

Институт леса – обособленное подразделение Федерального государственного
бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра
"Карельский научный центр Российской академии наук"

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»

Диссертация
на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Научный консультант:
доктор биологических наук
Новицкая Людмила Людвиговна

Петрозаводск – 2018

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	7
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	16
1.1. Камбиальная активность у древесных растений в норме и при формировании аномальной древесины карельской березы.....	16
1.2. Регуляция деятельности латеральных меристем. Факторы транскрипции, обуславливающие дифференцировку клеток по тому или иному пути	25
1.3. Камбий – основной акцептор ассимилятов в период латерального роста древесных растений.....	31
1.4. Сахарозосинтаза в камбиальной зоне древесных растений: регуляция, субклеточная локализация, участие в синтезе полимерных компонентов.....	34
1.5. Апопластная инвертаза: основные функции, регуляция активности, участие в создании акцепторной силы растущих тканей	45
1.6. Системы регуляции сахарозного статуса растений	48
1.7. Азотные соединения как возможные экзогенные регуляторы ксилогенеза.....	53
ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	59
2.1. Растительный материал	59
2.2. Отбор образцов	65
2.3. Микроскопические исследования.....	66
2.4. Химический анализ почвы.....	67
2.5. Биохимические исследования	68
2.6. Определение уровня экспрессии генов	71
2.7. Статистическая обработка	75
ГЛАВА 3. БИОХИМИЧЕСКИЕ ИНДИКАТОРЫ РАЗНЫХ СЦЕНАРИЕВ КСИЛОГЕНЕЗА.....	76
3.1. Годичная динамика сахарозы и активность ферментов ее метаболизации в тканях ствола двух форм березы повислой, различающихся по структуре древесины.....	77
3.2. Участие апопластной инвертазы и сахарозосинтазы в поддержании аттругирующей способности камбиальной зоны.....	90
3.3. Донорно-акцепторные отношения в системе "лист-стебель-корень" в период камбиального роста у растений березы повислой при альтернативных сценариях ксилогенеза.....	97

3.4. Отличие путей метаболизации сахарозы в камбиальной зоне при формировании древесины с разной степенью узорчатости	105
3.4.1. Распределение активности сахарозосинтазы и апопластной инвертазы, содержание сахаров и крахмала в тканях ствола 6-летних растений карельской березы с разной степенью узорчатости древесины	105
3.4.2. Метаболизация сахарозы в камбиальной зоне 25-летних растений карельской березы, произрастающих в лесных культурах	109
3.4.3. Метаболизация сахарозы в камбиальной зоне узорчатых и безузорчатых участков одного ствола 11-летних растений карельской березы.....	111
3.5. Содержание сахаров и соотношение активности ферментов утилизации сахарозы у сеянцев двух форм березы повислой	115
3.5.1. Динамика неструктурных углеводов в органах и тканях двухлетних сеянцев <i>Betula pendula</i> и <i>B. pubescence</i> на ранних этапах онтогенеза	115
3.5.2. Утилизация сахарозы в акцепторных органах у растений обычной березы повислой и карельской березы на начальных этапах онтогенеза	122
ГЛАВА 4. МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ РАЗНЫХ СЦЕНАРИЕВ КСИЛОГЕНЕЗА	130
4.1. Регуляция активности сахарозосинтазы на уровне экспрессии кодирующих ее генов в период камбиального роста.....	130
4.1.1. Активность сахарозосинтазы и уровень экспрессии генов <i>Sus1</i> , <i>Sus2</i> , <i>Sus3</i> в развивающейся ксилеме 10-летних растений двух форм березы повислой.....	130
4.1.2. Активность сахарозосинтазы и уровень экспрессии генов <i>Sus1</i> , <i>Sus2</i> в развивающейся ксилеме 25-летних растений карельской березы с разной степенью узорчатости древесины.....	134
4.1.3. Активность сахарозосинтазы и уровень экспрессии генов <i>Sus1</i> и <i>Sus2</i> у сеянцев обычной березы повислой и карельской березы	137
4.2. Участие сахарозосинтазы в синтезе целлюлозы и крахмала в период камбиального роста	141
4.2.1. Активность сахарозосинтазы, содержание целлюлозы и крахмала в развивающейся ксилеме 10-летних растений обычной березы повислой и карельской березы.....	141
4.2.2. Активность сахарозосинтазы, содержание целлюлозы и крахмала в развивающейся ксилеме 25-летних растений карельской березы с разной степенью узорчатости древесины.....	145

4.3. Изучение активности гексокиназы и уровня экспрессии генов, кодирующих переносчики сахаров, с точки зрения их потенциального участия в глюкозном сигналинге в клетке	151
4.3.1. Межклеточный транспорт сахарозы в камбиальной зоне	151
4.3.2. Зависимость активности гексокиназы в период камбиального роста от степени узорчатости древесины	156
4.4. Регуляция активности апопластной инвертазы на транскрипционном и посттрансляционном уровнях в период камбиального роста	161
4.5. Экспериментальное изменение активности апопластной инвертазы у обычной березы повислой	166
4.5.1. Торможение камбиального роста у сеянцев березы повислой сопровождается возрастанием метаболизации сахарозы в камбиальной зоне по апопластному пути	166
4.5.2. Введение экзогенной сахарозы в ткани ствола обычной березы повислой в период камбиального роста приводит к возрастанию активности апопластной инвертазы	173
4.5.3. Метаболические изменения в камбиальной зоне обычной березы повислой при нарушении нисходящего транспорта сахарозы и создании зон ее избыточного содержания	186
ГЛАВА 5. ОСНОВНЫЕ РЕГУЛЯТОРЫ РАЗВИТИЯ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЛАТЕРАЛЬНЫХ МЕРИСТЕМ	196
5.1. Изменение экспрессии генов, кодирующих CLE-пептиды группы В (CLE-41) и их рецептор (TDR), в период камбиального роста	197
5.2. Распределение экспрессии генов, кодирующих факторы транскрипции VND6, VND7 и APL, в камбиальной зоне при разных сценариях ксилогенеза	208
5.3. Изменение уровня экспрессии генов <i>CLE41</i> и <i>PXY</i> у сеянцев обычной березы повислой и карельской березы на начальных этапах онтогенеза	212
5.4. Изменение уровня экспрессии генов <i>CLE41</i> , <i>PXY</i> , <i>VND6</i> , <i>VND7</i> и <i>APL</i> в камбиальной зоне обычной березы при нарушении нисходящего транспорта сахарозы и создании зон ее избыточного содержания	214
ГЛАВА 6. ВЛИЯНИЕ УРОВНЯ ПЛОДОРОДИЯ ПОЧВЫ НА РЕАЛИЗАЦИЮ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ПРОГРАММЫ У КАРЕЛЬСКОЙ БЕРЕЗЫ	217
6.1. Избыток экзогенных нитратов подавляет формирование аномальной древесины у карельской березы	218
6.2. Доступность подвижного азота в почве оказывает влияние на проявление признака узорчатости древесины у карельской березы	226

6.2.1. Характеристика почвенных условий и потребность березы в элементах минерального питания.....	229
6.2.2. Морфологическая характеристика растений.....	230
6.2.3. Снижение плодородия почвы уменьшает метаболизацию сахарозы сахарозосинтазой при формировании нормальной по структуре древесины березы.....	231
6.2.4. Возрастание нитратредуктазной активности может увеличивать активность сахарозосинтазы.....	233
6.2.5. Снижение подвижного азота в почве увеличивает метаболизацию сахарозы по апопластному пути у узорчатых растений карельской березы.....	235
6.2.6. Возрастание нитратредуктазной активности отрицательно влияет на формирование узорчатой древесины у растений карельской березы.....	236
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	239
ВЫВОДЫ.....	244
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	246

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования

Древесные растения являются основными продуцентами в лесных экосистемах, а древесина представляет собой важный возобновляемый источник органического углерода. Продуктивность древесных растений определяется количеством и размером структурных элементов ксилемы, которые выполняют разные функции и отличаются между собой по составу компонентов их клеточных стенок. Процесс формирования древесины – ксилогенез – обуславливает структурные особенности древесины, определяет 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, Zeng, 2002; Koch, 2004 и др.). Сахарозосинтаза присутствует в растении повсеместно, но наибольшая ее активность обнаружена в акцепторных тканях (Coleman et al., 2008). Мембраносвязанная форма СС 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; Воскок 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 (TRIFEARY ELEMENT DIFFERENTIATION INHIBITORY FACTOR) и его богатая лейцином рецептор-подобная киназа (LRR-RLK) TDR (TDIF RECEPTOR) являются сигнальными компонентами, которые регулируют камбиальную активность и препятствуют дифференцировке трахеальных элементов (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). Имеющиеся в литературе данные свидетельствуют, что всевозможные 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), которые играют 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 были поставлены 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 и теоретическое значение работы

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*), 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 сахарозсинтазы 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 метаболизма сахарозы, контролирующих формирование узорчатой древесины.

Практическое значение 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, выдвигаемые на защиту

1. Выявлены метаболические причины формирования узорчатой древесины карельской березы (*Betula pendula* Roth var. *carelica*). Пониженная активность сахарозсинтазы в зоне роста и развития ксилемы карельской березы замедляет использование сахарозы на синтез 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 запасаения. Преобладание дифференцировки сосудов и волокон происходит на фоне высокой активности сахарозсинтазы (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 АпИInv 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 АпИнв, 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).

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); «Proceedings of 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).

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.

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 ИЛ 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.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АпИINV – апопластная инвертаза

ВакИINV – вакуолярная инвертаза.

ГК – неспецифическая гексокиназа

НР – нитратредуктаза

СС – сахарозосинтаза

ЦитИINV – цитоплазматическая инвертаза

APL – ген, кодирующий транскрипционный фактор *APL* (ALTERED PHLOEM DEVELOPMENT, MYB-белки), участвует в формировании флоэмы

Ces8, *Ces3*, *Ces7* – гены, кодирующие изоформы целлюлозосинтазы *Ces8*, *Ces3*, *Ces7*

Cif – ген, кодирующий белковый ингибитор апопластной инвертазы

CLE41 – ген, кодирующий CLE-пептид группы В, TDIF (TRIFARY ELEMENT DIFFERENTIATION INHIBITORY FACTOR)

CWIN1, *CWIN1.1*, *CWIN4* – гены, кодирующие изоформы апопластной инвертазы *CWIN1*, *CWIN1.1*, *CWIN4*

Hex1, *Hex2* – гены, кодирующие транспортеры гексоз *Hex1* и *Hex2*

PXY – ген, кодирующий богатую лейцином рецептор-подобную киназу (LRR-RLK) для CLE-пептидов, TDR (TDIF RECEPTOR)

Sus1, *Sus2*, *Sus3* – гены, кодирующие изоформы сахарозосинтазы *Sus 1*, *Sus 2*, *Sus 3*

VND6, *VND7* – гены, кодирующие транскрипционные факторы *VND6*, *VND7* с NAC-доменом (VASCULAR-RELATED NAC-DOMAIN), регулирующие синтез вторичной клеточной стенки, развитие и дифференцировку клеток ксилемы

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Камбиальная активность у древесных растений в норме и при формировании аномальной древесины карельской березы

По сравнению с животными растения обладают исключительной способностью к постэмбриональному росту и развитию, которые происходят в течение всей жизни растения. Рост растений осуществляется в результате митотических клеточных делений в специализированных тканях – меристемах. Самые ранние (первичные) меристемы имеют эмбриональное происхождение, к ним относятся апикальная меристема побега (ПАМ) и корня (КАМ), которые способствуют удлинению побега и корня соответственно. ПАМ дает начало прокамбию – меристематической ткани, дифференцирующейся в первичную проводящую систему (первичная ксилема и флоэма). В первичном побеге сосудистая сеть расположена в сосудистых пучках, отделенных друг от друга межпучковой паренхимой. Прокамбиальные клетки располагаются между первичной ксилемой и флоэмой, в конце первичного роста они становятся пучковой частью камбия, в дополнение к которому в межпучковой паренхиме образуется межпучковый камбий. Сосудистый камбий имеет смешанное происхождение: пучковый камбий представляет собой первичную меристему, так как происходит от апикальной меристемы через прокамбий, а межпучковый камбий – вторичную меристему, происходящую от паренхимы, вторично возобновившей митотическую активность (рис. 1). В побеге образование замкнутого круга камбия является поздним событием, имеющим место только после инициирования межпучкового камбия между сосудистыми пучками (Эверт, 2015; Nieminen et al., 2015).

