящиеся в переходном состоянии, у которых начинается перестройка метаболических путей утилизации сахарозы.

4.2. Участие сахарозосинтазы в синтезе целлюлозы и крахмала в период камбиального роста

В ходе ксилогенеза СС активно включается в метаболизм клеток на этапе отложения вторичной клеточной стенки, регулируя количество УДФ-глюкозы, идущей на синтез микрофибрилл целлюлозы. Данный этап является очень важным, поскольку именно вторичные клеточные стенки имеют наибольшую массовую долю в древесине (Dinwoodie, 1975). У 25-летних растений карельской березы в период камбиального роста снижение активности СС с увеличением степени узорчатости древесины (рис. 3) сопровождалось снижением содержания целлюлозы в формирующейся ксилеме. У безузорчатых растений ее количество составило 45.5%, что достоверно выше по сравнению с узорчатыми растениями (содержание целлюлозы 42.0, 40.8, 38.2 % у растений со степенью узорчатости 1, 2 и 3 балла соответственно) (рис. 8). Целлюлозосинтаза кодируется семейством генов *CesA*, которое содержит десять или более членов (Liu et al., 2012). Был исследован уровень экспрессии трех генов, кодирующих целлюлозосинтазу, – *Ces8*, *Ces3*, *Ces7* (Salojärvi et al., 2017). Ген *Ces8* участвует в биосинтезе вторичной клеточной стенки, ген *Ces3* кодирует изоформу, участвующую в биосинтезе первичных клеточных стенок, а также может быть связан с синтезом гомоалактуронанов, ген *Ces7* кодирует специфическую целлюлозосинтазу ксилемы и, в основном, участвует в биосинтезе вторичной клеточной стенки (Liu et al., 2012; Salojärvi et al., 2017). Уменьшение целлюлозы в формирующейся ксилеме у карельской березы происходило на фоне снижения уровня экспрессии генов *Ces8*, *Ces3*, *Ces7*. У узорчатых растений карельской березы количество транскриптов мРНК генов *Ces8*, *Ces3* и *Ces7* было соответственно в 4, 2 и 2 раза меньше, по сравнению с безузорчатыми растениями. Достоверных отличий между растениями со степенью узора 1-3 балла обнаружено не было (рис. 8).

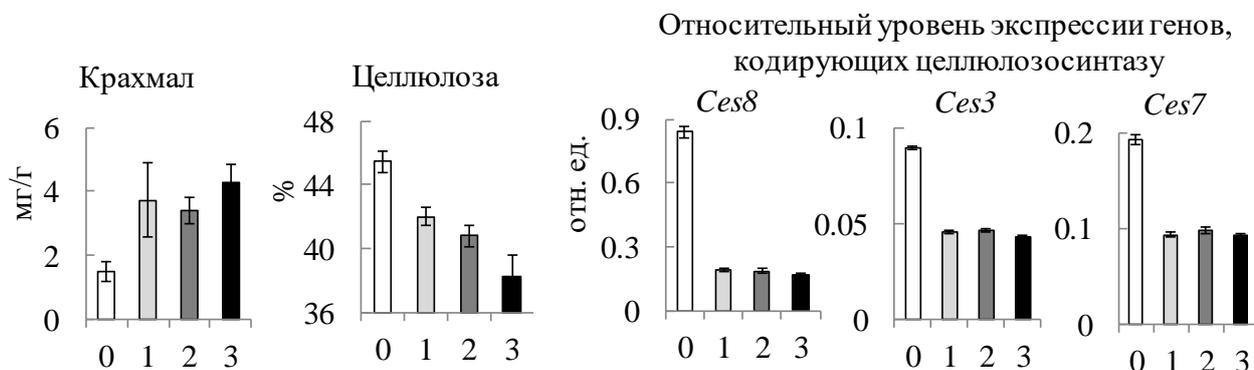


Рисунок 8. Содержание крахмала и целлюлозы и относительный уровень экспрессии генов, кодирующих целлюлозосинтазу (*Ces8*, *Ces3*, *Ces7*), в ксилеме 25-летних безузорчатых (0 баллов) и узорчатых (степень узорчатости 1-3 балла) растений карельской березы, произрастающих в лесных культурах. По оси абсцисс – балл узорчатости. Представлены средние значения и их стандартные ошибки. Различия значимы при $p < 0.05$.

В узорчатых участках ствола 25-летних растений карельской березы на фоне снижения содержания целлюлозы возрастало содержание крахмала. Количество его изменялось от 1.5 мг/г у безузорчатых растений (0 баллов) до 3.7, 3.4 и 4.3 мг/г у растений со степенью узорчатости 1, 2 и 3 балла соответственно. Следует отметить, что достоверных отличий по содержанию запасного полисахарида между узорчатыми

растениями обнаружено не было (рис. 8). Закономерности, полученные на 25-летних растениях, подтвердились на 10-летних растениях обычной и карельской березы с разной степенью узорчатости древесины.

Таким образом, в аномальных участках ствола, по сравнению с нормальными по строению участками, преобладают процессы, связанные с синтезом/распадом сахарозы и крахмала, а не синтезом структурных компонентов вторичных клеточных стенок. Если биосинтез целлюлозы сопровождается необратимым выведением сахаров из обмена веществ, то накопление крахмала – это временное выведение избытка сахаров. Через биосинтез/деградацию крахмала регулируется сахарозный статус клетки (Rolland et al., 2006; Nguyen et al., 2016). В клетке постоянно происходит разрушение крахмала и сахарозы до гексоз, которые транспортируются внутри компартментов клетки. Транспортёры глюкозы, сахарозы и других сахаров, расположенные на мембране амилопластов, тонопласте, плазматической мембране, обеспечивают поступление/извлечение сахаров в цитозоль и из него, что делает их частью системы, регулирующей постоянную концентрацию глюкозы в цитозоле (Nagele et al., 2009; Slewinski et al., 2009; Slewinski, 2011).

4.3. Изучение активности гексокиназы и уровня экспрессии генов, кодирующих переносчики сахаров, с точки зрения их потенциального участия в глюкозном сигналинге в клетке

При изучении механизмов дифференцировки клеток камбиальной зоны древесных растений важным вопросом является наличие или отсутствие плазмодесменных связей между клетками проводящей флоэмы и камбиальной зоны. Результаты проведенного исследования показали, что у березы имеет место единая симпластная сеть, объединяющая ситовидные трубки флоэмы, клетки радиальных лучей, материнские клетки флоэмы. Плазмодесменные контакты между проводящей флоэмой и зоной дифференциации ксилемы у березы повислой осуществляются только по паренхимным клеткам радиальных лучей, симпластические связи между клетками лучей и прозенхимными ксилемными производными камбия отсутствуют. Полученные результаты подтверждают высказанное другими авторами (Barnett, Harris, 1975) предположение об апопластном транспорте сахарозы из клеток лучей в прозенхимные ксилемные производные камбия.

Из апопласта сахароза может переноситься транспортером, расположенном на плазматической мембране, в клетку и/или гидролизоваться во внеклеточном пространстве с участием АpИнв до гексоз, которые затем транспортируются в клетку с помощью переносчиков гексоз (Ruan et al., 2010; Wang, Ruan, 2013).

На 25-летних деревьях карельской березы с разной степенью узорчатости древесины определили уровень экспрессии генов, кодирующих транспортеры гексоз (*Hes1*, *Hes2*), в формирующейся ксилеме. Исследование проводили в период активного деления в камбиальной зоне. У карельской березы количество транскриптов мРНК генов *Hex1* и *Hex2* было значительно больше в формирующейся аномальной древесине (рис. 9). В камбиальной зоне узорчатых растений снижается в 2-2.5 раза содержание гексоз (рис. 9) и возрастает в 2.5-3 раза количество крахмала (рис. 8). По содержанию сахарозы безузорчатые растения и растения с баллом узорчатости 1 и 2 не отличались между собой. У высокоузорчатых растений (3 балла) на фоне меньшего содержания сахарозы (рис. 9) в клетках ксилемы синтезируется большее количество крахмала (рис. 8).

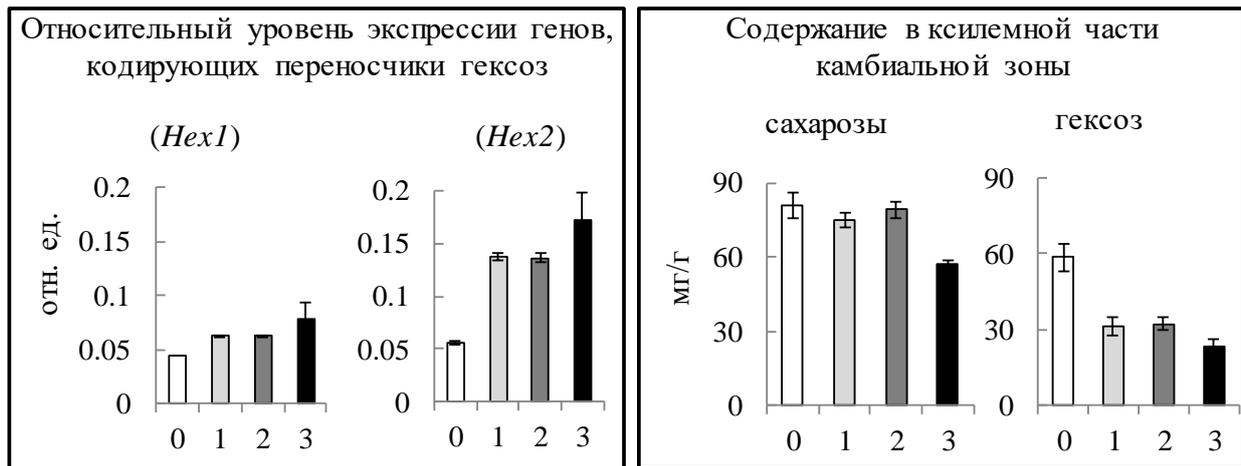


Рисунок 9. Относительный уровень экспрессии генов, кодирующих транспортеры гексоз *Hex1* и *Hex2*, содержание сахарозы и гексоз в ксилеме 25-летних безузорчатых (0 баллов) и узорчатых (степень узорчатости 1-3 балла) растений карельской березы, произрастающих на лесосеменной плантации. По оси абсцисс – балл узорчатости. Представлены средние значения и их стандартные ошибки. Различия значимы при $p < 0.05$.

4.4. Регуляция активности апопластной инвертазы на транскрипционном и посттрансляционном уровнях в период камбиального роста

В период формирования тонкостенных клеток ксилемы (ранняя древесина) у безузорчатых 25-летних растений карельской березы активность АПИИИВ в ксилеме была низкой и не превышала 0.4 мкмоль сахарозы/г ткани. У узорчатых растений активность АПИИИВ в ксилеме была в 2.5-4.5 раза выше и составила 1, 1.3, 1.8 мкмоль сахарозы/г ткани у растений со степенью узорчатости 1, 2 и 3 балла соответственно. Рассмотрим возможные пути регуляции активности АПИИИВ.

У безузорчатых растений содержание транскриптов генов *CWIN1*, *CWIN1.1*, *CWIN4*, кодирующих АПИИИВ, в ксилеме составило 0.04, 0.03 и 0.01 отн. ед. соответственно. У узорчатых растений уровень экспрессии генов *CWIN1*, *CWIN1.1*, *CWIN4* в аномальных участках превышает таковые в нормальных тканях ксилемы в 4-5 раз. Между растениями с разной степенью узорчатости не было обнаружено отличий по количеству транскриптов генов *CWIN1*, *CWIN1.1*, *CWIN4*, относительный уровень их экспрессии, как и активность АПИИИВ, сильно варьировали в зависимости от условий произрастания дерева.

Более тонкая регуляция активности АПИИИВ осуществляется на посттрансляционном уровне. Белковый ингибитор апопластной инвертазы растений, кодируемый геном *C/VIF* (*CIF*), участвует в регуляции транспорта сахарозы и ее метаболизма (Rausch and Greiner, 2004; Roitsch and Gonzalez, 2004). Появление избытка сахарозы в апопласте снижает уровень экспрессии генов *CIF*, приводя к возрастанию активности АПИИИВ (Ruan et al., 2010; French et al., 2014; Ruan, 2014; Tang et al., 2016). Низкий уровень экспрессии *CIF* в камбиальной зоне и формирующейся ксилеме у обеих форм березы свидетельствует о довольно высоком количестве сахарозы в апопласте. Как было показано в разделе 4.3, между клетками радиальных лучей и прозенхимными ксилемными производными камбия транспорт сахарозы идет по апопластному пути. У узорчатых растений на фоне большей экспрессии генов *CWIN* и высокой активности кодируемой ими АПИИИВ был выше и уровень экспрессии

генов, кодирующих белковый ингибитор АpИнв (*CIF*). Подобное, казалось бы, противоречие может свидетельствовать о том, что в камбиальной зоне узорчатых растений в период формирования ранней тонкостенной древесины содержание сахарозы в апопласте меньше, чем у безузорчатых растений. Косвенным подтверждением этого может быть высокая утилизация сахарозы с участием АpИнв у узорчатых растений, и тот факт, что в формирующейся аномальной древесине было значительно больше количество транскриптов мРНК генов *Hex1* и *Hex2*.

В связи с этим представляет интерес рассмотрение путей регуляции активности АpИнв в тканях ствола обычной березы с нормальным строением ксилемы и флоэмы и карельской березы с разной степенью аномальности вторичных проводящих тканей (узорчатая и безузорчатая части ствола). Активность АpИнв в узорчатой части ствола карельской березы была в 2.6 и 2 раза выше, по сравнению с обычной березой, во флоэме и ксилеме соответственно. Высокая активность АpИнв наблюдалась на фоне большей экспрессии кодирующих ее генов (*CWIN1*) (в 1.5 и 1.7 раза во флоэме и ксилеме соответственно). При этом содержание транскриптов мРНК гена, кодирующего белковый ингибитор АpИнв (*CIF*), было в 4.5 и 3 раза меньше во флоэме и ксилеме соответственно (рис. 10).

В тканях безузорчатой части ствола карельской березы активность АpИнв была в 2 раза ниже, по сравнению с узорчатой частью, и существенно не отличалась от таковой у обычной березы. При этом содержание транскриптов гена *CWIN1* было в 6 и 9 раз меньше, по сравнению с узорчатой частью, и в 4 и 4.6 раза меньше, по сравнению с обычной березой, во флоэме и ксилеме соответственно (рис. 10).

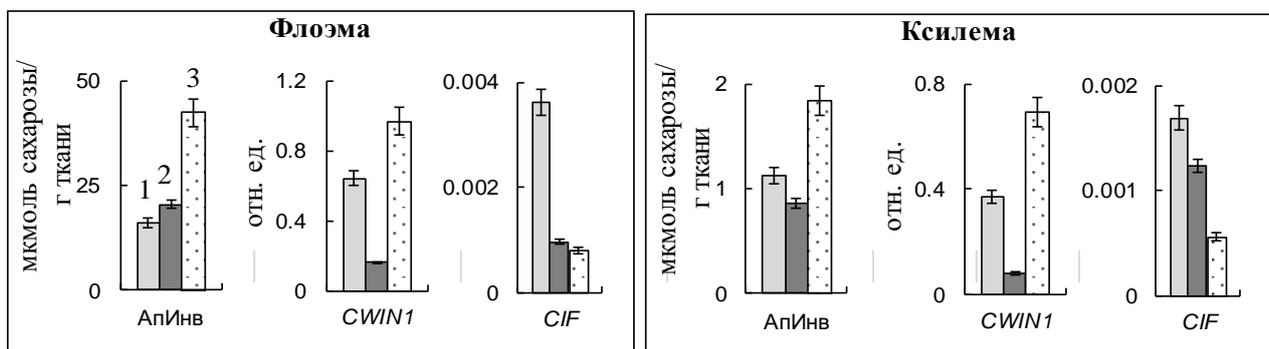


Рисунок 10. Активность апопластной инвертазы (АpИнв) и относительный уровень экспрессии кодирующего ее гена *CWIN1* и гена, кодирующего белковый ингибитор АpИнв (*CIF*), в тканях ствола 11-летних растений обычной березы (1), безузорчатой (2) и узорчатой (3) частях ствола карельской березы. Представлены средние значения и их стандартные ошибки. Различия значимы при $p < 0.05$.

На основании полученных данных можно предположить, что регуляция активности АpИнв в безузорчатой части ствола узорчатых растений карельской березы (рис. 10), как и у безузорчатых растений карельской березы, происходит на уровне экспрессии генов *CWIN*. В нормальной по строению древесине обычной березы в период камбиального роста уровень экспрессии генов, кодирующих АpИнв, существенно не отличается от такового у карельской березы в местах аномалий, а регуляция активности фермента происходит, в основном, на посттрансляционном уровне через белковые ингибиторы (*CIF*) (рис. 10). Это позволяет предположить, что у обычной березы во флоэме находится в основном внутриклеточная сахароза, которая по симпласту поступает в камбиальную зону, где выходит в апопласт и,

быстро передвигаясь к прозенхимным ксилемным производным камбия, не накапливается во внеклеточном пространстве.

4.5. Экспериментальное изменение активности апопластной инвертазы у обычной березы повислой

Введение экзогенной сахарозы. Для изучения влияния сахарозы на активность инвертазы у обычной березы был проведен эксперимент с введением в ткани ствола растворов сахарозы разной концентрации (1%, 2.5%, 5%, 10% и 20 %).

Показано, что введение растворов сахарозы привело к возрастанию активности АпИInv. В непроводящей флоэме (1-й слой) при концентрации сахарозы 1% активность АпИInv возросла, по сравнению с контролем, в 3 раза и оставалась на таком высоком уровне (~ 50 мкмоль сахарозы/г сырой массы) во всех вариантах опыта. В камбиальной зоне (2-й слой) активность АпИInv с возрастанием концентрации сахарозы увеличивалась линейно и достигла максимальных значений (122 мкмоль сахарозы/г сырой массы) в варианте 10%. В ксилеме (3-й слой) АпИInv достигла максимальной активности при 2.5 % сахарозе (30 мкмоль сахарозы/г сырой массы), в вариантах 5% и 10% активность фермента была несколько ниже. То есть, поступающая из экзогенного раствора "дополнительная" сахароза активно метаболизируется в тканях с участием АпИInv, и в каждой зоне, вероятно, есть свой предел, до которого может возрастать активность АпИInv. Так, в проводящей флоэме и камбиальной зоне (2-й слой) максимальная активность АпИInv соизмерима с концентрацией сахарозы во флоэмном экссудате в августе.

Повышение уровня эндогенной сахарозы. Путем кольцевания ствола деревьев обычной березы нарушали нисходящий транспорт сахаров. Указанный методический прием широко используется для изучения камбиального роста в условиях различной обеспеченности тканей ассимилятами. На стволах опытных деревьев в период активных делений в камбиальной зоне (19.06.2017) было выполнено двойное кольцевание по методике Daudet et al. (2005). Отбор тканей ствола проводили в 7 зонах, различающихся по обеспеченности сахарами. Часть ствола, расположенная выше верхнего кольца, сохраняла связь с кроной и продолжала снабжаться ассимилятами, образующимися в процессе фотосинтеза. Поскольку в эксперименте полностью удалялась проводящая флоэма, было высказано предположение, что в этой части ствола будут накапливаться сахара с максимумом в зоне непосредственно над кольцом (1 зона) с последующим снижением на расстоянии 5, 10, 15 и 35 см выше верхней границы кольца (2-5 зоны соответственно). Участок ствола, расположенный между 2-мя кольцами, был полностью изолирован от флоэмного притока сахаров и мог использовать только сахара, образующиеся при расщеплении запасных соединений (6 зона). Участок ствола, расположенный под нижним кольцом, мог получать углеводы, запасенные ниже по стволу и в корнях (7 зона). На контрольных деревьях образцы отбирали с мест, соответствующих по высоте 1-7 зонам у окольцованных деревьев. Отбор образцов проводили на 10-й день после начала эксперимента (29 июня 2017).

Нарушение флоэмного транспорта привело к существенному изменению уровня экспрессии генов, кодирующих АпИInv как во флоэме, так и в ксилеме. Во флоэме количество транскриптов мРНК гена *SWIN1* увеличилось, по сравнению с контролем, в 2.7, 1.9, 1.6 и 1.5 раза в 1, 2, 3 и 4 зонах соответственно (рис. 11). Полученные данные подтверждают наше предположение, что из-за нарушения нисходящего флоэмного транспорта в этих местах мог образоваться избыток

сахарозы, для расщепления которой и потребовалось увеличение активности АпИнв. Минимальный уровень экспрессии гена *CWIN1* наблюдался в 6 зоне, которая была полностью изолирована от флоэмных потоков фотоассимилятов и могла использовать только сахара, образующиеся при расщеплении запасных соединений. При этом количество транскриптов мРНК гена *CWIN1* в 7 зоне, расположенной под нижним кольцом, возросло, по сравнению с контролем, в 1.6 раза. Это свидетельствует о возможности поступления в этот участок сахаров, запасенных в нижележащей части ствола и в корнях. В ксилеме не обнаружен градиент в распределении транскриптов мРНК гена *CWIN1* в зависимости от зоны, их количество равномерно было выше в ~1.4 раза по сравнению с контролем (рис. 11).