Строение камбия

Сосудистый камбий – латеральная меристема, которая дает начало вторичным проводящим тканям. С морфологической точки зрения инициали камбия существуют в двух формах, как веретеновидные и лучевые инициали. У веретеновидных инициалей длина в несколько раз превышает ширину. Это призматические клетки с клиновидными концами, которые дают начало всем клеткам ксилемы и флоэмы, расположенным своими длинными осями параллельно осям органов, в которых они развиваются. Из веретеновидных инициалей формируются следующие элементы: трахеи, волокна, осевые паренхимные клетки в ксилеме, ситовидные трубки, волокна и осевые

паренхимные клетки во флоэме. Клетки другого типа, лучевые инициалы, различаются по форме – от слабо удлинённой до почти изодиаметрической. Лучевые инициалы дают начало клеткам лучей, элементам радиальной системы ксилемы и флоэмы. Размер веретеновидных инициалей изменяется с возрастом и в течение сезона роста. Конечный размер их производных лишь отчасти зависит от величины инициалей камбия, поскольку изменения в размере происходят и в процессе дифференциации клеток (Эверт, 2005). Веретеновидные инициалы камбия берёзы не образуют горизонтальных рядов, вследствие чего он относится к типу неярусного камбия (Барильская, 1978).

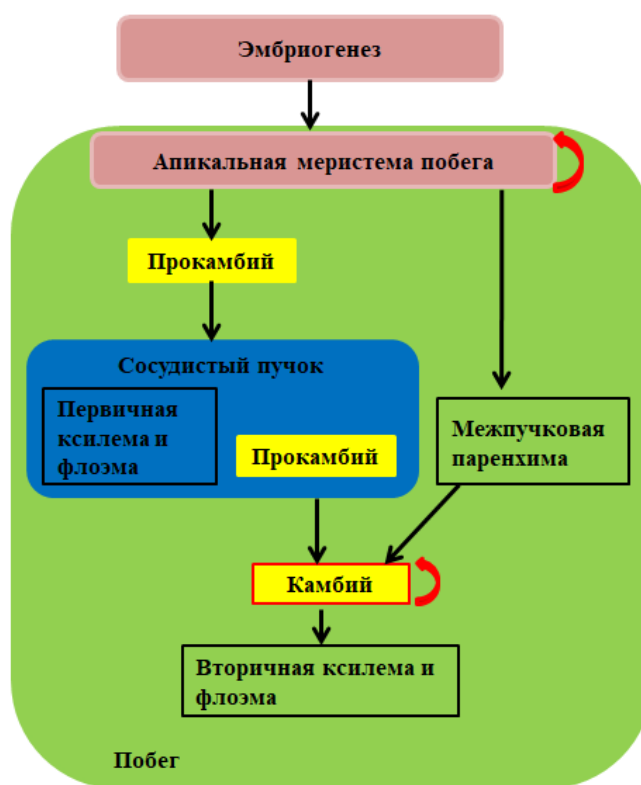


Рисунок 1. Схематическое изображение происхождения сосудистых клеток в побеге (по Nieminen et al., 2015, с изменениями)

Период активного камбиального деления

При образовании ксилемы и флоэмы инициалы камбия делятся периклинально. В результате этих делений образуются производные клетки – внутрь, в область ксилемы, и наружу, в область флоэмы. В период наивысшей активности камбия клеточные деления происходят так часто, что при образовании новых клеток сформированные перед этим клетки сохраняют меристематические свойства. Деления, добавляющие новые клетки ко

вторичным проводящим тканям, называются добавочными делениями. В результате образуется широкая зона более или менее недифференцированных клеток. В пределах этой зоны (камбиальная зона) в отдельной радиальной цепочке клеток только одна клетка считается инициальной. Это означает, что после ее периклиналильного деления одна из двух образующихся клеток остается инициальной, а вторая переходит в область дифференцирующихся флоэмы или ксилемы. Инициаль – единственная клетка, способная давать производные как в сторону ксилемы, так и в сторону флоэмы (Эверт, 2005). В период активного функционирования камбия березы повислой (июнь – июль в зависимости от погодных условий) зона интенсивного деления в стволе насчитывает 10-15 радиально расположенных веретеновидных и 6-10 лучевых клеток. Собственно инициали камбия выделить при этом невозможно, так как все клетки камбиальной зоны сохраняют некоторое время меристематическую активность и способны один или два раза делиться (Барильская, 1978).

Активно делящиеся веретеновидные и лучевые клетки камбия сильно вакуолизированы. Они содержат крупную центральную вакуоль и тонкий пристеночный слой цитоплазмы, элементы гранулярного эндоплазматического ретикулума преобладают у них над агранулярным, для них характерны агрегаты рибосом в цитоплазме, высокая активность аппарата Гольджи и многочисленные митохондрии и пластиды (Барильская, 1978).

Сезонная активность клеток камбия

У древесных растений умеренных широт периоды роста и репродукции чередуются с периодами относительно низкой активности. Сезонная периодичность отражается и на активности камбия. Образование новых клеток сосудистым камбием замедляется или полностью прекращается в период зимнего покоя (Эверт, 2005).

У березы повислой при завершении активных делений в камбии (август) камбиальная зона представлена 4-6 радиальными слоями недифференцированных веретеновидных клеток и 2-4 рядами лучевых клеток, расположенными между зрелыми вторичными ксилемой и флоэмой. Степень вакуолизации этих клеток довольно велика, хотя центральная вакуоль уже, как правило, отсутствует, и вакуолярный аппарат представлен системой вакуолей разных размеров, прозрачных или с небольшими

тонкогранулярными скоплениями внутри, а также таниноносными вакуолями (Барильская, 1978).

Во время периода покоя клетки ксилемы и флоэмы созревают в большей или меньшей близости к инициалам. Иногда между зрелыми элементами ксилемы и флоэмы остается единственный слой камбия. Некоторые проводящие ткани (часто только флоэма) могут перезимовывать в незрелом состоянии (Эверт, 2005). И веретеновидные, и лучевые клетки покоящегося камбия содержат многочисленные мелкие вакуоли. Эти вакуоли обычно содержат вещества белковой природы, а также могут включать полифенолы (таннины). Обычным запасным веществом покоящегося камбия служат липиды в виде капель. Их цикл, как правило, противоположен циклу крахмала. Гидролиз крахмала при переходе к покою может быть составляющей механизма приобретения устойчивости к холоду у деревьев умеренного климата, так как образующиеся при распаде крахмала моносахара играют роль криопротекторов (Эверт, 2005).

Камбиальные клетки березы способны накапливать в значительном количестве крахмал в осенний период и весной, перед началом реактивации. Специфической чертой ультраструктуры содержимого лучевых клеток камбия у березы является устройство пластидного аппарата. Наряду с лейкопластами в цитоплазме этих клеток обнаружены хлоропласты примитивного строения, а также пластиды, напоминающие по своей структуре хромопласты. К отличительным признакам следует также отнести особенности сезонной перестройки вакуолярной системы, связанные с накоплением и растворением фенольных веществ в вакуолях этих клеток. В камбиальных клетках, образующих лучевую систему элементов древесины, более развит пластидный аппарат. Сезонная динамика накопления крахмала в этих клетках характеризуется наличием сильнее выраженных максимумов весной и осенью. В цитоплазме лучевых инициалей в течение всего годового цикла обнаруживается значительно больше липидных включений, чем в цитоплазме веретеновидных клеток. Относительный объем таниноносных вакуолей у них также выше, число свободных рибосом на единицу клеточного объема – больше (Барильская, 1978).

Весной период покоя сменяется возобновлением активности сосудистого камбия. Выделяют две фазы восстановления активности камбия: 1) фаза радиального

увеличения камбиальных клеток («набухание» камбия), в течение которой веретеновидные клетки становятся сильно вакуолизированными; 2) инициация клеточных делений (Larson, 1994). Хотя возобновлению камбиальной активности может предшествовать уменьшение плотности протопластов клеток, не у всех видов умеренного пояса клетки камбия увеличиваются радиально перед делениями (Evert, 1961, 1963b; Derr, Evert, 1967; Davis, Evert, 1968; Tucker, Evert, 1969).

Дифференциация ксилемы и флоэмы может продолжаться в течение некоторого времени после того, как собственно деления уже завершились, а присутствие дифференцирующихся клеток не обязательно однозначно указывает на активность камбия. Достоверными признаками инициальной активности можно считать только процесс митоза и / или наличие фрагмопластов (Эверт, 2005).

Процесс камбиальных делений и последующая дифференциация ксилемных элементов у березы протекают очень быстро. В период интенсивного прироста древесины элементы ксилемы с выраженным вторичным утолщением оболочки можно наблюдать на расстоянии 8-10 клеток от камбия (Барильская, 1978).

Дифференциация элементов вторичной ксилемы у березы повислой

На ранних этапах онтогенеза, т.е. с момента деления и до образования зрелого элемента, все клетки вторичной ксилемы испытывают сходные преобразования ультраструктуры содержимого. При этом ведущим процессом, которому фактически подчинен весь метаболизм дифференцирующихся клеток, является процесс формирования клеточной оболочки (Барильская, 1978).

На расстоянии 4-5-ти клеток от центра камбиальных делений в радиальном ряду ксилемных производных обнаруживаются заметные перемены, обусловленные перестройкой клеточного метаболизма. Усиливается процесс вакуолизации. Всю центральную полость дифференцирующихся сосудов и древесинных волокон занимает большая вакуоль. Резко усиливается процесс выделения за плазмалемму исходных материалов для синтеза клеточной оболочки. Поставляемые цитоплазмой исходные материалы оболочки подвергаются полимеризации, и в результате формируется мощный слой вторичного утолщения, основу которого составляет микрофибриллярный скелет (Барильская, 1978).

Максимальная активность и наибольшая численность диктиосом в цитоплазме исследуемых клеток отмечена в период формирования вторичного утолщения оболочки (Барильская, 1978).

Дифференцирующиеся клетки паренхимы в отличие от остальных элементов древесины, находящихся на такой же стадии развития, характеризуются меньшей степенью вакуолизации. Следует отметить, что клетки лучевой и вертикальной систем древесины берез различаются по степени вакуолизации уже в процессе их образования из клеток камбия: лучевые инициали слабее вакуолизованы, чем веретеновидные (Барильская, 1978).

В ходе дифференциации паренхимные клетки откладывают довольно толстые клеточные оболочки, оставляя неутолщенными лишь те участки, через которые проходят плазмодесменные каналы, связывающие протопласты соседних паренхимных клеток, а также места контакта водопроводящей и механической систем, – поры. По мере созревания эти клетки постепенно изменяют свой метаболизм, направленный в первую очередь на построение клеточной оболочки, и включаются в процессы синтеза и накопления запасных веществ. Зрелые паренхимные клетки, недавно закончившие дифференциацию, мало отличаются по ультраструктуре от паренхимных клеток последних 3-5 годичных слоев древесины (Барильская, 1978).

Окончание дифференциации древесинных волокон и сосудов сопровождается прогрессирующим автолизом их цитоплазматических компонентов. В отличие от этого клетки древесинной паренхимы лишь перестраивают свой метаболизм, переходя к выполнению функций синтеза и накопления запасных веществ (крахмала и липидов) (Барильская, 1978).

Образование плазмодесм у березы

Цитологический анализ собственно камбиальных клеток березы повислой, фиксированных в декабре и январе, показал, что все они имеют эластичные первичные оболочки на радиальных стенках значительно более толстые (до 1.5 мкм), чем на тангентальных (0.1-0.5 мкм). Между всеми инициальными клетками камбиальной системы в период покоя сохраняется цитоплазматическая связь через плазмодесменные каналы, пронизывающие их оболочки. Плазмодесмы, собранные в группы в области пор, имеются и на радиальных, и на тангентальных стенках камбиальных клеток,

причем лучевые инициали обладают более высокой плотностью плазмодесм на единицу поверхности оболочки, чем веретеновидные. В местах контакта камбия со зрелыми ксилемными клетками сердцевинных лучей и прилегающей терминальной паренхимы участки оболочки в области пор пронизаны плазмодесмами (Барильская, 1978).

При отчленении камбием клеток, преобразующихся в ходе последующей дифференциации в сосуды и волокна древесины, имеет место полная изоляция их протопластов уже в процессе формирования клеточной пластинки, поскольку плазмодесмы в них не закладываются. Вместе с тем при образовании будущих паренхимных клеток древесины заложение плазмодесм во время деления происходит, вследствие чего цитоплазматическая непрерывность в этих клетках сохраняется. На границе дифференцирующихся клеток паренхимной системы с элементами водопроводящего и механического комплекса плазмодесмы в первичных оболочках не обнаружены (Барильская, 1978).

Дифференциация узорчатой древесины карельской березы

Первоначальные изменения в деятельности камбия происходят в системе лучевых инициалей. В клетках некоторых лучей камбиальной зоны перестраивается характер делений. Вместо упорядоченных периклиналильных делений, являющихся доминирующими при образовании нормальной древесины, лучевые инициали испытывают преимущественно антиклиналильные и поперечные деления. При подобном типе деления число лучевых клеток на данном участке камбия резко возрастает (Барильская, 1978).

Подобные перестройки в системе лучевых инициалей оказывают влияние и на соседние клетки веретеновидного камбия. Под воздействием разрастающегося луча некоторая часть близлежащих веретеновидных клеток выпадает из общей массы камбиальных клеток. Это может произойти (1) в результате их дифференциации без предварительного деления в элементы вторичной ксилемы или вторичной флоэмы, или (2) вследствие облитерации под действием механического сдавливания. При этом основная масса клеток камбиальной зоны, окружающих данный участок, продолжает делиться преимущественно периклиналильно, поэтому в камбиальном цилиндре появляются конусообразные углубления в сторону сердцевины. Камбиальные клетки аномального луча находятся на дне такого углубления (Барильская, 1978).

Вероятно, следствием указанной перестройки является и нарушение ориентации клеточной пластинки во время деления окружающих эту зону веретеновидных клеток камбия. Образующиеся при этом элементы вертикальной системы ксилемы имеют значительные отклонения по форме и размерам от аналогичных элементов в норме. На участках камбия, формирующих аномальные скопления в древесине, веретеновидные клетки откладывают преимущественно элементы аксиальной паренхимы и древесинные волокна. Сосуды образуются крайне редко (Барильская, 1978).

Участки камбиального цилиндра, которые затронула подобная структурно-метаболическая перестройка, обладают исключительно высокой меристематической активностью инициалей. В местах локальных углублений ширина зоны активно делящихся клеток камбия фактически не уменьшается, несмотря на преобладание актиклинальных и поперечных делений при откладывании элементов ксилемы. Это связано с тем, что на данном участке камбия резко возрастает темп образования клеток флоэмы. Поскольку углубления камбиального цилиндра в период формирования аномалий в древесине состоят преимущественно из лучевых клеток меристематической ткани, то, следовательно, и в сторону флоэмы на этих участках камбия откладываются главным образом элементы паренхимы (Барильская, 1978).

Образование новых лучевых инициалей из веретеновидных инициалей или их сегментов представляет собой обычное явление у древесных растений. Появление новых лучевых инициалей поддерживает относительно постоянное соотношение между лучевыми и осевыми компонентами проводящего цилиндра (Эверт, 2005). По мере того, как массив ксилемы увеличивается в диаметре, в камбии появляются новые лучевые инициали, которые представляют собой производные веретеновидных инициалей. Инициали новых однорядных лучей могут формироваться путем отделения небольших клеток от концов или боковых сторон веретеновидных инициалей (у хвойных) или путем поперечных делений таких инициалий (у травянистых и кустарниковых двудольных (Cumbie 1969)). Возникновение лучей, однако, может представлять собой чрезвычайно сложный процесс, включающий поперечное деление веретеновидных инициалей на несколько клеток, утрату некоторых продуктов этих делений или, превращение оставшихся в веретеновидные инициали (Evert, 1961; Rao, 1988).

Интересным свойством инициальных клеток в стволах карельской березы является их способность почти полностью восстанавливать цилиндрическую форму камбиальной зоны после даже самых глубоких «провалов» в ней. Это происходит благодаря интенсивным делениям клеток камбия вслед за образованием аномальных скоплений в древесине. В период нормализации деятельности камбия зона активно делящихся клеток в углублении значительно превышает по ширине окружающую зону клеток камбия, образующих нормальную древесину у этой березы. Отсутствие сосудов в составе аномальных скоплений в некоторой степени компенсируется увеличением их числа при откладывании камбием обычной древесины вслед за заросшими углублениями (Барильская, 1978).

Таким образом, в результате изменения процентного соотношения лучевых и веретеновидных клеток, за счет быстрого увеличения числа лучевых инициалей, основная масса аномальных образований в зрелой древесине карельской березы представлена элементами лучевой паренхимы. Большая часть паренхимных клеток аномалий имеет жизнеспособный протопласт, способна накапливать большие количества запасных веществ, что может быть причиной утилизации при их образовании большого количества метаболитов. В аномальных участках можно выделить два основных отличия, а именно, (1) усиление меристематической активности камбиальной ткани в целом и (2) изменение ориентации деления меристематических клеток (они начинают делиться главным образом поперечными и антиклинальными перегородками вместо переклиналильных, доминирующих при образовании нормальной древесины березы).

1.2. Регуляция деятельности латеральных меристем. Факторы транскрипции, обуславливающие дифференцировку клеток по тому или иному пути

Баланс между пролиферацией и дифференцировкой клеток имеет решающее значение для поддержания состояния меристемы, оба этих аспекта роста находятся под генетическим контролем (Nieminen et al., 2015).

Меристемы, представляющие собой резервуар стволовых клеток, устроены по сходному плану: они содержат пул стволовых клеток в центральной части и дифференцирующиеся клетки на периферии, которые дают начало разным типам тканей. Можно выделить общий принцип регуляции стволовых клеток (рис. 2). Стволовые клетки локализуются в «нише стволовых клеток» – локальном микроокружении, поставляющем факторы, необходимые для их поддержания. Дифференцировка стволовых клеток в нише подавляется в результате действия факторов, продуцируемых клетками организующего центра. Как правило, клетки организующего центра характеризуются большей длительностью клеточного цикла (делятся с меньшей скоростью). По мере деления дочерние клетки удаляются от организующего центра, оказываясь вне зоны действия сигналов, продуцируемых этим центром, и претерпевают дифференцировку (Лутова, 2013).



Рисунок 2. Общий принцип организации «ниши» стволовых клеток (по Лутова, 2013).

К числу основных регуляторов развития латеральных меристем относят несколько групп фитогормонов, в частности – цитокинины, ауксины и CLE-пептиды. Цитокинины и ауксины играют центральную роль в развитии ПАМ и КАМ, являясь в этом процессе строгими антагонистами. В последние годы были получены данные о взаимодействии этих двух групп гормонов – также как правило антагонистическом – в контроле развития латеральных меристем (Додуева и др., 2014). CLE-пептиды – сравнительно недавно идентифицированная группа пептидных фитогормонов, представители которой контролируют развитие разнообразных типов меристем – ПАМ, КАМ, клубеньковых меристем бобовых, некоторых типов патогениндуцированных опухолей, а также прокамбия и камбия (Schrader, 2003; EtcHELLS, Turner, 2010; Hirakawa et al., 2010a, b; Betsuyaku et al., 2011; Katsir et al., 2011; EtcHELLS et al., 2012, 2015; Додуева и др., 2012, 2014; Nieminen et al., 2015).

Первый CLE-пептид, участвующий в контроле активности камбия, был выделен из культуры *Zinnia elegans* как фактор, стимулирующий пролиферацию камбиальных клеток и ингибирующий дифференцировку сосудистых элементов, и получил название TDIF (Tracheary Element Differentiation Inhibitory Factor). Полноразмерная кДНК, соответствующая TDIF, кодирует белок из 132 аминокислот, при этом функционально активный TDIF-пептид, состоящий из 12 аминокислот, оказался идентичен CLE-пептидам группы В арабидопсиса – CLE41 и CLE44; сходной функцией обладает также близкий к ним пептид CLE42 (Ito et al., 2006).

TDIF-рецептор TDR/PXY относится к рецепторным киназам, богатым лейцином (LRR-RLK). Было показано, что TDR специфически связывается с TDIF/CLE41/CLE44 (Hirakawa et al., 2008). Экспрессия *CLE41/44*, обнаруженная во флоэме, не перекрывается с экспрессией *TDR/PXY*, которая является специфичной для камбиальных клеток (Hirakawa et al., 2008). На основании взаимодействия лиганда TDIF и его рецептора TDR была предложена модель сигнализации между сосудистыми клетками (рис. 3). TDIF секретируется из флоэмы и воспринимается в прокамбии/камбии TDR/PXY, что подавляет дифференциацию вторичной ксилемы и способствует пролиферации камбиальных клеток (Schrader, 2003; Hirakawa et al., 2008; 2010a, b; Lehesranta et al., 2010; Nieminen et al., 2015). Пептидный сигнал, полученный из флоэмы,

действует как позиционный сигнал для направления ориентации периклиальных делений камбиальных клеток.

Межклеточная сигнализация с помощью лиганда TDIF и его рецептора TDR/PXY схожа с той, что наблюдается в ПАМ. Пептид, кодируемый *CLV3*, секретируется в стволовых клетках и распознается рецептором LRR-RLK CLAVATA1 (*CLV1*), рецепторподобным белком *CLV2* и рецепторными комплексами Serine/threonine kinase CORYNE (*CRN*), которые экспрессируются в организующем центре (Schrader et al., 2004; Betsuyaku et al., 2011; Katsir et al., 2011; Nieminen et al., 2015). Это приводит к снижению регуляции транскрипционного фактора гомеобокса *WUSCHEL* (*WUS*), положительного регулятора поддержания стволовых клеток (Miyashima et al., 2013; Sparks et al., 2013). К идентифицированным мишеням сигнального пути TDIF/TDR относятся гены *WUSCHEL-RELATED HOMEBOX4* (*WOX4*) и *WOX14* (рис. 3), участвующие в регуляции пролиферации клеток камбия (Hirakawa et al., 2010 а, б; Suer et al., 2011; Ye, Zhong, 2015).

Экспрессия *WOX4* обнаруживается в прокамбии/камбии (Hirakawa et al., 2010b). *WOX4* и *WOX14* требуются для TDIF-индуцированной пролиферации камбиальных клеток, но не влияют на путь дифференциации ксилемы (Hirakawa et al., 2010b; Etchells et al., 2012). Было показано, что у двойного мутанта *wox4 wox14* в сосудистых пучках уменьшается количество клеток, но при этом общая организация пучков не изменяется (Etchells et al., 2013).

TDIF-зависимое ингибирование ксилемы избыточно опосредуется белками гликогенсинтазы-киназы 3 (*GSK3s*), особенно BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE 2 (*BIN2*), который взаимодействует с TDR (Kondo et al., 2014). Взаимодействие TDR-BIN2 на плазматической мембране увеличивает активность *BIN2*-киназы, приводящей к инактивации транскрипционного фактора *BRI1-EMS SUPPRESSOR 1* (*BES1*), который в свою очередь является положительным регулятором дифференциации ксилемы (Kondo et al., 2014) (рис. 3).

Известно, что пути TDIF-TDR-*WOX4* и TDIF-TDR-*GSK3s*-*BES1* взаимодействуют с другими сигнальными каскадами, включая растительные гормоны (рис. 3). Ауксиновая сигнализация взаимодействует с путями *WOX4* во время развития камбия, и экспрессия маркера ауксинового ответа (*DR5: GFP*) предшествует экспрессии *WOX4* во время

межпучкового инициирования камбия (Suer et al., 2011). Кроме того, экспрессия *WOX4* индуцируется в ответ на NРА-опосредованное накопление ауксина (Suer et al., 2011). Путь PXY/*WOX* взаимодействует не только с ауксином, но также и с этиленом (Etchells et al., 2012).