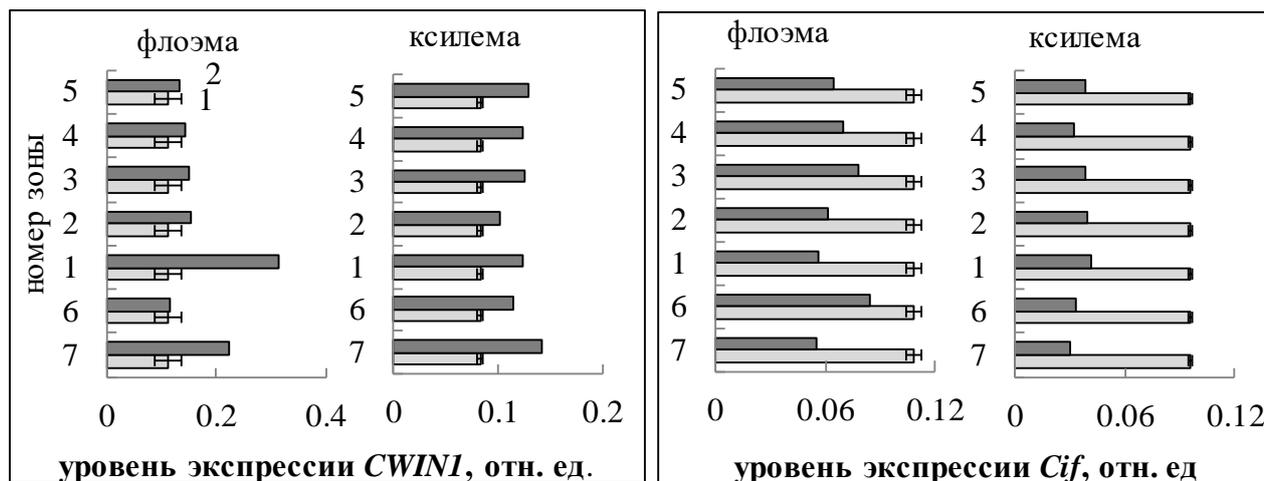


Рисунок 11. Уровень экспрессии генов, кодирующих апопластную инвертазу (*CWIN1*) и белковый ингибитор апопластной инвертазы (*Cif*), в исследуемых зонах деревьев, подвергшихся кольцеванию (2), и контрольных (1) деревьев.

Данные, полученные в ходе эксперимента с кольцеванием ствола, указывают на то, что регуляция активности АпИнв, по всей видимости, происходила не только на уровне экспрессии кодирующих ее генов, но и на посттрансляционном уровне. Содержание транскриптов мРНК гена, кодирующего белковый ингибитор АпИнв, возросло у опытных растений, по сравнению с контрольными, в 1.6 и 2.6 раза во флоэме и ксилеме соответственно (рис. 11), что свидетельствует об увеличении количества сахарозы в апопласте.

ГЛАВА 5. Основные регуляторы развития ствольных клеток камбиальной зоны

5.1. Изменение экспрессии генов, кодирующих *CLE*-пептиды группы *B* (*CLE-41*) и их рецептор (*TDR*), в период камбиального роста

Развитие сосудистой системы растений требует сложной координации между двумя процессами: пролиферацией клеток камбиальной зоны и их последующей дифференциацией. Центральную роль в судьбе ствольных клеток латеральной меристемы играют TDIF-пептид *CLE-41* и его рецептор *TDR*, которые влияют на скорость деления клеток, ориентацию клеточных делений и дифференциацию клеток (Ito et al., 2006; Fisher, Turner, 2007; Hirakawa et al., 2008; Whitford et al., 2008; Du, Groover, 2010; Etchells, Turner, 2010; Etchells et al., 2012, 2013, 2015; Додуева и др., 2012, 2014; Ye, Zhong, 2015; Nieminen et al., 2015).

Относительный уровень экспрессии гена, кодирующего CLE-пептиды (*CLE41*), у 46-летних растений обычной березы во флоэме в период формирования тонкостенных клеток ксилемы (ранняя древесина) (15.06.2016) составил 0.04 усл. ед., повысился к началу июля в 3 раза и оставался на этом уровне до конца июля. В ксилеме обычной березы ген *CLE41* практически не экспрессировался. Эти данные согласуются с представлением о том, что для поддержания правильно ориентированных клеточных делений необходима локализованная экспрессия *CLE41* во флоэме (Etchells, Turner, 2010).

Количество транскриптов мРНК гена *PXY*, кодирующего рецептор для CLE-41, со стороны флоэмы в период формирования ранней тонкостенной древесины (15.06.2016) составило 0.04 усл. ед. и повысилось к 07.07.2016 г. в 2 раза. Со стороны ксилемы уровень экспрессии гена *PXY* был в 2 раза выше, по сравнению с флоэмой. *PXY*-рецепторная киназа синтезируется в ксилемных производных камбия (Etchells, Turner, 2010). В период камбиального роста при снятии коры с древесины разрыв тканей происходит по зоне активного растяжения клеток. В период исследования эта зона приходилась на слой роста и дифференциации клеток ксилемы, поэтому структурные элементы ксилемы оказались как со стороны препарированной нами «флоэмы», так и со стороны «ксилемы», что может быть причиной наличия в них транскриптов мРНК гена *PXY*.

У карельской березы был обнаружен ряд существенных отличий от обычной березы. Во-первых, во флоэме у нее был в 3 раза выше уровень экспрессии гена *CLE41*. Как со стороны флоэмы, так и со стороны ксилемы в 4-10 раз было выше количество транскриптов мРНК гена *PXY*, кодирующего рецептор для лиганда CLE-41. У карельской березы в местах формирования аномальной древесины на фоне большей экспрессии генов *CLE41* и *PXY* шире зона проводящей флоэмы и камбиальная зона и меньше размер зоны формирования ксилемы, по сравнению с нормальной древесиной обычной березы. Полученные данные согласуются с известными функциями лиганд-рецепторной системы CLE41/*PXY*, а именно, ее участием в подавлении развития ксилемы, а также в регулировании числа и ориентации делений клеток в сосудистых меристемах (Ito et al., 2006; Fisher, Turner, 2007; Hirakawa et al., 2008; Whitford et al., 2008; Du, Groover, 2010; Etchells, Turner, 2010; Etchells et al., 2012, 2013, 2015; Додуева и др., 2012, 2014; Gancheva et al., 2015; Nieminen et al., 2015 Ye, Zhong, 2015).

Если в ксилеме обычной березы ген *CLE41* практически не экспрессировался, то в ксилеме узорчатых растений карельской березы транскрипты мРНК гена *CLE41* были обнаружены. От локализации пептида CLE41 зависит ориентация деления клеток. Для нормального развития сосудов ксилемы требуется градиент концентрации пептида CLE41, экспрессия его гена должна быть ограничена флоэмой и прилегающими к ней клетками камбия. В линиях *35S::CLE41* (повсеместная экспрессия *CLE41*) и *IRX3::CLE41* (экспрессия *CLE41* в ксилеме) присутствуют сосуды ксилемы с резко отличающейся ориентацией: сосуды, имеющие нормальную ориентацию, расположены рядом с сосудами с перпендикулярной ориентацией (Fisher and Turner, 2007; Etchells, Turner, 2010). Исходя из вышесказанного, можно предположить, что обнаруженная нами эктопическая экспрессия гена *CLE41* в ксилеме узорчатых растений карельской березы может быть причиной нарушения ориентации деления ксилемных производных камбия.

Полученные результаты вместе с данными других исследователей (Ito et al., 2006; Hirakawa et al., 2008; Whitford et al., 2008; Etchells, Turner, 2010; Ye, Zhong, 2015;

Etchellset al., 2015; Nieminen et al., 2015) доказывают, что передача сигналов через PXY/CLE регулирует деление клеток в камбиальной зоне. Увеличение уровня экспрессии генов *CLE41* во флоэме и *PXY* в камбиальной зоне способствует увеличению числа делений в периклиальном направлении, а изменение локализации экспрессии *CLE41* приводит к нарушению плоскости деления стволовых клеток.

В связи с вышеизложенным представляет интерес рассмотрение экспрессии генов, кодирующих пептид CLE-41 и его рецептор PXY в нормальных по строению тканях ствола обычной березы и в тканях ствола карельской березы с разной степенью их аномальности (узорчатая и безузорчатая части ствола). У обычной березы уровень экспрессии гена *CLE41* во флоэме был в 15 раз, а уровень экспрессии гена *PXY* в камбиальной зоне в 7.8 раза ниже, по сравнению с узорчатой частью ствола карельской березы. Если в ксилеме обычной березы ген *CLE41* практически не экспрессировался, то в ксилеме узорчатой части ствола карельской березы обнаруживаются транскрипты мРНК гена *CLE41* (рис. 12). Распределение экспрессии генов *CLE41* и *PXY* в камбиальной зоне у 11-летних растений было схоже с таковым у 46-летних растений. Интересный результат был получен для безузорчатой части ствола узорчатых растений карельской березы. Если уровень экспрессии гена *CLE41* во флоэме занимал промежуточное положение между обычной березой и узорчатой частью ствола карельской березы, то в ксилеме его значение было в 5 раз выше, по сравнению с узорчатым участком. При этом количество транскриптов мРНК гена *PXY* в камбиальной зоне было в 1.2 и 9 раз ниже, по сравнению с обычной березой и узорчатой частью ствола карельской березы (рис. 12).

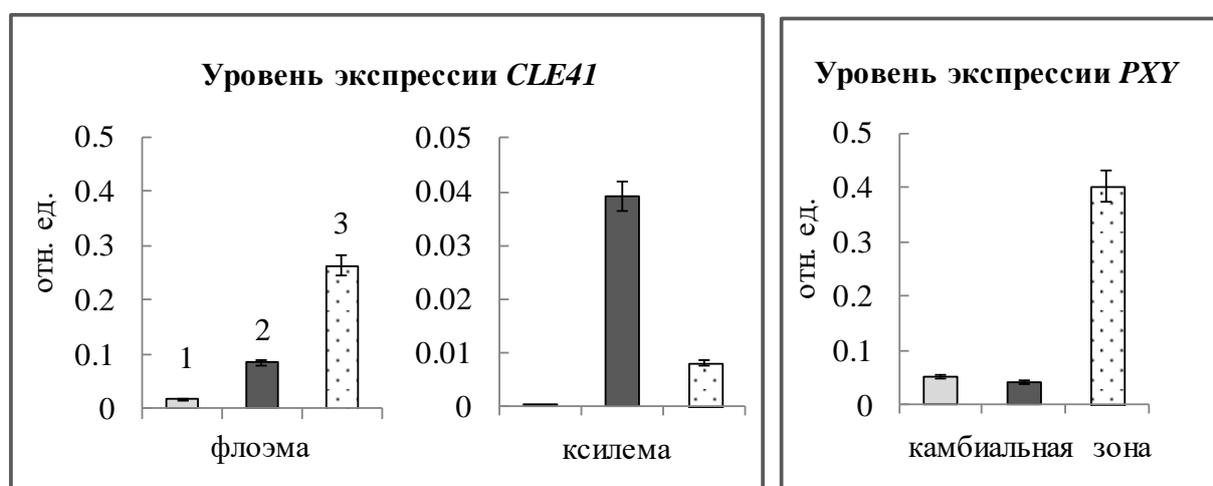


Рисунок 12. Относительный уровень экспрессии генов *CLE41*, *PXY* в тканях ствола 11-летних растений обычной березы (1), безузорчатой (2) и узорчатой (3) частях ствола карельской березы. Представлены средние значения и их стандартные ошибки. Различия значимы при $p < 0.05$.