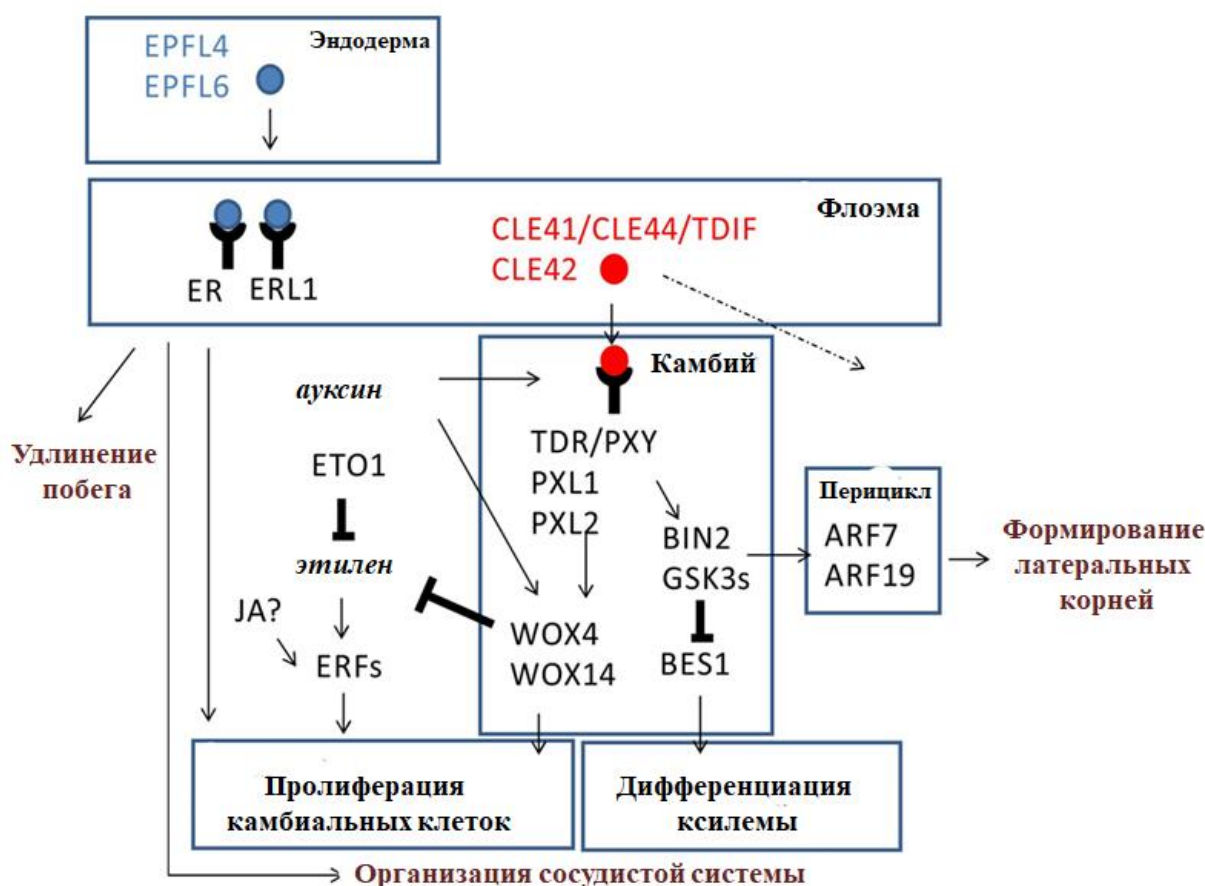


Рисунок 3. Модель пептидной сигнализации, регулирующей вторичные сосудистые ткани. Пептидные лиганды, продуцируемые в эндодерме (*EPFL4*, *EPFL6*) и флоэме (*CLE41/CLE44/TDIF* и *CLE42*), секретируются и опосредуют межклеточную сигнализацию путем связывания со своими рецепторами во флоэме и камбии соответственно. Ауксин способствует передаче сигналов *TDIF-TDR-WOX*, тогда как гены *WOX* являются отрицательными регуляторами опосредованной этиленом пролиферации камбия. *TDIF*-пептид одновременно ингибирует дифференциацию ксилемы, тем самым влияя на сосудистую организацию (Nieminen et al., 2015).

Путь CLE-PXY-WOX – это важный регулятор роста и развития камбия. На модельных растениях *Arabidopsis* получали увеличение экспрессии *CLE41* с использованием (1) промотора *SUC2*, специфичного к флоэме, (конструкция *SUC2::CLE41*) (Truernit and Sauer, 1995), (2) *35S*-промотора (конструкция *35S::CLE41*, повсеместная экспрессия *CLE41*) и (3) *IRX3*-промотора, специфичного для ксилемы, (конструкция *IRX3::CLE41*) (Gardiner et al., 2003; Mitsuda et al., 2007). Во всех использованных конструкциях наблюдалось значительное возрастание, по сравнению с диким типом, числа клеток, что согласуется с предыдущими сообщениями (Hirakawa et al., 2008; 2010 а, б). При увеличении экспрессии *CLE41* во флоэме (*SUC2::CLE41*) клеточные деления были упорядочены, как у растений дикого типа, у которых все ксилемные клетки имеют нормальную ориентацию и располагаются параллельно на радиальных и тангентальных срезах, или под прямым углом на поперечных срезах. Напротив, в линиях *35S::CLE41* и *IRX3::CLE41* присутствуют сосуды ксилемы с резко отличающейся ориентацией: клетки, имеющие нормальную ориентацию, расположены рядом с клетками в перпендикулярной ориентации. Было высказано предположение, что ориентация деления клеток зависит от локализации пептида *CLE41*: в начале развития сосудистой оболочки требуется градиент концентрации TDIF, экспрессия его гена *CLE41* должна быть ограничена флоэмой и прилегающими к ней клетками камбия (Fisher and Turner, 2007; Etchells, Turner, 2010; Etchells et al., 2015).

Дифференциация клеток ксилемы состоит из четырех процессов: отложение клеточной стенки, запрограммированная гибель клеток, автолиз и лигнификации (Escamez, Tuominen, 2014). На растениях *Arabidopsis* факторы транскрипции с NAC-доменом (*VASCULAR RELATED NAC DOMAIN, VND*) были идентифицированы как главные регуляторы дифференциации ксилемы, способные переключать программу развития. Это *VND7* и *VND6*, которые индуцируют дифференцировку протоксилемы и метаксилемы соответственно (Kubo et al., 2005; Sieburth, Deyholos, 2006; Du, Groover, 2010; Kondo et al., 2015). Показано, что транскрипционные факторы *VND7* и *VND6* регулируют гены, участвующие в синтезе и отложении вторичной клеточной стенки, а также индукции запрограммированной клеточной смерти (Ohashi-Ito et al., 2010; Yamaguchi et al., 2010; Pesquet et al., 2013; Neo et al., 2014).

Транскрипционный фактор *APL* (ALTERED PHLOEM DEVELOPMENT, MYB-белки) играет основную роль в развитии флоэмы. *APL* экспрессируется уже на ранних стадиях развития флоэмы (эмбриональная стадия) (Bonke et al., 2003; Truernit et al., 2008; Truernit, 2014; Neo et al., 2014; Rodriguez-Villalon et al., 2014; Kondo et al., 2016).

Известно, что *APL* требуется не только для дифференциации флоэмы, но также для ингибирования дифференциации ксилемы на месте флоэмы (Bonke et al., 2003; Truernit et al., 2008; Truernit, 2014; Neo et al., 2014). У растений *Arabidopsis* со сверхэкспрессией *APL* по всей сосудистой ткани под промотором *WOL* (конструкция *WOLpro::APL*) клетки в положении протоксилемы оставались недифференцированными по всему корню. Тот факт, что недифференцированные клетки в месте расположения протоксилемы содержали ядро, указывает на то, что *APL* сам по себе недостаточен для инициирования развития флоэмы в эктопическом положении. Выдвинуто предположение, что функция *APL* состоит в том, чтобы организовать правильную дифференциацию флоэмы, поддерживать это состояние дифференцировки клеток и способствовать пространственному ограничению областей ксилемы (Bonke et al., 2003; Truernit et al., 2008; Truernit, 2014; Rodriguez-Villalon et al., 2014; Kondo et al., 2016).

Таким образом, проведенный анализ литературы показал, что к настоящему времени механизмы, регулирующие развитие латеральных меристем, изучены гораздо хуже, по сравнению с апикальными меристемами. Дальнейшее изучение пути CLE-PXY, а также факторов транскрипции *VND7*, *VND6* и *APL* в камбиальной зоне древесных растений, как в норме, так и при развитии аномалий, позволит лучше понять механизмы, регулирующие переход от пролиферации камбиальных инициалей к дифференцировке, а также определяющие последующую судьбу стволовых клеток.

1.3. Камбий – основной акцептор ассимилятов в период латерального роста древесных растений

Камбий – гетеротрофная ткань, которая расходует на дыхание и обновление своих структур органические вещества и, поэтому, постоянно нуждается в систематическом их пополнении за счет притока ассимилятов. Продукты фотосинтеза поступают в камбиальную зону по проводящим элементам флоэмы, главным образом, в виде сахарозы. Именно сахароза, как основная транспортная форма ассимилятов у березы повислой (Новицкая и др., 2015) играет важную роль в росте и развитие этого древесного растения.

Для поддержания транспорта необходимо создание концентрационного градиента сахарозы в месте разгрузки флоэмы. Утилизация сахарозы в растительных тканях происходит посредством участия ферментов ее гидролиза – инвертазы (Инв) и сахарозосинтазы (СС) (Курсанов, 1976; Sturm, Tang, 1999; Koch, 2002 и др.).

Разгружаясь из флоэмы в акцепторных тканях, сахароза может быть расщеплена или в апопласте инвертазой клеточной стенки, или в цитоплазме потребляющих клеток цитоплазматической инвертазой и/или сахарозосинтазой, или в вакуоли вакуолярной инвертазой. Именно Инв и СС осуществляют включение расщепляемой ими сахарозы в различные метаболические пути (Курсанов, 1976; Кретович, 1986; Copeland, 1990; Zrenner et al., 1995; Weber et al., 1996; Dejardin et al., 1997; Tang et al., 1999; Iraqi and Tremblay, 2001; Sturm, 1999; Winter, Huber, 2000; Wang, Ruan, 2012).

СС (К.Ф. 2.4.1.13) представляет собой гликозилтрансферазу: в присутствии уридиндифосфата (УДФ) она обратимо расщепляет сахарозу на уридиндифосфатглюкозу (УДФГ) и фруктозу (сахароза + УДФ ↔ УДФ-глюкоза + фруктоза). Несмотря на двойную направленность сахарозосинтазной реакции, в акцепторных тканях СС функционирует, в основном, в направлении распада сахарозы, в связи с высоким запросом на углерод, необходимый для биосинтетических и дыхательных процессов (Winter et al., 1997). В клетке СС может находиться в свободном или связанном с мембранами состоянии (Winter et al., 1997; Komina et al., 2002; Koch, 2004). Считается, что свободная форма СС поддерживает пул гексозофосфатов, необходимый для дыхания растительных клеток (Rees et al., 1984; Winter et al., 1997; Komina et al., 2002; Koch, 2004). Связанная с цитоплазматической мембраной форма СС

входит в состав целлюлозосинтазного комплекса, поставляя УДФ-глюкозу, образующуюся в ходе расщепления сахарозы, непосредственно на синтез целлюлозы (Amor et al., 1995; Delmer, Amor, 1995; Carlson et al., 1996; Sturm, Tang, 1999; Barratt et al., 2001; Coleman, 2006; Ruan et al., 2003; Koch, 2004; Geisler-Lee et al., 2006; Coleman et al., 2009; Baroja-Fernandez et al., 2012); и др.).

В ходе ксилогенеза СС активно включается в метаболизм клеток на этапе отложения вторичной клеточной стенки (Nauch, Magel, 1998; Hertzberg et al., 2001; Coleman et al., 2009), регулируя количество УДФ-глюкозы, идущей на синтез микрофибрилл целлюлозы. Данная стадия является одной из наиболее важных, поскольку клеточные стенки составляют основную часть древесной биомассы. Несмотря на то, что у древесных растений в период камбиального роста основная функция СС в тканях ствола – участие в синтезе компонентов клеточных стенок (в первую очередь ксилемы), УДФ-глюкоза, образующаяся при расщеплении сахарозы СС, может расходоваться также на биосинтез каллозы (Amor et al., 1995; Sturm, Tang, 1999; Ruan et al., 2003) и крахмала (Geisler-Lee et al., 2006; Baroja-Fernandez et al., 2012).

Инвертаза (КФ 3.2.1.26) – гидролаза, которая катализирует реакцию гидролиза сахарозы до глюкозы и фруктозы (сахароза + $H_2O \rightarrow$ глюкоза + фруктоза). Гексозы, образующиеся в ходе инвертазного расщепления сахарозы, могут расходоваться на дыхание, синтез крахмала и компонентов клеточных стенок (целлюлоза, гемицеллюлозы, лигнин и др.), а также выступать в роли сигнальных молекул (Koch, 2004). Инв играет важную роль в поддержании градиента концентрации сахарозы между донорными и акцепторными тканями (Greenshields et al., 2004; Koch, 2004). В растении обнаружено три формы Инв, отличающиеся по своим биохимическим свойствам и месту локализации. Вакуолярная инвертаза (ВакИнв) с оптимум рН = 3.5-5.0 – фермент, который за счет расщепления сахарозы в вакуолях повышает концентрацию осмотически активных веществ в растущих растяжением клетках. ВакИнв контролирует отложение сахарозы в сахарозонакапливающих органах (Sturm and Tang, 1999), а максимальная генерация гексоз в вакуоли через гексозный сигналинг инициирует деление и дифференциацию клеток (Koch, 2004). Цитоплазматическая инвертаза (ЦитИнв) – щелочной фермент с оптимум рН = 7.0-7.8; он локализован в цитоплазме и вовлекает сахарозу в метаболизм, который, как правило, имеет катаболическую

направленность. Инвертаза клеточной стенки или апопластная инвертаза (АпИInv) имеет оптимум $pH = 3.5-5.0$. АпИInv играет ключевую роль в создании и поддержании акцепторной силы тканей, участвуя тем самым в регуляции дальнего транспорта ассимилятов (Eschrich, 1980). Показано, что (1) формы Инв, наряду с СС, участвуют в создании концентрационного градиента сахарозы в месте разгрузки флоэмы, но основная роль в регуляции ее транспорта у большого числа растений принадлежит АпИInv, (2) соотношение активностей разных форм Инв определяет преимущественное включение расщепляемой ими сахарозы в те или иные метаболические пути и, как следствие, оказывает влияние на направление дифференциации производных камбия (Carlson and Chourey, 1999; Sturm, Tang, 1999; Iraqi and Tremblay, 2001; Cho et al., 2005; Koonjul et al., 2005; Godt, Roitsch, 2006; Jia et al., 2008; Barratt et al., 2009; Welham, 2009). Следует отметить, что указанные выше работы выполнены, главным образом, на травянистых растениях. По древесным растениям публикации немногочисленны и стали появляться лишь в последние десять лет (Maurel et al., 2004; Iraqi et al., 2005; Wocock et al., 2008; Canam et al., 2008).

1.4. Сахарозосинтаза в камбиальной зоне древесных растений: регуляция, субклеточная локализация, участие в синтезе полимерных компонентов

В клетках как травянистых, так и древесных растений, образуются множественные изоформы СС, которые отличаются по субстратной специфичности, удельной активности, оптимуму рН. Различные внешние факторы (анаэробные условия, значение рН среды, температура, уровень влажности почвы, почвенное плодородие и др.) оказывают влияние на активность СС. Регуляция активности СС может осуществляться, как за счет изменения уровня экспрессии кодирующих ее генов, так и на посттрансляционном уровне (Koch, 2004; Winter, Huber, 2000; Koch, 1996).

СС относится к ферментам, деятельность которых жестко обусловлена статусом углеводного обмена растения, в частности, метаболизма сахарозы. Экспрессия кодирующих СС генов, в значительной степени, зависит от содержания сахаров в тканях растения, при этом изоформы фермента по-разному реагируют на изменение содержания углеводов в клетке (Koch, 1996). Активность СС возрастает при увеличении концентрации сахарозы в условиях глюкозного голодания клетки и снижается при повышенном содержании глюкозы (Winter, Huber, 2000).

Регуляция активности СС на посттрансляционном уровне осуществляется посредством ее фосфорилирования. На листьях кукурузы (*Zea mays* L.) было показано, что фосфорилирование СС *in vitro* селективно активирует реакцию расщепления сахарозы посредством увеличения сродства фермента к субстрату. Так, K_m для УДФ снижается в 5 раз, а для сахарозы – в 2.5 раза. При этом статус фосфорилирования не влияет на синтетическую активность СС (Huber et al., 1996b).

СС имеет два сайта фосфорилирования – Ser15 (S15) и Ser170 (S170). Устойчивая активная форма СС – это сахарозосинтаза, активированная фосфорилированием по сайту S15 (Huber et al., 1996b; Zhang et al., 1999). Фосфорилирование СС по этому сайту осуществляется за счет активности кальций-зависимой протеиновой киназы (CDPK) (Zhang et al., 1999; Hardin et al., 2003; Cheng et al., 2002). Показано, что фосфорилирование СС за счет CDPK приводило к увеличению активности фермента в направлении распада сахарозы как в реакции с УДФ, так и с АДФ (Takeda et al., 2017). Поддержание устойчивой формы СС происходит за счет блокировки второго сайта фосфорилирования (S170) белком ENOD 40 (early nodulin)

(Hardin et al., 2003; Kouchi et al., 1999; Rohrig et al., 2002; 2004). Отсутствие связывания с защитным белком приводит к фосфорилированию фермента посредством CDPK по S170 сайту. S170-фосфорилированная СС образует конъюгаты с убиквитином и в дальнейшем подвергается убиквитин-опосредованной протеасомной деградации (Hardin et al., 2003) (рис. 4).

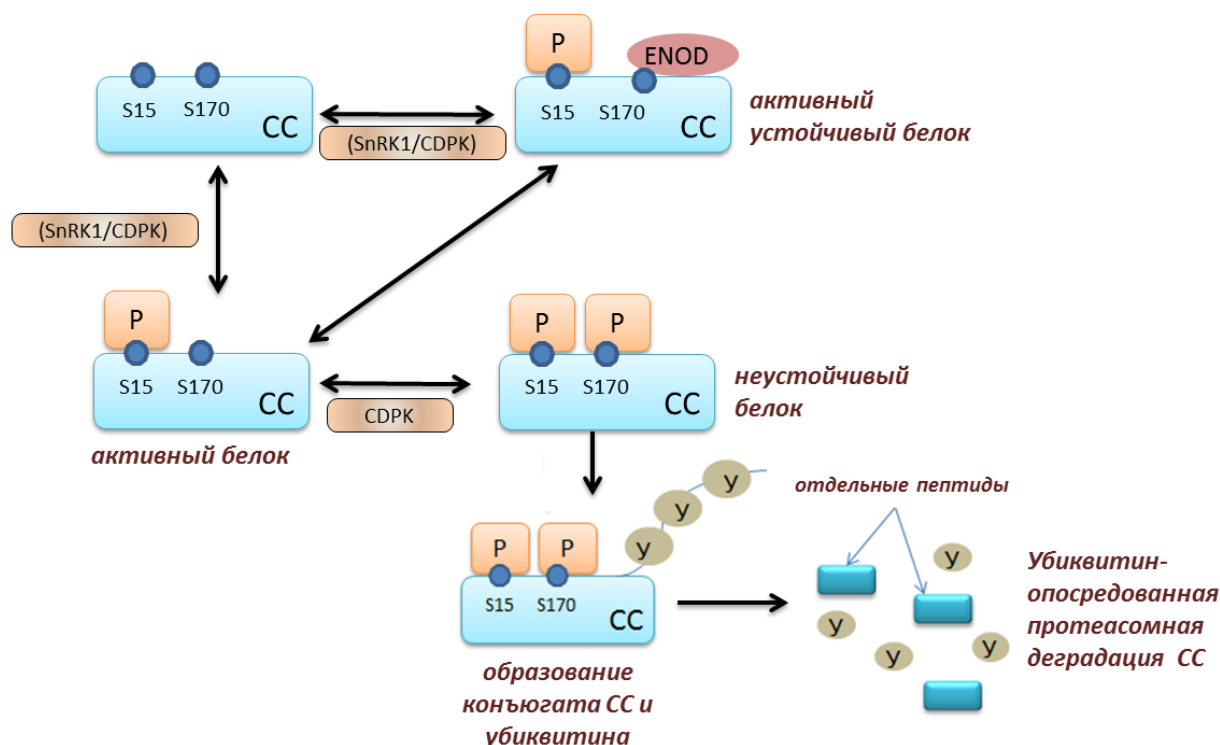


Рисунок 4. Модель регуляции сахарозосинтазы (СС) на посттранскрипционном уровне. Активация СС фосфорилированием по сайту Ser15 (S15) происходит за счет кальций-зависимой протеиновой киназы (CDPK) и SnRK1 (SNF1-related protein kinase-1) протеиновой киназы. CDPK-катализируемое фосфорилирование СС по сайту Ser170 (S170) приводит к убиквитин-опосредованной протеасомной деградации СС. Поддержание устойчивой формы СС происходит за счет блокировки второго сайта фосфорилирования (S170) белком ENOD 40 (early nodulin) (по Hardin et al., 2003 с изменениями).

В фосфорилировании СС по сайту S15 может участвовать SnRK1 (SNF1-related protein kinase-1) (Purcell et al., 1998; Chikano et al., 2001; Hardin et al., 2003). SnRK1 относится к SNF1 (sucrose non-fermenting-1) протеиновым киназам, предпочтительно

активирующимся в стрессовых условиях, при которых снижается уровень глюкозы и аденозинтрифосфатов и повышается концентрация АМФ (Джамеев, 2015). Основная стратегия механизмов, регулируемых этими киназами, направлена на снижение уровня биосинтетических процессов и активацию альтернативных катаболических путей (Джамеев, 2015). Следует отметить, что SnRK1 катализирует фосфорилирование СС только по сайту S15 и не участвует в фосфорилировании S170 (Koch, 2004) (рис. 4). Растительные SnRK1, помимо влияния на СС, могут также фосфорилировать сахарозофосфатсинтазу и нитратредуктазу, ингибируя тем самым синтез сахарозы, восстановление неорганического азота и включение его в органические соединения. Регуляция активности СС через SnRK1 осуществляется не только на посттрансляционном уровне, но и на уровне транскрипции. SnRK1 может активировать гены СС и ферментов глиоксилатного цикла, репрессированные глюкозой (Джамеев, 2015).

СС в клетке находится в свободном или связанном состоянии, при этом субклеточная локализация фермента влияет на то, как углерод распределяется между конкурирующими путями (Winter et al., 1997; Komina et al., 2002; Koch, 2004; Duncan, Huber, 2007; Winter, Huber, 2013). Несмотря на то, что СС – растворимый белок, имеется большое количество данных, свидетельствующих о способности данного фермента ассоциироваться с мембранами (Winter et al., 1997; Ruan et al., 2003; Hardin et al., 2004; Duncan et al., 2006; Hardin et al. 2006). СС обычно представлена в виде тетрамерного белка, но может образовывать димеры и, при некоторых условиях, мономеры (Duncan, Huber, 2007; Winter, Huber, 2013). Считается, что именно тетрамерная структура СС представляет собой активный фермент, способный связываться с мембранами (Su, Preiss, 1977; Chourey, 1981; Echt, Chourey, 1985; Chourey et al., 1986; McElfresh, Chourey, 1988; Koch et al., 1992; Chourey, Taliercio, 1994; Hardin, Huber, 2004).

Одним из основных факторов, влияющих на олигомеризацию СС, является концентрация сахарозы, которая действует как метаболический сигнал, приводящий к формированию тетрамерной формы фермента (Hardin et al., 2006; Duncan, Huber, 2007). Показано, что сахароза оказывает существенное влияние на связывание СС с мембранами *in vitro* (Hardin et al., 2006), а снижение концентрации сахарозы *in vivo* приводит к уменьшению связи СС с микросомальными мембранами (Duncan, Huber,

2007). Участие сахарозы в регуляции образования тетрамерной формы СС является важным фактором, определяющим клеточную локализацию фермента.

Связыванию СС с мембраной способствует также фосфорилирование фермента (по сайту S15), при этом поддержание тетрамерной структуры СС происходит даже в отсутствие дисахарида (Huber et al., 1996б; Hardin et al., 2004; Dunkan et al., 2006; Dunkan, Huber, 2007).