Таким образом, формирование нормальной по строению древесины обычной березы, в составе которой преобладают сосуды и волокна, происходит на фоне экспрессии во флоэме гена *CLE41* и в камбиальной зоне – гена *PXY*. Формирование аномальной узорчатой древесины карельской березы, для которой характерны крупные включения клеток паренхимы и нарушение ориентации проводящих элементов, происходит на фоне (1) существенного увеличения уровня экспрессии гена *CLE41* во флоэме и гена *PXY* в камбиальной зоне и (2) эктопической экспрессии *CLE41* в ксилеме. В безузорчатых участках ствола узорчатых растений карельской

березы, где формирование нормальной по строению древесины происходит на фоне высокого содержания сахаров в тканях, функционирование камбиальных производных происходит на фоне (1) повышенной, по сравнению с обычной березой, но не так существенно, как в узорчатых участках ствола карельской березы, экспрессии *CLE41* во флоэме; (2) значительно увеличенной эктопической экспрессии *CLE41* в ксилеме и (3) пониженной экспрессии *PXY* в камбиальной зоне.

5.2. Распределение экспрессии генов, кодирующих факторы транскрипции *VND6*, *VND7* и *APL*, в камбиальной зоне при разных сценариях ксилогенеза

Транскрипционные факторы *VND6* и *VND7* регулируют развитие и дифференцировку клеток ксилемы, синтез вторичной клеточной стенки (Kubo et al. 2005; Demura and Fukuda 2007; Zhong and Ye 2007a; Du, Groover, 2010; Kondo et al., 2015). При образовании нормальной по строению древесины у обычной березы и безузорчатой карельской березы уровень экспрессии генов *VND6* и *VND7* в ксилеме был выше, по сравнению с узорчатыми растениями карельской березы (рис. 13). У обычной березы в ксилеме выше количество транскриптов мРНК гена *VND7* в 2 раза, по сравнению с безузорчатыми растениями, и в 10 раз, по сравнению с узорчатыми растениями. У безузорчатых растений, напротив, больше количество транскриптов мРНК гена *VND6* в 4.7 раза, по сравнению с обычной березой и узорчатыми растениями карельской березы. При этом растения карельской березы с разной степенью узорчатости древесины (1-3 балла) не отличались между собой по уровню экспрессии *VND6* и *VND7* (рис. 13).

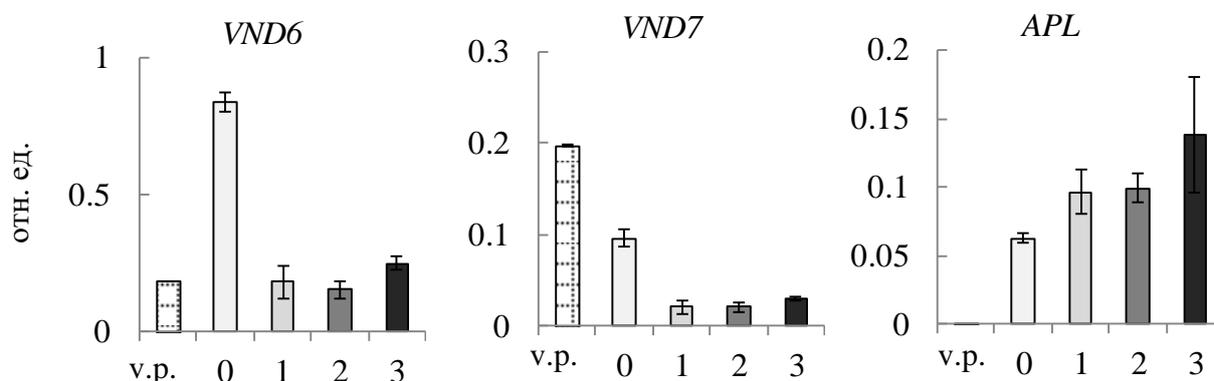


Рисунок 13. Относительный уровень экспрессии генов *VND6*, *VND7* и *APL* в ксилеме 25-летних растений обычной и карельской березы с разной степенью узорчатости древесины (0-3 балла). По оси абсцисс – обозначение обычной березы (v.p. - var. *pendula*) и балл узорчатости древесины (0, 1, 2, 3) у карельской березы. Представлены средние значения и их стандартные ошибки. Различия значимы при $p < 0.05$.

Фактор транскрипции *APL* участвует в развитии флоэмы (Bonke et al., 2003; Bonke, 2004; Truernit et al., 2008; Truernit, 2014; Neo et al., 2014; Villalon, 2015; Kondo et al., 2016). У обычной березы в ксилеме практически не обнаруживались транскрипты мРНК гена *APL*, в то время как у узорчатых растений уровень его экспрессии достигал 0.10-0.14 отн. ед., что в 1.7 раза выше, по сравнению с безузорчатыми растениями карельской березы (рис. 13). Между количеством транскриптов мРНК генов *VND7* и *APL* обнаружена отрицательная зависимость: возрастание в ксилеме экспрессии *APL* в ряду «обычная береза – безузорчатые растения карельской березы – узорчатые растения карельской березы»

сопровождалось снижением экспрессии *VND7*, уровень которой был самым высоким при формировании ксилемы у обычной березы (рис. 13). Известно, что *APL* требуется не только для дифференциации флоэмы, но также для ингибирования дифференциации ксилемы на месте флоэмы (Bonke et al., 2003; Bonke, 2004; Truernit et al., 2008; Truernit, 2014; Neo et al., 2014). Предполагается, что функция *APL* состоит в том, чтобы организовать правильную дифференциацию флоэмы, поддерживать это состояние дифференцировки клеток и способствовать пространственному ограничению области ксилемы (Bonke et al., 2003; Bonke, 2004; Truernit et al., 2008; Truernit, 2014; Villalon, 2015; Kondo et al., 2016).

Таким образом, у растений березы повислой при разных сценариях ксилогенеза изменяется распределение экспрессии генов, кодирующих *CLAVATA*-подобную систему *TDIF-TDR*, которая определяет дальнейшую судьбу ствольных клеток. При этом существенно меняется уровень экспрессии генов факторов транскрипции, регулирующих дифференцировку клеток камбиальной зоны. Безузорчатые растения карельской березы, несмотря на отсутствие визуальных признаков структурных аномалий, отличаются от обычной березы по характеру распределения экспрессии генов, контролирующей развитие камбиальных производных.

5.3. Изменение уровня экспрессии генов CLE41 и PXY у семян обычной березы повислой и карельской березы

Проведенное исследование выявило, что уже на начальных этапах онтогенеза, когда еще отсутствуют видимые различия между двумя формами березы, экспрессия генов, кодирующих систему *TDIF-TDR*, у них различается. Интересно отметить, что если у 2-недельных семян экспрессия генов *CLE41*, *PXY* была выше у растений обычной березы, то уже у 5-недельных растений картина кардинально меняется: количество транскриптов мРНК генов *CLE41*, *PXY* существенно выше у растений карельской березы, остается таким до 10-недельного возраста и сохраняется у взрослых растений.

5.4. Изменение уровня экспрессии генов CLE41, PXY, VND6, VND7 и APL в камбиальной зоне обычной березы при нарушении нисходящего транспорта сахарозы и создании зон ее избыточного содержания

Экспрессия генов, регулирующих развитие растения, контролируется рядом внутренних факторов, к которым наряду с гормонами относятся и сахароза (Медведев, Шарова, 2010). У растений обычной березы увеличение содержания сахарозы в апопласте, происходящее при нарушении кольцеванием транспорта фотоассимилятов, сопровождается возрастанием уровня экспрессии генов *CLE41* во флоэме в 2 раза и *PXY* в камбиальной зоне в 1.3 раза (рис. 14). При этом возрастает эктопическая экспрессия *CLE41* в ксилеме (рис. 14), значение ее соизмеримо с таковым для растений карельской березы с 1-2 баллами узорчатости древесины. Экспрессия генов факторов транскрипции, контролирующей дифференцировку флоэмы (*APL*) и ксилемы (*VND6*), также увеличивается (рис. 14). Следует отметить, что у безузорчатых растений карельской березы, формирование ксилемы у которой идет на фоне повышенного содержания сахаров, тоже был выше уровень экспрессии гена *VND6*, по сравнению с обычной березой (рис. 13).

Механизмы, объясняющие нарушение работы *CLAVATA*-подобной системы *TDIF-TDR*, остаются до сих пор неизученными. Эксперименты по кольцеванию ствола обычной березы позволяют предположить, что эндогенное повышение

содержания сахаров не только приводит к увеличению уровня экспрессии генов, кодирующих пептид CLE-41 и его рецептор PXY, способствуя возрастанию числа делений в камбиальной зоне, но также изменяет локализацию экспрессии гена *CLE41*. Последнее, в свою очередь, может быть причиной нарушения плоскости деления камбиальных производных. Полученные данные согласуются с предположением, что наличие избытка сахаров в камбиальной зоне изменяет пути развития производных камбия.