Образованию тетрамера СС в отсутствие сахарозы способствуют низкие значения рН (6.0), тогда как высокий уровень рН (8.5) вызывает образование смеси форм от мономеров до тетрамеров (Hardin et al., 2006; Dunkan, Huber, 2007). Способность СС образовывать различные олигомерные структуры в зависимости от рН важна для механизмов, регулирующих каталитическую активность, а также активности мембранного связывания. Исходя из того, что оптимум рН для СС в направлении распада составляет 6-8.5, а в направлении синтеза – 8.5-9.5 (Morell, Copeland, 1985), можно предположить, что кислые микродомены в окрестности плазматической мембраны повышают активность мембраносвязанной СС в направлении расщепления сахарозы (Dunkan, Huber, 2007).

Имеется большое количество данных, свидетельствующих о способности СС связываться с F-актином *in vitro* и возможности ассоциации фермента с актиновым цитоскелетом *in vivo* (Winter et al., 1998; Winter, Huber, 2000; Azama et al., 2003, Matic et al., 2004). На связывание белка с F-актином влияют факторы, которые способствуют олигомеризации СС, контролируя тем самым внутриклеточную локализацию СС *in vivo* и включение ее в различные метаболические пути (Dunkan, Huber, 2007).

Мембраносвязанная СС может быть ассоциирована как с плазматической мембраной клетки, так и мембранами различных ее компартментов (аппарата Гольджи, амилопластов, вакуолей) (Koch, 2004). Продукты расщепления сахарозы, ассоциированные с клеточной стенкой и аппаратом Гольджи, расходуются на биосинтез целлюлозы и каллозы, связанные с мембраной амилопласта – на синтез крахмала (Koch, 2004); возможная роль СС, локализованной на тонопласте, – использование сахарозы, находящейся в вакуолях (Hong et al., 2001). Считается, что продукты распада сахарозы, образующиеся в ходе деятельности свободной СС, расходуются на процессы дыхания и общего метаболизма клетки (Rees et al., 1984; Copeland, 1990; Quick, Schaffer, 1996;

Winter et al., 1997; Komina et al., 2002; Koch, 2004). У древесных растений в развивающейся ксилеме (главном акцепторе ассимилятов в период камбиального роста) наиболее значимую роль будут иметь изоформы СС, участвующие в синтезе компонентов клеточной стенки, а при альтернативных сценариях ксилогенеза – в синтезе крахмала.

У большинства растений присутствуют несколько изоформ СС, кодируемых мультигенным семейством и отличающихся по своим биологическим функциям и кинетическим характеристикам. Гены, кодирующие изоформы СС, различаются по нуклеотидной последовательности и профилям экспрессии (Ruan et al., 2003; Kladnik et al., 2005; Barratt et al., 2009; Zhang et al., 2011).

Наиболее изучены изоформы СС у травянистых растений (Ruan et al., 2003; Haigler et al., 2001; Barratt et al., 2009 и др.). Исследования функции генов СС проведены, в основном, на модельном растении *Arabidopsis*, у которого выделено 6 изоформ СС (*Sus1-6*), объединенных в 3 пары на основании филогенетического анализа (Baud et al., 2004; Bieniawska et al., 2007). В большей степени изучены изоформы фермента, кодируемые генами *Sus1* и *Sus2*, участвующие в синтезе крахмала в запасующих тканях (Echt, Chourey, 1985; Varoja-Fernandez et al., 2003). Участие СС в синтезе целлюлозы на примере травянистых растений обсуждается в обзоре Haigler с соавторами (Haigler et al., 2001). У трансгенных растений с пониженной активностью СС наблюдается снижение целлюлозы в клеточной стенке, по сравнению с растениями дикого типа.

Работ, посвященных изучению изоформ СС у древесных растений, очень мало, в основном, такие исследования проводятся на растениях р. *Populus*. Результаты структурного анализа показали наличие у растений тополя семи генов, кодирующих разные изоформы СС, которые располагаются в 4 (из 19) хромосомах (Zhang et al., 2011). Высокая идентичность по аминокислотной (АК) последовательности у изоформ и нуклеотидной последовательности кодирующих их генов, найдена между *Sus1* и *Sus2*, *Sus4* и *Sus5*, *Sus6* и *Sus7*. Ген *Sus3* выделяют в отдельную группу. Показано, что изоформы СС тополя SS1 и SS2 на 80.9-85.7% идентичны данным изоформам картофеля, томата, *Arabidopsis* по АК последовательности, и, в меньшей степени, изоформам однодольных (пшеница, кукуруза) – на 74.1-80.0% (Zhang et al., 2011). В базе

данных национального центра биотехнологической информации США (National Center for Biotechnological Information, NCBI) имеется информация по 3 генам (*Sus1*, *Sus2*, *Sus3*), кодирующим СС для видов р. *Betula* – *B. luminifera*, *B. platyphylla*. В 2017 году был секвенирован геном березы повислой – *B. pendula*, и проведен геномный анализ ее популяций, а также семи других представителей семейства *Betulaceae* (Salojärvi et al., 2017).

В исследованиях по изучению экспрессии генов сахарозосинтазного семейства показано, что изменение уровня экспрессии генов СС влияет на содержание целлюлозы в ксилеме древесных растений в большей степени, чем травянистых (Coleman, 2006; Coleman et al., 2009), а также определяет свойства древесины (Hauch, Magel, 1998; Salnikov et al., 2001; Andersson-Gunneras et al., 2006; Coleman, 2006, Coleman et al., 2009; Nilsson et al., 2010).

Экспрессия генов, кодирующих СС, ткане- и органоспецифична и зависит от стадии развития растения (Мощенская, 2017). В работах по изучению СС на сеянцах *P. tremula* × *tremuloides* (Nilsson et al., 2010) и *P. trichocarpa* (Zhang et al., 2011; Geisler-Lee et al., 2006) выявлены различия в распределении уровня экспрессии генов, кодирующих разные изоформы СС в органах и тканях, и показано, что как в зрелой, так и в дифференцирующейся ксилеме наиболее высокие значения экспрессии характерны для генов *Sus1*, *Sus2* (Geisler-Lee et al., 2006; Zhang et al., 2011) и *Sus3* (в паренхимных клетках лучей) (Zhang et al., 2011). Наиболее высокий коэффициент корреляции между активностью СС и экспрессией генов в развивающейся древесине характерен для *Sus1* и *Sus2* (Gerber et al., 2014). Вероятно, основная роль генов *Sus1* и *Sus2* состоит в регуляции поставки углерода для синтеза компонентов клеточной стенки. Как на травянистых, так и на древесных растениях было показано, что изоформа фермента SS1, кодируемая геном *Sus1*, имеет наибольшее сродство к УДФ, по сравнению с SS2 и SS3 (Bieniawska et al., 2007; Tanase, Yamaki, 2000). Ген *Sus2* может участвовать в синтезе целлюлозы при низком уровне транскрипции *Sus1* или пониженной активности SuSy1, в частности, при избыточном накоплении в тканях фруктозы, высокие концентрации которой сильно ингибируют или инактивируют SuSy1 (Matic et al., 2004). В норме у древесных растений ген *Sus3* практически не экспрессируется в формирующихся клетках древесины, уровень его транскриптов повышается в зрелом листе. Как правило, ген *Sus3* имеет широкий

диапазон транскрипции в органах и тканях и рассматривается как ген общего метаболизма (Geisler-Lee et al., 2006; Zhang et al., 2011).

Образование ксилемы (ксилогенез) у древесных растений происходит поэтапно и включает деление камбиальных инициалей и ксилемных производных камбия, их рост и дифференциацию, отложение вторичной клеточной стенки, лигнификацию клеточных оболочек и программированную клеточную смерть (Savidge, 2000; Plomion et al., 2001; Du, Groover, 2010; Ye, Zhong, 2015).

В ходе ксилогенеза активное включение СС в метаболизм клеток происходит на стадии отложения вторичной клеточной стенки, данный этап является очень важным, поскольку именно вторичные клеточные стенки имеют наибольшую массовую долю в древесине (Dinwoodie, 1975). Участие СС в формировании клеточной стенки обеспечивается за счет образования комплексов из ее мембраносвязанной формы с целлюлозосинтазой (Amor et al., 1995; Sturm, Tang, 1999; Koch, 2004). Такая ассоциация дает возможность прямого поступления УДФ-глюкозы, образующейся в ходе сахарозосинтазного расщепления сахарозы, к месту синтеза клеточной стенки. УДФ-глюкоза служит субстратом для синтеза β -(1 \rightarrow 4)-глюкановых цепей целлюлозы (Amor et al, 1995; Coleman, 2006; Coleman et al., 2009; Ruan, 2014).

В последнее время появляется все больше работ, в которых участие СС в синтезе целлюлозы демонстрируется с помощью данных молекулярно-генетического анализа. Среди древесных растений такие исследования активно ведутся на тополе. На трансгенных растениях тополя показано, что высокий уровень экспрессии генов сахарозосинтазного семейства коррелирует с активным утолщением вторичных клеточных стенок ксилемы и приводит к увеличению прочности древесины (Coleman et al., 2009; Hauch and Magel, 1998; Salnikov et al., 2001; Nilsson et al., 2010). На взрослых деревьях тополя (*Populus tremula*) (Andersson-Gunneras et al., 2006), сеянцах его гибридных линий *P. alba* \times *P. gradidentata* (Hertzberg et al., 2001), *P. deltoides* \times *P. trichocarpa* (Song et al, 2010), *P. tremula* \times *P. tremuloides* (Gerber et al., 2014) выявлена корреляция между уровнем экспрессии генов, кодирующих СС, и количеством содержащейся в древесине целлюлозы. Участие СС в образовании древесины показано на гибридных линиях тополя *P. alba* \times *gradidentata* (Coleman et al., 2009), *P. deltoides* \times *trichocarpa* (Song et al., 2010) и *P. tremula* \times *tremuloides* (Gerber et al., 2014).

Выявлено влияние СС на содержание целлюлозы, гемицеллюлоз, лигнина на единицу объема древесины. Снижение экспрессии генов, кодирующих СС, приводит к изменению хемотипа клеточной стенки (в частности, в составе лигнина происходит увеличение соотношения *сирингильные / гваяцильные* единицы) (Gerber et al., 2014).

Помимо синтеза целлюлозы, СС принимает участие в синтезе другого полисахарида – каллозы (β -(1 \rightarrow 3)-глюкана) (Koch, 2004; Pirsellova, Matusicova, 2012). На трансгенных растениях *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., у которых отсутствовали 2 изоформы СС, функционирующие во флоэме (SS5 и SS6), было показано снижение объема каллозы в ситовидных элементах (Barratt et al., 2009). Синтез каллозы происходит при участии мультиэнзимного комплекса, связанного с плазматической мембраной. Субстратом для синтеза каллозы, также, как и целлюлозы, служит УДФ-глюкоза – продукт сахарозосинтазного расщепления сахарозы. В состав каллозосинтазного комплекса входят каллозосинтаза (CalS), УДФ-глюкозотрансфераза (UGT1), белок Rop1, СС и аннексин (Hong et al., 2001; Salnikov et al., 2003; Pirsellova, Matusicova, 2013; Chen, Kim, 2009). UGT1, Rop1 и СС не имеют трансмембранных доменов, составляя часть каллозосинтазного комплекса. Они или непосредственно взаимодействуют с белком CalS, или связываются с мембраной после некоторой посттрансляционной модификации (Hong et al., 2001). Функция UGT заключается в передаче УДФ-глюкозы из сахарозосинтазной субъединицы в CalS, Rop1 выступает в качестве молекулярного переключателя, контролирующего активность CalS. Возможное расположение этих двух белков в центральном гидрофильном домене пептида CalS может создать канал для переноса УДФ-глюкозы. Подобная ассоциация белков в каллозосинтазном комплексе обеспечивает быстрый поток субстрата для синтеза значительных количеств каллозы, необходимых для заполнения большого объема растущей клеточной пластинки, менее чем за 60 мин (Hong et al., 2001).