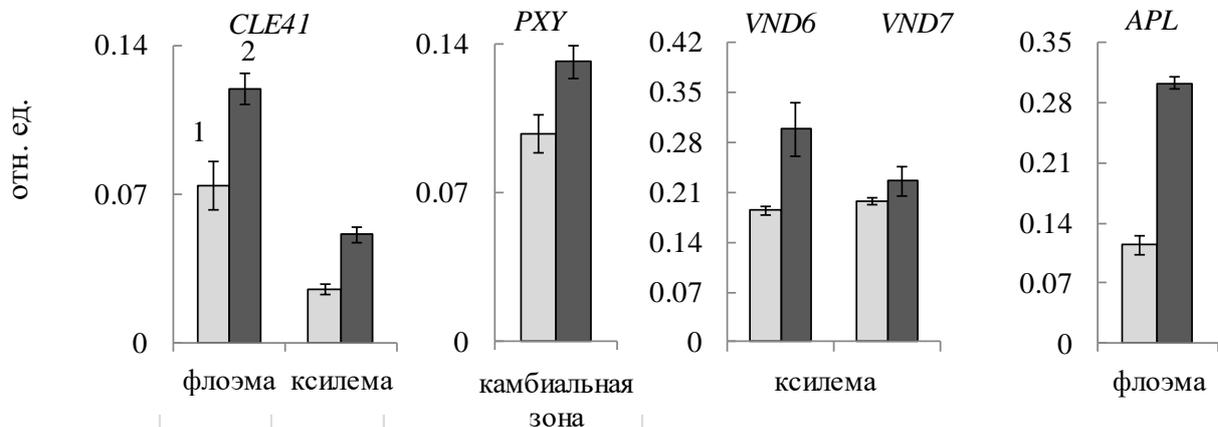


Рисунок 14. Относительный уровень экспрессии (отн. ед.) генов *CLE41*, *PXY*, *VND6*, *VND7* и *APL* в тканях ствола у контрольных (1) и опытных (после кольцевания) (2) растений обычной березы. Дата отбора – 29.06.2017. Представлены средние значения и их стандартные ошибки. Различия значимы при $p < 0.05$.

Вопрос о связи CLAVATA-системы TDIF–TDR и транскрипционных факторов (*VND6*, *VND7*, *APL*), регулирующих дифференцировку производных камбия и пути метаболизма сахарозы в камбиальной зоне у карельской березы, остается пока открытым. С одной стороны, возрастание апопластной утилизации сахарозы через гексозный сигналинг может влиять на пути дифференцировки клеток, с другой стороны, данные, полученные на сеянцах, свидетельствуют о том, что отклонения в работе CLE-пептидов предшествуют метаболическим отличиям. Дальнейшее исследование функционального состояния камбиальной зоны и обеспеченности ее субстратами в период деятельности камбия вместе с изучением уровня экспрессии генов, контролирующих этот процесс, позволит получить дополнительную информацию о механизмах аномального ксилогенеза у древесных растений.

ГЛАВА 6. Влияние уровня плодородия почвы на реализацию генетической программы у карельской березы

Большое влияние на ксилогенез оказывают факторы внешней среды, среди которых почвенные условия занимают важное место. Лимитирующим фактором для роста и развития древесных растений является доступность азота. В почвах доступный растениям азот представлен, главным образом, в форме катиона аммония (NH_4^+) и нитрат аниона (NO_3^-). В почвах бореальных лесов их концентрация, как правило, низкая. Содержание NH_4^+ в почве зависит от ее обогащенности гумусом, аммонификация (перевод органического азота гумуса в аммонийную форму) которого происходит за счет деятельности почвенных гетеротрофных микроорганизмов. Повышение ассимиляции азота древесными растениями достигается за счет образования микоризы (Suarez et al., 2002; Castro-Rodriguez et al., 2017). Почвы

березняков богаты бактериями и актиномицетами (Германова, Медведева, 2006), в них обнаружена высокая нитрогеназная активность (Мамай, 2014), что может свидетельствовать об интенсивных микоризных процессах. Нитрат-ионы образуются в почве в процессе нитрификации. Поглощенные нитраты могут включаться в метаболизм растения только после восстановления их до аммония. Первым ферментом цепи восстановления нитратов является нитратредуктаза (НР, ЕС 1.7.1.2). НР катализирует перенос двух электронов от восстановленного НАД(Ф)Н к нитрату с образованием нитрита, который в свою очередь восстанавливается нитритредуктазой (ЕС 1.7.1.4) до аммония.

6.1. Избыток экзогенных нитратов подавляет формирование аномальной древесины у карельской березы

В отличие от катиона аммония нитрат-анион выполняет в растении еще и сигнальную роль (Forde, 2002). Индуцирующее действие нитратного аниона на экспрессию ряда генов азотного и углеродного обменов неоднократно описывалось в литературе (Crawford, 1995; Lam et al., 1996; Campbell, 1999; Stitt, 1999). Для исследования влияния NO_3^- на метаболизацию сахарозы в стволе обычной и карельской березы в период камбиального роста был поставлен эксперимент с внесением в почву экзогенного нитрата (Галибина и др., 2016).

У обычной березы внесение нитратов привело к увеличению в 1.5 раза активности СС в ксилеме (рис. 15А). Полученные нами данные подтверждают известное стимулирующее действие нитратов на активность СС (Люленова, 2007; Брускова и др., 2009; Никитин и др., 2010; Gordon et al., 1999, 2002 и др.).

У карельской березы внесение в почву нитратного азота не привело к возрастанию СС в ксилеме, более того, активность фермента снизилась, по сравнению с контролем, в 2.2 раза. При этом произошло снижение в 1.7 раза активности АпИInv (рис. 15Б). Низкий уровень использования сахарозы в ксилеме наблюдался на фоне увеличения ее расщепления во флоэме с помощью АпИInv, активность которой достигала 73 мкмоль/г сырой ткани, что свидетельствует об интенсивном выходе сахарозы в апопласт флоэмы. У обычной березы активность АпИInv во флоэме составила 24 мкмоль/г сырой ткани и не изменялась.

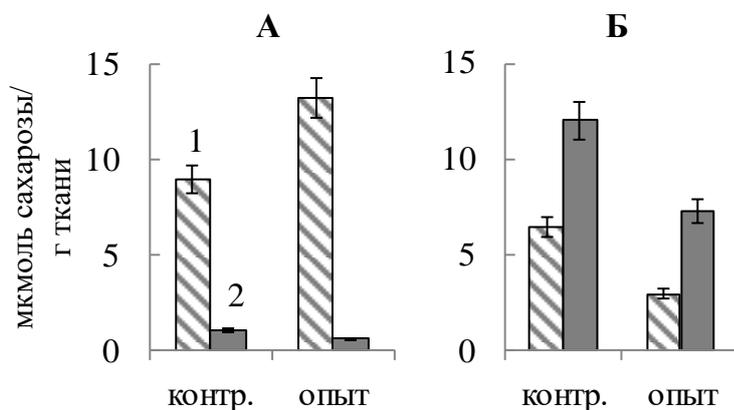


Рисунок 15. Активность сахарозосинтазы (СС) и апопластной инвертазы (АпИInv) в ксилеме контрольных (контр.) и опытных (опыт) растений обычной (А) и карельской (Б) березы. Представлены средние значения и их стандартные ошибки.

Анализ характеристики почв в пределах ареала карельской березы показал, что она не распространяется как в области очень бедных (примитивных и горно-тундровых), так и относительно богатых (буроземов темноцветных) почв (Новицкая, 2008). Л.Л. Новицкой было выдвинуто предположение, что формирование узорчатой древесины карельской березы происходит при поддержании в камбиальной зоне

определенного C/N отношения, а именно, избытка сахаров на фоне некоторого дефицита азотного питания (Новицкая, 2008).

Результаты нашего исследования могут быть использованы для объяснения, почему ареал карельской березы не включает плодородные почвы. Под воздействием высокого уровня азотного питания (нитратов) в ксилеме карельской березы снижается метаболизация сахарозы по сахарозосинтазному и инвертазному пути. Первое ведет к уменьшению приростов ксилемы, второе – к снижению в ней содержания паренхимы, т.е. подавлению формирования узорчатой текстуры древесины. В данном случае сахароза, поступающая из листьев, расходуется во флоэме. Здесь с участием апопластной инвертазы она интенсивно используется в реакциях запасного метаболизма, что поддерживает жизнедеятельность существующих и образование новых клеток запасающей паренхимы. Поэтому отличительной особенностью берез, произрастающих на плодородных почвах, становится толстая кора, а максимальным выражением этих тенденций – появление грубокорых форм березы (Новицкая, 2008).

6.2. Доступность подвижного азота в почве оказывает влияние на проявление признака узорчатости древесины у карельской березы

В естественных условиях произрастания карельской березы изучение влияния почвенного плодородия на ферменты метаболизации сахарозы ранее не проводилось. Одной из задач исследования было выявить почвенные условия, в которых нарушение обмена веществ, проявляющееся в изменении соотношения активности СС и АПИ_{нв}, а, следовательно, и развитие «узорчатости» будет выражено в большей степени. Считается, что нитратредуктазная реакция является лимитирующим шагом в цепи ассимиляции азота в растении (Campbell, 1999), поэтому НР рассматривают как ключевой фермент в азотном метаболизме (Huber et al., 1996; Kaiser et al., 1999; Stitt, 1999). По активности НР можно судить, какая форма подвижного азота используется растением в тех или иных условиях. В связи с этим, наряду с ферментами метаболизации сахарозы, у растений карельской березы, произрастающих на разных по плодородию участках, была изучена активность НР – ключевого фермента ассимиляции нитратов.

Исследование проводили на 25-летних растениях карельской березы, произрастающих в лесных культурах на территории Карелии. Было подобрано четыре участка, различающихся по уровню естественного плодородия. Запасы доступных растениям основных элементов питания в 25-сантиметровом слое почв для N, P, K составили: 104, 65, 146 кг/га для 1 участка; 67, 34, 67 кг/га – для второго участка; 44, 80, 108 кг/га – для третьего участка и 43, 124, 61 кг/га – для четвертого участка. Согласно литературным данным, характеризующим потребность березы в элементах минерального питания (Базилевич, Титлянова, 2008), участок 1 (почва дерново-средне-подзолистая, песчаная, каменистая) по запасам подвижных форм основных элементов питания относился к норме. На участке 2 (почва торфянисто-подзолисто-глебоватая супесчаная) наблюдалось снижение доступного азота и снижение минерализации в условиях высокого увлажнения. На участках 3 и 4 (почва поверхностно-подзолистая песчаная) растения испытывали дефицит азота на фоне повышенного содержания фосфора, особенно это было выражено на 4-ом участке.

Самый насыщенный узор на фоне активного роста ксилемы формировался у растений участка 2. У них в структуре древесины было больше темноокрашенных включений, образующихся в результате паренхиматизации тканей ствола.

Формирование узорчатой древесины протекает на фоне повышенной активности АпИInv во флоэме, значение ее достигало 57 мкмоль/г сырой ткани (рис. 16). У узорчатых растений участка 2 наблюдалось снижение активности СС (рис. 16) на фоне снижения подвижного азота в почве (67 кг/га) и снижение активности НР в тканях ствола (9 нмоль/мг белка). В период камбиального роста меньшая метаболизация сахарозы по сахарозосинтазному пути сопровождается увеличением ее метаболизации по инвертазному пути в ксилеме и, особенно, во флоэме, что ведет к усиленной генерации в них гексоз. Гексозы индуцируют реакции запасного метаболизма (Smeeckens, 2000; Koch, 2004; Rolland et al., 2006), что ведет к увеличению количества запасных веществ и сопровождается усилением паренхиматизации ксилемы у растений участка 2, по сравнению с растениями участка 1 (рис. 16). Исходя из сказанного, можно предположить, что некоторое снижение плодородия почвы и ассимиляции нитратов в тканях ствола благоприятны для получения растений карельской березы с высокой степенью узорчатости древесины и высокими таксационными характеристиками.

Узорчатые растения участка 1 не испытывают недостатка в основных минеральных элементах. Активность НР в ксилеме у растений участка 1 (81 нмоль/мг белка) в 9 раз выше, по сравнению с растениями участка 2 (9 нмоль/мг белка). Формирование ксилемы у них идет на фоне высокой активности СС (70 мкмоль/мг белка), в результате растения имеют высокие таксационные параметры (рис. 16). Повышение метаболизации сахарозы по СС-пути снижает компенсаторный путь метаболизации сахарозы по инвертазному пути. Активность АпИInv во флоэме у узорчатых растений участка 1 (17 мкмоль/г ткани) в 3.4 раза меньше, чем у растений участка 2 (57 мкмоль/г ткани). В итоге у растений участка 1, по сравнению с растениями участка 2, меньше паренхиматизация тканей ствола (рис. 16), и, следовательно, более низкая насыщенность узора в древесине.

При дефиците доступного азота в почве (43-44 кг/га) на фоне увеличения содержания фосфора у узорчатых растений карельской березы в тканях ствола возрастает ассимиляция нитратов с участием НР (до 55 и 60 нмоль/мг белка в ксилеме и до 93 и 47 нмоль/мг белка во флоэме у растений 3 и 4 участков соответственно). Нитрат является одним из ключевых метаболических факторов, которые модулируя активность протеинкиназы и белковой фосфатазы, могут влиять на распределение углерода между сахарозой и аминокислотами (Huber, Huber, 1992). Возрастание активности НР у узорчатых растений приводит к усугублению конкуренции двух процессов, для которых необходимо большое количество фотоассимилятов, а именно, роста дерева и формирования узорчатой структуры древесины за счет возрастания ее паренхиматизации.

В первом случае (участок 3) узорчатые растения формируются на фоне высокой активности СС в ксилеме (как у растений участка 2) и во флоэме (в 2 раза выше, чем у растений участка 2). При этом метаболизация сахарозы по инвертазному пути у них понижена до 22 мкмоль/г ткани. Это приводит к тому, что растения участка 3 не отличаются по высоте и диаметру от растений участка 2, но их древесина имеет слабый узор (рис. 16).

Во втором случае (участок 4) узорчатые растения формируются на фоне высокой активности АпИInv во флоэме (65 мкмоль/г ткани). В итоге у них снижаются морфологические параметры и возрастает степень узорчатости древесины (рис. 16).

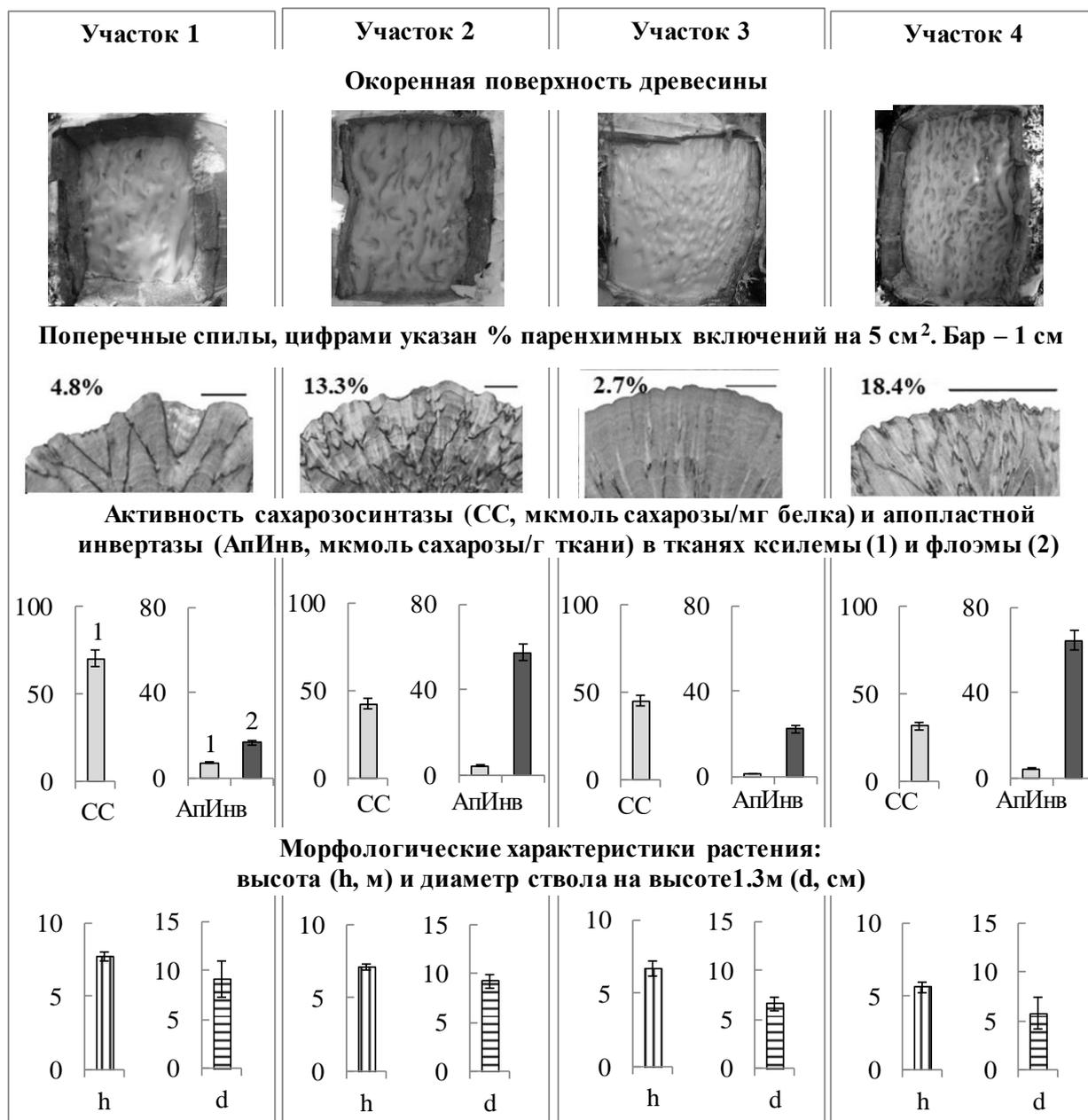


Рисунок 16. Окоренная поверхность ствола, поперечные спилы ствола, активность сахарозсинтазы (СС) и апопластной инвертазы (АпИInv) в ксилеме (1) и флоэме (2), диаметр (d) ствола на высоте 1.3 м от земли и высота (h) деревьев карельской березы, произрастающих на разных по уровню плодородия участках (1-4). Над спилами цифрами указана площадь паренхимных включений (%) в прямоугольнике 5 см² в периферической зоне поперечного спила. Бар – 1 см.

Результаты свидетельствуют, что доступность подвижного азота в почве оказывает большое влияние на проявление признака узорчатости древесины у карельской березы. Высказано предположение, что увеличение поступления нитратного азота в растение, следствием чего становится возрастание активности НР, оказывает отрицательное влияние на формирование узора.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное исследование позволило выявить молекулярно-генетические закономерности разных сценариев ксилогенеза древесных растений. Изучение механизмов ксилогенеза проведено на двух формах 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 происходит образование аномальной (узорчатой) древесины.

У карельской березы нарушение ксилогенеза происходит уже на стадии деления инициалей камбия: изменяется направление деления лучевых инициалей – вместо упорядоченных периклиналильных делений, имеющих место в камбии обычной березы повислой, они претерпевают антиклиналильные и поперечные деления, что приводит к увеличению в камбиальном слое числа лучевых инициалей и изменению соотношения веретеновидные/лучевые инициали. Показано, что разные сценарии ксилогенеза у карельской и обычной березы отличаются по распределению уровня экспрессии генов, кодирующих TDIF-пептид CLE-41 и его рецептор TDR, играющих центральную роль в судьбе ствольных клеток латеральной меристемы. Формирование нормальной по строению древесины обычной березы, в составе которой преобладают сосуды и волокна, происходит на фоне экспрессии во флоэме гена *CLE41* и в камбиальной зоне гена *PXY*. Формирование аномальной узорчатой древесины карельской березы, для которой характерны крупные включения клеток паренхимы и нарушение ориентации проводящих элементов, происходит на фоне (1) существенного увеличения уровня экспрессии гена *CLE41* во флоэме и гена *PXY* в камбиальной зоне и (2) эктопической экспрессии *CLE41* в ксилеме.

Основываясь на полученных данных можно предположить, что (1) большая экспрессия генов *CLE41* и *PXY*, подавляющих развитие ксилемы и регулирующих число делений клеток в сосудистых меристемах, может быть причиной увеличения прироста проводящей флоэмы и ширины камбиальной зоны и меньшего размера зоны формирования ксилемы у карельской березы, по сравнению с обычной березой; (2) эктопическая экспрессия гена *CLE41* в ксилеме узорчатых растений карельской березы может быть причиной нарушения ориентации деления ксилемных производных камбия.

Развитие нормальных по строению тканей ствола происходит на фоне высокого уровня экспрессии генов, кодирующих транскрипционные факторы VND6, VND7 с NAC-доменом (VASCULAR-RELATED NAC-DOMAIN), которые контролируют синтез вторичной клеточной стенки, развитие и дифференцировку клеток ксилемы. Формирование аномальной древесины сопровождается снижением в камбиальной зоне транскриптов мРНК генов *VND6*, *VND7* и увеличением транскриптов мРНК гена *APL*, кодирующего фактор транскрипции (*APL*, ALTERED PHLOEM DEVELOPMENT), который требуется не только для дифференциации флоэмы, но также для ингибирования дифференциации ксилемы на месте флоэмы.