Во флоэме каллозные отложения свойственны, главным образом, ситовидным элементам, что отличает их от прочих клеток проводящих тканей. Каллоза откладывается на поверхности ситовидных пластинок ситовидных трубок, концентрируясь в области соединяющих трубки пор (Курсанов, 1976). Широко распространено мнение, что быстрое отложение каллозы обеспечивает механизм регуляции межклеточного потока, а каллозные пробки играют роль выключателей

межклеточных контактов на тех участках пути, где возникает неисправность, что сохраняет работоспособность остальной части проводящей системы (Botha, Cross, 2000; Iglesias, Meins, 2000; Simpson et al., 2009). Отложение каллозы происходит в ходе нормального онтогенеза структурных элементов тканей, а также стимулируется воздействием различных факторов окружающей среды (McNairn, 1972; Hughes, Gunning, 1980; Iglesias, Meins, 2000; Sivaguru et al., 2000; Maeda et al., 2006; Simpson et al., 2009; Pirselova, Matusikova, 2013).

В литературе имеются многочисленные данные об участии СС в биосинтезе крахмала (Baroja-Fernandez et al., 2003; Kladnik et al., 2005; Patrick et al., 2013). Схематическое изображение возможных путей биосинтеза крахмала представлено на рисунке 5. УДФ-глюкоза, образованная при расщеплении сахарозы СС, переводится в глюкозо-1-фосфат (Г-1-Ф) в реакции, катализируемой УДФГ-пирофосфорилазой. Из Г-1-Ф образуется (1) глюкозо-6-фосфат (Г-6-Ф) под действием фосфоглюкомутазы (этот путь, в большей степени, встречается у двудольных растений) или (2) АДФ-глюкоза в реакции, катализируемой АДФГ-пирофосфорилазой (этот путь протекает при развитии семян однодольных растений). Г-6-Ф и АДФ-глюкоза, в свою очередь, транспортируются в амилопласты. АДФ-глюкоза непосредственно используется на синтез крахмала в реакции, катализируемой крахмалсинтазой, а Г-6-Ф преобразуется в Г-1-Ф и переводится в АДФ-глюкозу при участии АДФГ-пирофосфорилазы (рис. 5).

Путь образования крахмала из УДФ-глюкозы считается приоритетным в акцепторных тканях растений (Tauberger et al., 2000, Tiessen et al., 2002; Baroja-Fernandez et al., 2003), и УДФ является преимущественным субстратом для сахарозосинтазной реакции (Pozueta-Romero et al., 1999; Baroja-Fernández et al., 2003). Показано, что АДФ также может вступать в катализируемую СС реакцию. В результате такой реакции образуется АДФ-глюкоза, транспортируемая к месту синтеза крахмала в амилопласты (Shannon et al., 1998; Pozueta-Romero et al., 1999; Baroja-Fernández et al., 2003) (рис. 5).

Работы, выполненные на травянистых растениях, показывают корреляцию активности СС с накоплением крахмала в запасующих тканях и органах (Echt, Chourey, 1985; Baroja-Fernández et al., 2012). У древесных растений основная функция СС в тканях ствола в период камбиального роста – участие в синтезе компонентов клеточных стенок ксилемы и запасание крахмала у них в этот период происходит слабо.

Разгрузка флоэмы играет ключевую роль в распределении фотоассимилятов на дыхание и биосинтетические процессы в акцепторных органах древесных растений (Chen et al., 2017). В период камбиального роста основным акцептором, потребляющим синтезирующуюся в донорных органах сахарозу, является ксилема, что объясняет большую ее массовую и объемную долю, по сравнению с флоэмой (Plomion et al., 2001). Расходование сахарозы на синтез компонентов клеточных стенок ксилемы способствует оттоку дисахарида и поддержанию градиента концентрации между ксилемой и флоэмой.

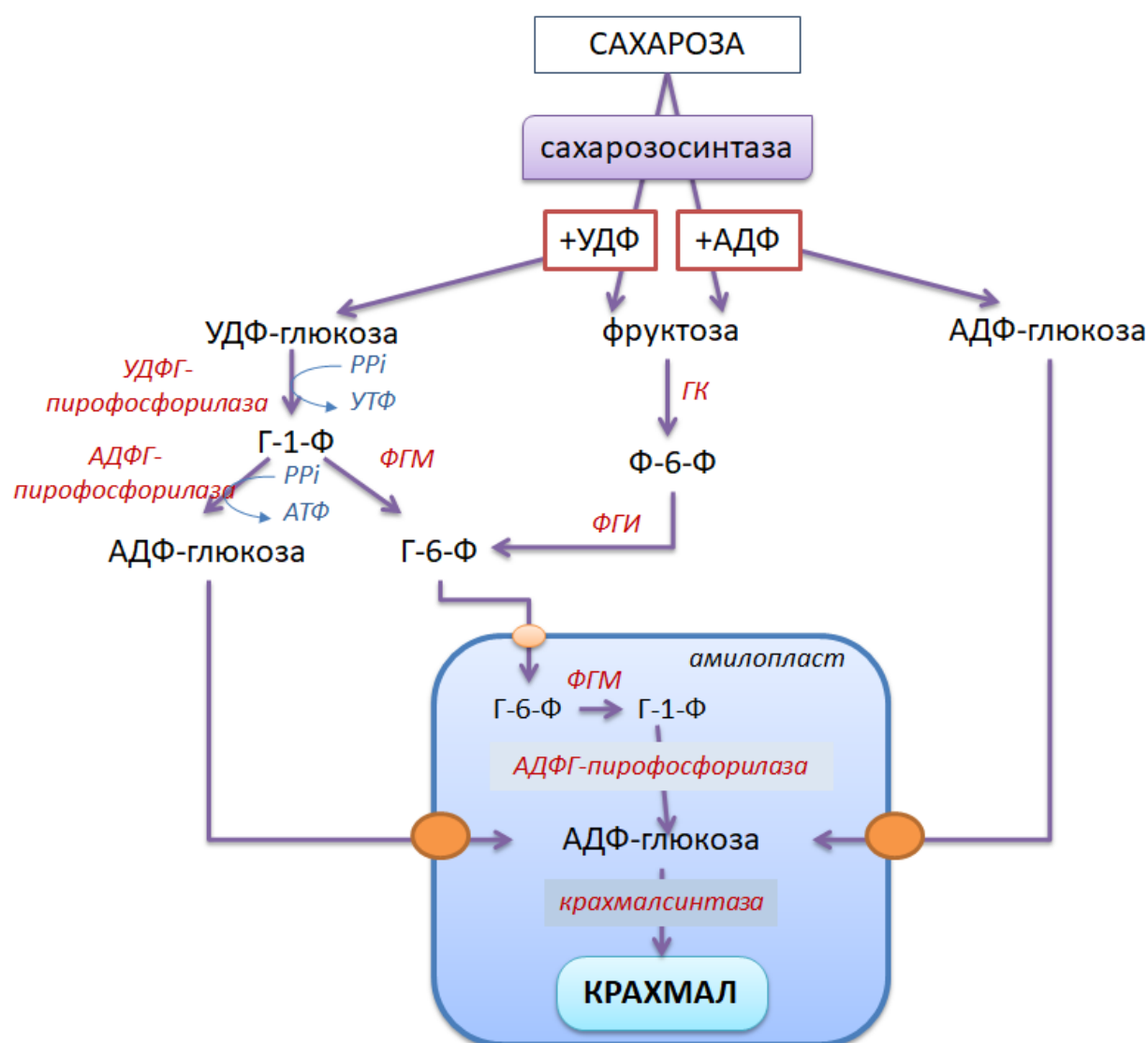


Рисунок 5. Участие сахарозосинтазы в синтезе крахмала. ГК – гексокиназа, ФГМ – фосфоглюкомутаза, ФГИ – фосфоглюкоизомераза, Ф-6-Ф – фруктозо-6-фосфат, Г-6-Ф – глюкозо-6-фосфат, Г-1-Ф – глюкозо-1-фосфат, АДФ – аденозиндифосфат, АТФ – аденозинтрифосфат, УДФ – уридиндифосфат, УТФ – уридинтрифосфат, PP_i – пиродифосфат.

Высокая активность СС при формировании ксилемы является одним из основных факторов, создающих ее акцепторную силу. Исследования, проведенные на травянистых растениях (*Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana tabacum*), показали, что сверхэкспрессия генов, кодирующих СС (*AtSuSy1-6*), приводит к повышению активности фермента в направлении распада сахарозы во всех органах трансгенных растений, по сравнению с диким типом. При этом у трансгенных растений наблюдали возрастание количества сахарозы и общего содержания растворимых сахаров, как предполагают авторы, за счет увеличения интенсивности фотосинтеза (Nguyen et al., 2016). На растениях тополя (*Populus×canadensis* Moench 'robusta') (Shrader, Sauter, 2002) было показано, что в течение вегетации максимальные значения активности СС наблюдаются в период камбиального роста. Поддержание устойчивой активной формы СС в местах быстрой разгрузки флоэмы происходит за счет блокировки второго сайта фосфорилирования (S170) белком ENOD40, для которого в тканях с высокой акцепторной силой повышается уровень экспрессии кодирующих его генов (Hardin et al., 2003; Kouchi et al., 1999; Varkonyi-Gasic, White, 2002).

Разгрузка флоэмы – процесс, исключительно важный для поддержания нормального функционирования всего растительного организма (Курсанов, 1976; Гамалей, 2004). Ослабление запроса на сахарозу со стороны ксилемы из-за снижения активности СС должно компенсироваться другими механизмами поддержания градиента концентрации дисахарида между донорными (мезофилл листа) и акцепторными (ткани ствола) тканями древесного растения. Один из таких механизмов – многократное увеличение активности апопластной инвертазы.

1.5. Апопластная инвертаза: основные функции, регуляция активности, участие в создании акцепторной силы растущих тканей

Активность Инв, как правило, связана с последующим использованием полученных гексоз в реакциях энергетического обмена и различных синтезах, протекающих с высокой скоростью в тканях с высокой потребностью в гексозах (Weber et al., 1996; Carlson, Chourey, 1999; Tang et al., 1999; Iraqi, Tremblay, 2001). Расщепление сахарозы инвертазой в основном коррелирует с ростом, развитием семян, клеточным растяжением (Weber et al., 1996; Tang et al., 1999; Iraqi and Tremblay, 2001). Благодаря этой важной роли, много работ было посвящено изучению АпИнв в культурных растениях: в моркови (Lorenz et al., 1995; Sturm et al., 1995), картофеле (Maddison et al., 1999), томатах (Klann et al., 1996; Godt, Roitsch, 1997), кукурузе (Xu et al., 1996; Cheng et al., 1999), горохе (Zhang et al., 1996), фасоли (Weber et al., 1995), сахарной свекле (Godt, Roitsch, 2006), рисе (Cho et al., 2005; Zeng et al., 1999) и пшенице (Koonjul et al., 2005). Обобщая эти исследования, можно заключить, что интенсивное инвертазное расщепление сахарозы является эффективным механизмом утилизации сахарозы во флоэме. Помимо своей основной функции в разгрузке флоэмы, АпИнв участвует в углеводном сигналинге, в ответной реакции на поранения, в формировании пыльцы и регуляции осмотического потенциала при растяжении клеток (Morris, Arthur, 1985; Benhamou et al., 1991; Wu et al., 1993; Sturm, 1999; Koch, 2004). Несмотря на большое количество исследований АпИнв, работы по изучению инвертазы клеточной стенки у древесных растений стали появляться только недавно, и они не многочисленны (Wosock et al., 2008; Iraqi et al., 2005; Canam et al., 2008; Maurel et al., 2004).

Гены, кодирующие инвертазу (*CWIN*), являются членами мультигенного семейства, и, также как и гены сахарозосинтазы, проявляются в разных органах по-разному и зависят от стадии развития растения (Lorenz et al. 1995; Sturm et al., 1995; Weber et al., 1995; Davies, Robinson, 1996; Xu et al., 1996). Было показано, что экспрессия гена растительной Инв зависит от ряда факторов, в том числе от присутствия сахаров (Roitsch et al., 1995; Xu et al., 1995), возбудителей инфекций и ранений (Sturm, Chrispeels, 1990), а также воздействия низких температур (Zhou et al., 1994). Кроме того, установлено (Kaufman et al., 1973; Zouaghi, Rollin, 1976; Morris, Arthur, 1985; Bracho, Whitaker 1990), что на активность Инв влияют гибберелловая кислота и ауксин.