Исследование функционирования камбия на примере двух форм березы повислой позволило выявить физиолого-биохимические и молекулярно-генетические маркеры разных сценариев ксилогенеза. Формирование нормальной по строению древесины обычной березы, в составе которой преобладают сосуды и волокна, происходит на фоне высокой активности СС под контролем генов *Sus1* и *Sus2* и сопровождается активным синтезом структурных компонентов клеточных стенок. В нормальных по строению тканях наблюдали высокий уровень экспрессии генов,

кодирующих целлюлозосинтазу (*Ces8*, *Ces3*, *Ces7*). Включение сахарозы через СС-путь в синтез целлюлозы приводит к необратимому выводу ее из обмена веществ. Во флоэме обычной березы в этот период на фоне высокого содержания сахарозы активность ферментов ее метаболизации ниже, по сравнению с ксилемой.

Дифференциация производных камбия в паренхимные клетки, являющиеся основными анатомическими элементами в зонах структурных аномалий узорчатой древесины карельской березы, происходит на фоне низкой активности СС в связи со снижением экспрессии генов *Sus1* и *Sus2* и сопровождается уменьшением содержания целлюлозы в ксилеме. Уровень экспрессии генов, кодирующих целлюлозосинтазу (*Ces8*, *Ces3*, *Ces7*), в аномальных участках снижен. В этом случае высокая акцепторная сила тканей ствола поддерживается за счет метаболизации притекающей сахарозы с участием АпИнв. Интенсивный гидролиз сахарозы в апопласте происходит как в ксилеме, так и во флоэме. С увеличением узорчатости древесины на фоне снижения содержания целлюлозы (необратимое выведение большого количества сахаров из обмена веществ) возрастает количество крахмала (временное выведение избытка сахаров). Через биосинтез/деградацию крахмала регулируется сахарозный статус клетки. Полученные результаты свидетельствуют, что уменьшение отношения активности СС/АпИнв коррелирует со степенью развития структурных аномалий в камбиальной зоне березы повислой.

Установлено, что в период камбиального роста регуляция активности АпИнв происходит на посттрансляционном уровне через белковые ингибиторы АпИнв (СIF). У карельской березы уровень экспрессии генов, кодирующих АпИнв (*CWIN1*, *CWIN1.1*, *CWIN4*), примерно такой же как у обычной березы, но снижено количество транскриптов мРНК гена *Cif*, экспрессия которого уменьшается при возрастании концентрации сахарозы в апопласте. Высказано предположение, что возрастание активности АпИнв в аномальных по строению тканях ствола карельской березы и в нормальных тканях обычной березы при (1) введении экзогенной сахарозы и (2) снижении активности СС в ксилеме можно рассматривать, как компенсаторный механизм для поддержания донорно-акцепторных отношений, направленный на устранение избыточного содержания дисахарида во флоэме.

Показано, что при разных сценариях ксилогенеза прозенхимные ксилемные производные камбия получают ассимиляты в разной форме. При формировании нормальной по строению ксилемы, в которой преобладают сосуды и волокна, сахара поступают в клетки в основном в виде сахарозы. При формировании аномальных тканей, в которых преобладают паренхимные клетки, сахароза в апопласте активно метаболизируется АпИнв, и в клетку в основном поступают образующиеся гексозы, которые в свою очередь запасаются в виде крахмала. В связи с этим, связь повышенной активности АпИнв с транспортерами гексоз и гексокиназами, как ключевыми компонентами углеводного сигналинга, особенно привлекает внимание и требует дополнительного изучения.

Безузорчатые растения карельской березы, несмотря на отсутствие визуальных признаков, отличаются от обычной березы по характеру распределения экспрессии генов, контролирующей развитие камбиальных производных. Картина распределения экспрессии генов, кодирующих систему TDIF-TDR, у безузорчатых растений, а именно – высокий уровень эктопической экспрессии *CLE-41/44* в ксилеме при пониженной экспрессии *PXY*, схожа с таковой в безузорчатых участках ствола узорчатых растений карельской березы. Из этого можно предположить наличие общего механизма регуляции развития ствольных клеток у узорчатых и безузорчатых

растений карельской березы. Несомненно, безузорчатые растения карельской березы представляют собой уникальный объект для изучения переходного состояния между нормальным процессом ксилогенеза у растений *B. pendula* var. *pendula* и его аномальным вариантом у узорчатых растений *B. pendula* var. *carelica*.

Механизмы, объясняющие нарушение работы CLAVATA-подобной системы TDIF–TDR остаются до сих пор неизученными. Результаты эксперимента по кольцеванию ствола обычной березы позволяют предположить, что эндогенное повышение содержания сахаров не только приводит к увеличению уровня экспрессии генов, кодирующих пептид CLE-41 и его рецептор PXY, способствуя возрастанию числа делений в камбиальной зоне, но также изменяет локализацию экспрессии *CLE41*, что в свою очередь может быть причиной нарушения плоскости деления производных камбия. Это согласуется с мнением, что наличие избытка сахаров в камбиальной зоне изменяет пути развития производных камбия.

Исследование семян двух форм березы повислой показало, что между обычной и карельской березой наблюдаются отличия в уровне экспрессии генов, кодирующих систему TDIF-TDR и ферменты метаболизма сахарозы (СС и АпИInv), подобные тем, которые характерны для взрослых растений. Таким образом, уже на ранних этапах развития (до появления видимых отличий) у карельской березы имеют место изменения путей утилизации сахарозы, которые во взрослом состоянии являются индикаторами нарушений в камбиальной деятельности.

Вопрос о связи CLAVATA-системы TDIF–TDR, транскрипционных факторов, регулирующих дифференцировку камбиальных производных (VND6, VND7, APL), и путей метаболизма сахарозы в камбиальной зоне у карельской березы остается пока открытым. Дальнейшее исследование функционального состояния камбиальной зоны, ее субстратной обеспеченности в период камбиального роста и уровня экспрессии генов, контролирующих этот процесс, возможно, позволит получить дополнительную информацию о механизмах аномального ксилогенеза у древесных растений.

Большое влияние на проявление признака узорчатости древесины у карельской березы оказывает доступность подвижного азота в почве. В условиях нормального обеспечения азотом формирование узора идет на фоне интенсивного роста (высокие активности СС и АпИInv в ксилеме и активность АпИInv во флоэме). Некоторое снижение плодородия почвы приводит к снижению активности СС на фоне возрастания активности АпИInv и сопровождается увеличением количества темноокрашенных включений паренхимы в древесине. При этом морфологические показатели растений не изменяются. При сильном дефиците подвижного азота в почве на фоне увеличения содержания фосфора возрастает ассимиляция нитратов в тканях ствола. В этих условиях усиливается конкуренция за фотоассимиляты между формированием узорчатой древесины (процесс связан с усиленной метаболизацией сахарозы по апопластному пути во флоэме) и радиальным ростом ствола (использование сахарозы в ксилеме на формирование клеточных стенок). Полученные данные свидетельствуют о том, что увеличение поступления нитратного азота в растение, следствием чего становится возрастание активности НР, оказывает отрицательное влияние на формирование узора. Результаты исследования могут быть использованы для объяснения, почему ареал карельской березы не включает плодородные почвы. Под воздействием высокого уровня азотного питания (нитратов) в ксилеме карельской березы снижается метаболизация сахарозы по сахарозосинтазному и инвертазному пути. Первое ведет к уменьшению приростов ксилемы, второе – к снижению в ней содержания паренхимы, т.е. подавлению

формирования узорчатой текстуры древесины. В этих условиях сахара, поступающая из листьев, расходуется во флоэме. Здесь с участием апопластной инвертазы она интенсивно используется в реакциях запасного метаболизма, что поддерживает жизнедеятельность существующих и образование новых клеток запасующей паренхимы. Поэтому отличительной особенностью берез, произрастающих на плодородных почвах, становится толстая кора, а максимальным выражением этих тенденций – появление грубокорых форм березы.

ВЫВОДЫ

1. Дифференциация сосудов и волокон, составляющих структурную основу нормальной по строению древесины березы повислой, происходит на фоне высокой активности цитоплазматической инвертазы и сахарозосинтазы и коррелирует с высоким уровнем экспрессии генов, кодирующих целлюлозосинтазу (*Ces8*, *Ces3*, *Ces7*).
2. Дифференциация производных камбия в паренхимные клетки при формировании структурных аномалий узорчатой древесины карельской березы происходит на фоне низкой активности сахарозосинтазы и сопровождается уменьшением содержания целлюлозы на единицу массы ксилемы. Уровень экспрессии генов *Ces8*, *Ces3*, *Ces7* в аномальных участках снижен.
3. Высокая акцепторная сила тканей ствола в местах формирования узорчатой древесины карельской березы поддерживается за счет метаболизации притекающей сахарозы с участием апопластной инвертазы. Степень насыщенности узора коррелирует с увеличением активности апопластной инвертазы в ксилеме и во флоэме. В основе разнообразия текстуры древесины карельской березы лежит изменение соотношения активности сахарозосинтазы и апопластной инвертазы в камбиальной зоне.
4. Регуляция активности апопластной инвертазы у карельской березы осуществляется на уровне экспрессии кодирующих ее генов. У безузорчатых растений карельской березы содержание транскриптов мРНК генов *CWIN1*, *CWIN1.1*, *CWIN4* в ксилеме меньше, по сравнению с узорчатыми растениями. Регуляция активности апопластной инвертазы у обычной березы происходит в основном на посттрансляционном уровне через белковые ингибиторы апопластной инвертазы (CIF).
5. При формировании структурных аномалий древесины карельской березы в клетки камбиальной зоны из апопласта поступает большое количество гексоз, которые индуцируют в них запасный метаболизм. Вместо гидролиза содержимого протопласта, что имеет место при образовании сосудов и волокон, в клетках идет синтез высокополимерных запасных соединений, в первую очередь крахмала. Результатом изменения направленности метаболизма становится массовая дифференцировка клеток запасующей паренхимы, скопления которых образуют в древесине характерный узор.
6. Сценарии ксилогенеза, связанные с преимущественным формированием сосудов и волокон или клеток паренхимы, отличаются между собой по уровню экспрессии генов, кодирующих основные регуляторы камбия (пептид CLE41 и его рецептор TDR-PXY). Формирование узорчатой древесины карельской березы, для которой характерны крупные включения клеток паренхимы и нарушение ориентации проводящих элементов, происходит на фоне существенного увеличения уровня

экспрессии гена *CLE41* во флоэме и гена *PXY* в камбиальной зоне, и эктопической экспрессии *CLE41* в ксилеме.

7. Дифференциация ксилемных производных камбия в зонах структурных аномалий ствола карельской березы сопровождается снижением уровня экспрессии генов *VND6*, *VND7* (кодируют транскрипционные факторы, регулирующие синтез вторичной клеточной стенки, развитие и дифференцировку клеток ксилемы) и увеличением уровня экспрессии гена *APL* (кодирует фактор транскрипции, играющий роль в развитии флоэмы).

8. Метаболические особенности путей утилизации сахарозы у карельской березы проявляются уже на начальных этапах онтогенеза. В стебле сеянцев карельской березы ниже активность сахарозосинтазы и уровень экспрессии кодирующих ее генов (*Sus1*, *Sus2*), выше количество транскриптов мРНК генов *CLE41*, *PXY*, по сравнению с сеянцами обычной березы.

9. Увеличение поступления нитратного азота в растение оказывает отрицательное влияние на формирование узора древесины карельской березы. В данном случае в ксилеме карельской березы снижается метаболизация сахарозы по сахарозосинтазному и инвертазному пути. Первое ведет к уменьшению приростов ксилемы, второе – к снижению в ней содержания паренхимы, т.е. подавлению формирования узорчатой текстуры древесины.

СПИСОК ОСНОВНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК РФ для докторских диссертаций

1. **Галибина Н.А.**, Терехова Е.Н. Особенности свойств клеточных стенок хвои сосны обыкновенной разного жизненного состояния // Физиология растений. 2008. Т. 55. № 3. С. 419-425.
2. Марковская Е.Ф., Шерудило Е.Г., **Галибина Н.А.**, Сыроева М.И. Роль углеводов в реакции теплолюбивых растений на кратковременные и длительные низкотемпературные воздействия // Физиология растений. 2010. Т. 57. № 5. с. 687-694.
3. Терехова Е.Н., **Галибина Н.А.** Структурно-функциональное состояние хвои *Pinus sylvestris* L. в условиях загрязнения серой и тяжелыми металлами // Растительные ресурсы. 2010. №. 2. С. 61 – 73.
4. **Галибина Н.А.**, Новицкая Л.Л., Софронова И.Н. Динамика сахаров в тканях ствола *Betula pendula* (*Betulaceae*) при выходе из зимнего покоя // Растительные ресурсы. 2012. Т. 48. №4. С. 554 – 564.
5. **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.
6. **Галибина Н.А.**, Терехова Е.Н. Физико-химические свойства клеточных стенок тканей ствола деревьев *Betula pendula* Roth // Ученые записки ПетрГУ. Серия: Естественные и технические науки. 2014. № 4 (141). С. 19-25.
7. **Галибина Н.А.**, Терехова Е.Н., Новицкая Л.Л., Софронова И.Н. Динамика неструктурных углеводов в органах и тканях двухлетних сеянцев *Betula pendula* и *Betula pubescence* в период вегетации // Труды КарНЦ РАН. Сер. Экспериментальная биология. 2014. № 5. С. 108-116.

8. **Галибина Н. А.**, Новицкая Л. Л., Красавина М. С., Мощенская Ю. Л. Активность сахарозосинтазы в тканях ствола карельской березы в период камбиального роста // Физиология растений. 2015. Т. 62. № 3. С. 410-419.
 9. **Галибина Н. А.**, Новицкая Л. Л., Красавина М. С., Мощенская Ю. Л. Активность инвертазы в тканях ствола карельской березы // Физиология растений. 2015. Т. 62. № 6. С. 804-813.
 10. Новицкая Л.Л., **Галибина Н.А.**, Никерова К.М. Транспорт и запасание сахаров во флоэме двух форм березы повислой, различающихся по структуре древесины (*Betula pendula* Roth var. *pendula* и var. *carelica*) // Труды КарНЦ РАН. Сер. Экспериментальная биология. 2015. № 11. С. 35-47.
 11. Тарелкина Т. В., Новицкая Л. Л., **Галибина Н. А.** Содержание растворимых сахаров в тканях ствола березы, ольхи и осины в эксперименте с введением экзогенной сахарозы // Труды КарНЦ РАН. Сер. Экспериментальная биология. 2015. № 12. С. 135-141.
 12. **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.
 13. **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.
 14. Novitskaya L., Nikolaeva N., **Galibina N.**, Tarelkina T., Semenova L. The greatest density of parenchyma inclusions in Karelian birch wood occurs at confluences of phloem flows // Silva Fennica. 2016. V. 50. N 3. P. 1461-1478. <http://dx.doi.org/10.14214/sf.1461>.
 15. Мощенская Ю.Л., **Галибина Н.А.**, Новицкая Л.Л., Никерова К.М., Подгорная, И. Н. Софронова. Активность ферментов диссимиляции сахарозы в раннем онтогенезе разных форм березы повислой // Труды КарНЦ РАН. Сер. Экспериментальная биология. 2016. № 11. С. 78-87.
 16. Никерова К.М., **Галибина Н.А.**, Новицкая Л.Л., Мощенская Ю.Л., Новицкая, М. Н. Подгорная, И. Н. Софронова. Каталазная активность в листовом аппарате у сеянцев березы повислой разных форм (*Betula pendula* Roth): var. *pendula* и var. *carelica* (Mercklin) // Труды КарНЦ РАН. Сер. Экспериментальная биология. 2016. № 11. С. 68-77.
 17. Никерова К.М., **Галибина Н. А.** Изменение активности пероксидазы у карельской березы при внесении экзогенного нитрата // Сибирский лесной журнал. 2017. № 1. С. 15-24.
 18. Мощенская Ю.Л., **Галибина Н.А.**, Топчиева Л.В., Новицкая Л.Л. Экспрессия генов, кодирующих изоформы сахарозосинтазы, в ходе аномального ксилогенеза карельской березы // Физиология растений. 2017. Т 64. №4. С. 301-310.
 19. Novitskaya L.L., Shulyakovskaya T.A., **Galibina N.A.**, Pyinova M.K. Membrane Lipid Composition upon Normal and Patterned Wood Formation in *Betula Pendula* Roth // Journal of Plant Growth Regulation. 2018. P. 1–13.
- Другие публикации*
20. **Галибина Н.А.**, Новицкая Л.Л., Софронова И.Н. Внесение нитратного азота увеличивает донорную функцию листьев карельской березы // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. 2016. № .10. С. 582-586.
 21. **Галибина Н.А.**, Красавина М.С., Новицкая Л.Л., Софронова И.Н. Ферменты метаболизации сахарозы при формировании аномалий карельской березы //

- Структурные и функциональные отклонения от нормального роста и развития растений под воздействием факторов среды. Международная конференция. Петрозаводск: Карельский научный центр РАН. 2011.
22. Карелина Т.В., Новицкая Л.Л., **Галибина Н.А.** Влияние экзогенной сахарозы на содержание моно- и дисахаров в тканях ствола березы, ольхи и осины в период подготовки к состоянию покоя // Структурные и функциональные отклонения от нормального роста и развития растений под воздействием факторов среды. Международная конференция. Петрозаводск: Карельский научный центр РАН. 2011.
 23. **Галибина Н.А.**, Софронова И.Н. Биохимические и структурные особенности растений рода *Betula* L. на начальных этапах онтогенеза // Структурные и функциональные отклонения от нормального роста и развития растений под воздействием факторов среды. Международная конференция. Петрозаводск: Карельский научный центр РАН. 2011.
 24. Целищева Ю.Л., **Галибина Н.А.** Динамика активности пероксидазы в органах и тканях деревьев березы повислой // П(Х) Международная ботаническая конференции молодых ученых. Санкт-Петербург: ФГБУН Ботанический институт им. В.Л. Комарова. 11 – 16 ноября 2012.
 25. Мощенская Ю.Л., **Галибина Н.А.**, Подгорная М.Н. Активность сахарозосинтазы в тканях ствола деревьев карельской березы, произрастающих на разных по плодородию почвах // Физиология растений - теоретическая основа инновационных агро- и фитобиотехнологий. Годичное собрание общества физиологов России. 19-25 мая 2014. Стр. 318-320.
 26. **Галибина Н.А.**, Новицкая Л.Л., Софронова И.Н. Действие нитратов на углеводный обмен растений *Betula pendula* Roth // Физиология растений - теоретическая основа инновационных агро- и фитобиотехнологий. Годичное собрание общества физиологов России. 19-25 мая 2014. Стр. 119-121.
 27. Никерова К.М., **Галибина Н.А.** Окисление кверцетина пероксидазой карельской березы // Материалы докладов 9-го международного симпозиума. Фенольные соединения: фундаментальные и прикладные аспекты. Москва, 2015. С. 386 – 390.
 28. Мощенская Ю.Л., **Галибина Н.А.**, Топчиева Л.В. Активности сахаросинтазы карельской березы на разных этапах онтогенеза // 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. 365.
 29. **Галибина Н.А.**, Новицкая Л.Л. Роль ферментов углеводного и азотного обменов в интродукции аномального морфогенеза древесных растений на примере карельской березы // 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. 122.
 30. **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. 2016, С.-Петербург. С. 37-38.

31. Мощенская Ю.Л., **Галибина Н.А.** Активность ферментов диссимиляции сахарозы в раннем онтогенезе разных форм Березы повислой // Годичное собрание общества физиологов растений России. Сигнальные системы растений: от рецептора до ответной реакции организма. 2016, С.-Петербург. С. 64-65.
32. 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. 2016, Saint Petersburg. P. 147.
33. **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.
34. Мощенская Ю.Л., **Галибина Н.А.**, Новицкая Л.Л., Никерова К. М. Дифференциальная экспрессия генов сахарозосинтазного и инвертазного семейства у семян *Betula pendula* Roth. // IV Российский симпозиум с международным участием «Фитоиммунитет и клеточная сигнализация у растений». Казань, 2016. С. 101-102.
35. **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.
36. 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.
37. **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 // Бореальные леса: состояние, динамика, экосистемные услуги: 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.
38. Мощенская Ю. Л., **Галибина Н. А.**, Новицкая Л. Л., , Никерова К. М. Распределение углерода в акцепторных органах семян березы повислой // Бореальные леса: состояние, динамика, экосистемные услуги: 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.
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 // Экспериментальная биология растений: фундаментальные и прикладные аспекты. Тезисы докладов Годичного собрания Общества физиологов растений России. Научная конференция и школа для молодых ученых (Крым, Судак, 18-24 сентября 2017 года). Москва. 2017. С. 31.

40. 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 // Экспериментальная биология растений: фундаментальные и прикладные аспекты. Тезисы докладов Годичного собрания Общества физиологов растений России. Научная конференция и школа для молодых ученых (Крым, Судак, 18-24 сентября 2017 года). Москва. 2017. С. 223.

Патенты

41. **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.

Базы данных

42. **Галибина Н.А.**, Софронова И.Н. База данных «Физиолого-биохимическая характеристика растений карельской березы на территории Карелии» (св-во о гос. регистрации № 2017620057) Официальный бюллетень «Программы для ЭВМ. Базы данных. Топологии интегральных микросхем». № 1 (20.01.2017). 2017.