При разгрузке флоэмы в акцепторных тканях сахара транспортируется к клеткам через клеточные стенки (апопластный путь) и/или через плазмодесмы (симпластный путь). Внеклеточный гидролиз сахара играет решающую роль в репродуктивном развитии растений (Goetz et al., 2001; Oliver et al., 2007; Zanor et al., 2009). В определенный момент развития репродуктивных органов апопластный путь становится основным (Patrick, Offler, 2001; Jin et al., 2009; Ruan et al., 2010). В этих случаях обычно повышается уровень экспрессии генов, кодирующих АпИньв (*CWIN*). Гексозы, высвобождаемые при метаболизации сахара АпИньв поступают в клетки через переносчики гексоз (НТ) (Zhang et al., 2006; Hayes et al., 2007). При этом, ко-экспрессия *CWIN* и *НТ* наблюдается во многих системах (Roitsch, Gonzalez, 2004), включая развитие фруктов (Hayes et al., 2007) и семян (Weber et al., 2005).

АпИньв играет важную роль в передаче сигналов сахара при развитии растений (Ruan et al., 2010). Метаболическое высвобождение гексоз с помощью АпИньв может играть регуляторную роль через сигналинг, а не через поставку питательных веществ (Cheng et al., 1999; Roitsch, Gonzalez, 2004). Серия молекулярных и физиологических исследований показала, что глюкоза, образующаяся при расщеплении АпИньв сахара, служит сигналом для стимулирования деления клеток эмбрионов *Vicia faba* на ранней стадии развития (Weber et al., 2005).

АпИньв участвует в формировании в растении ответной реакции на воздействие патогенов (Herbers et al. 1996; Essmann et al., 2008; Keunen et al., 2013). На трансгенных растениях тополя со сверхэкспрессией АпИньв было показано, что при симпластной загрузке флоэмы инвертата клеточной стенки также является частью защитного ответа растения на воздействие внешних факторов, как и у растений с апопластной загрузкой флоэмы (Zhang et al., 2014). Предположительно, некоторая утечка сахара из флоэмы в апопласт протекает у всех растений. У трансгенных растений тополя (сверхэкспрессия АпИньв) этот выход сахара сопровождается незначительной положительной регуляцией *PR* генов и незначительным отложением каллозы в жилках листа, оставляя при этом симпластную загрузку без изменений. Несмотря на то, что растения кажутся нормальными, они расположены на краю гиперчувствительного отклика и могут быть подвергнуты воздействию внешнего фактора, такого как внезапное воздействие высокой температуры (Zhang et al., 2014).

Вследствие того, что растительные инвертазы кодируются мультигенным семейством, члены которого могут по-разному реагировать на различные факторы, процесс контроля метаболизма, запасания и транспорта сахарозы является очень гибким (Tymowska-Lalanne; Kreis, 1998)

Более тонкая регуляция активности АпИнв и ВакИнв осуществляется на посттрансляционном уровне через белковые ингибиторы, известные как ингибитор клеточной стенки (CIF) и вакуолярный ингибитор (VIF), или в совокупности как C/VIF (Rausch, Greiner, 2004). Хотя CIF являются ингибиторами инвертазы клеточной стенки, они широко активны как для АпИнв, так и для ВакИнв, напротив, ингибирование VIF специфично для вакуолярных инвертаз (Восock et al., 2008; Ruan, 2014; Wang et al., 2014).

C/VIF представляют собой небольшие белки с молекулярными массами в диапазоне от 15 до 23 кДа и характеризуются четырьмя консервативными остатками цистеина. Исследования на *Arabidopsis* показали, что CIF взаимодействует с АпИнв только при определенных значениях pH (оптимальный pH 4.5). На растениях томата было показано, что значительная часть активности АпИнв *in vivo* ограничена его белковым ингибитором CIF, и что удаление этого торможения задерживает старение листьев и улучшает образование плодов и семян (Ruan, 2014). Появление избытка сахарозы в апопласте снижает уровень экспрессии генов *CIF*, приводя к возрастанию активности АпИнв

Таким образом, несмотря на большое количество работ, посвященных исследованию функций разных форм Инв и СС и путям их регуляции, слабо изученным остается участие этих ферментов метаболизации сахарозы в процессах ксилогенеза. Вместе с тем, изучение соотношения активности этих ферментов может быть индикатором разных сценарий ксилогенеза. С одной стороны, СС и Инв участвуют в создании концентрационного градиента сахарозы в месте разгрузки флоэмы, необходимого для поддержания транспорта ассимилятов в камбиальную зону. С другой стороны, соотношение активностей этих ферментов определяет включение расщепляемой ими сахарозы в различные метаболические пути и, как следствие, может определять направление дифференциации камбиальных элементов, соотношение объема тканей флоэмы и ксилемы и интенсивность протекающих в них ростовых процессов.

1.6. Системы регуляции сахарозного статуса растений

Сахара, такие как глюкоза, фруктоза и сахароза играют центральную роль в обмене веществ, а также являются сигнальными молекулами в растениях (Koch, 1996; Smeekens, 1998; Sheen et al., 1999; Yu, 1999; Gibson, 2000, 2004; Koch, 2004; Rolland et al., 2006; Bolouri-Moghaddam et al., 2010; Moghaddam, Ende, 2012). В ответ на изменения в количестве и/или потоке глюкозы и сахарозы у растений регулируется множество разнообразных путей развития, физиологических и метаболических процессов (Graham, 1996; Koch, 1996; Smeekens, 1998, 2000; Wobus, Weber, 1999; Yu, 1999; Gibson, 2000, 2004; Pego et al., 2000; Rolland et al., 2002; Rook, Bevan, 2003).

Сигнализация сахаров имеет большое значение в ответах растений на биотические и абиотические стрессы. Сахара играют решающую роль во взаимодействии хозяин-патоген (Morkunas et al., 2005), активируют различные гены, среди которых *CWIN*, а также гены, кодирующие PR белки (Roitsch et al., 2003; Moghaddam, Ende, 2012).

Наличие питательных веществ играет важную роль в контроле клеточного цикла растений (Meijer, Murray, 2000; Riou-Khamlichi et al., 2000; Halford, Dickinson, 2001; Gibson, 2004). На эмбриональном этапе развития сахароза и глюкоза могут регулировать переход от роста к делению клеток, к росту клеток растяжением и накоплению запасных веществ (Wobus, Weber, 1999; Borisjuk et al., 2003). Недифференцированные, митотически активные ткани семядолей развивающихся конских бобов содержат высокие уровни глюкозы, в то время как наиболее дифференцированные ткани содержат низкие уровни глюкозы, из чего следует, что градиент глюкозы может оказывать морфогенный эффект (Borisjuk et al., 1998). При этом глюкоза и сахароза играют разные роли во время эмбриогенеза. Самые высокие уровни сахарозы находятся в наиболее активно растущих клетках, а также связаны с повышенным накоплением крахмала. Эти результаты показывают, что высокие концентрации сахарозы играют важную роль в стимуляции дифференцировки клеток запасаения (Borisjuk et al., 2002).

Влияние сахаров на рост и развитие растений разнообразны (Lastdrager et al., 2014). В ответ на изменение уровня сахара реагируют уровни транскрипции тысяч генов (Price et al., 2004; Blasing et al., 2005; Osuna et al., 2007; Usadel et al., 2008). Рост растений включает увеличение объема клеток, деление клеток и программы развития, которые

определяют тканевую и органную идентичность. Молекулярные сети, способствующие делению клеток и их растяжению, в значительной степени зависят от наличия углеводов для обеспечения энергией и биомассой. Циклины являются важными регуляторами клеточного цикла и способствуют генерации новых клеток. Сахара индуцируют экспрессию циклинов CYCD2 и CYCD3, способствуя тем самым развитию клеточного цикла (Riou-Khamlichi et al., 2000). Переход в фазу растяжения клеток инициируется инактивацией циклина и циклинзависимых киназ (CDK) (Komaki, Sugimoto, 2012).

Уровни сахаров регулируются как временным фактором, так и пространственно (Lastdrager et al., 2014). Ферменты, метаболизирующие сахарозу, и переносчики сахаров имеют важное значение для регулирования роста и развития растений, например, при переходе от вегетативной фазы к генеративной (Rolland et al., 2006). Пространственная и временная экспрессии переносчиков сахарозы и ферментов, участвующих в гидролизе сахарозы, контролируют внутриклеточное распределение различных сахаров и метаболитов, полученных из них, влияя тем самым на рост (Tiessen, Padilla-Chacon, 2013). Растительные белки SWEET облегчают транспортировку нейтральных сахаров, таких как сахароза, глюкоза и фруктоза, как на организменном, так и на клеточном уровнях (Chen et al., 2012; Klemens et al., 2013; Yuan, Wang, 2013). Важность пространственной и временной регуляции накопления сахаров проявляется в меристематических тканях с их многообразной организацией и различными типами клеток, что требует сложного процесса распределения сахаров для выбора направления развития (Francis, Halford, 2006). Различные сахара могут по-разному регулировать физиологические процессы, а этап развития растения дополнительно определяет реакцию организма на сахара (Rolland et al., 2006; Eveland, Jackson, 2012; Tognetti et al., 2013). Имеющиеся данные свидетельствуют о том, что некоторые процессы могут быть опосредованы абсолютным уровнем конкретного сахара, таким как глюкоза (Borisjuk et al., 1998) или сахароза (Borisjuk et al., 2002), в то время как другие процессы могут быть опосредованы потоком конкретного сахара (Krapp et al., 1993).

К компонентам сахарозного сигналинга растений относятся гексокиназы (HK) (Hohmann et al., 1999; Xiao et al., 2000; Gibson, 2004; Rolland et al., 2006; Balasubramanian et al., 2007; Wang, Ruan, 2013; Wang et al., 2017). Выяснение роли HK в глюкозном

сигналинге осложняется тем, что они еще участвуют в ее фосфорилировании (Gibson, 2004).

Wang et al. (2006) предположили, что глюкозный сигналинг в растениях может рассматриваться с точки зрения (1) индукции роста, связанной с пролиферацией клеток, а также (2) контроля энергетического углеродного гомеостаза. В растениях НК кодируются довольно большим семейством генов (Claeysen, Rivoal, 2007), белки НК встречаются в цитозоле, митохондриях, пластидах, ядре и аппарате Гольджи (Miernyk, Dennis, 1983; Schnarrenberger, 1990; da-Silva et al., 2001; Yanasigawa et al., 2003; Balasubramanian et al., 2007).

НК-зависимый глюкозный сигналинг включает не только транскрипционный контроль, но также трансляционные и посттрансляционные процессы (Ho et al., 2001; Yanasigawa et al., 2003; Balasubramanian et al., 2007).

К механизмам, регулирующим отношение между сахарозным статусом и ростом и развитием растения, относятся SnRKs и TOR сигнальные пути (Halford et al., 2003; Rolland et al., 2006; Nunes et al., 2013; Lastdrager et al., 2014; Tome et al., 2014; Margalha et al., 2016 и др.). SnRK1 (sucrose non-fermenting-1-related protein kinase 1) – протеин киназа, играющая ключевую роль в глобальном контроле метаболизма углерода в растении. SnRK1 активна в условиях низкого энергетического статуса клетки и служит, главным образом, для подавления процессов биосинтеза и роста растений (Ваена-Gonzalez et al., 2007; Polge, Thomas, 2007; Halford, Hey, 2009; Ваена-Gonzalez, 2010; Ghillebert et al., 2011; Robaglia et al., 2012). Как правило, активность SnRK1 возрастает в ответ на повышение внутриклеточной сахарозы и/или понижение внутриклеточной глюкозы (Halford et al., 2003). Активность SnRK1 подавляется глюкозо-6-фосфатом и глюкозо-1-фосфатом, а также треглозо-6-фосфатом (Zhang et al., 2009; O'Hara et al., 2012; Nunes et al., 2013; Lastdrager et al., 2014).

Обобщая литературные данные можно выделить основные пути сахарозного сигналинга в растении (рис. 6). Сахароза может поступать в клетку по апопластному и симпластному пути. В первом случае апопластная сахароза может быть (1) гидролизована АПИнв до гексоз, которые с участием гексозных (Glc) транспортеров попадают в клетку, и/или (2) транспортирована в клетку через переносчики сахарозы

(Suc) (рис. 6). Апопластная глюкоза может быть распознана RGS1, который передает внеклеточный сигнал в клетку через G-белки (рис. 6).

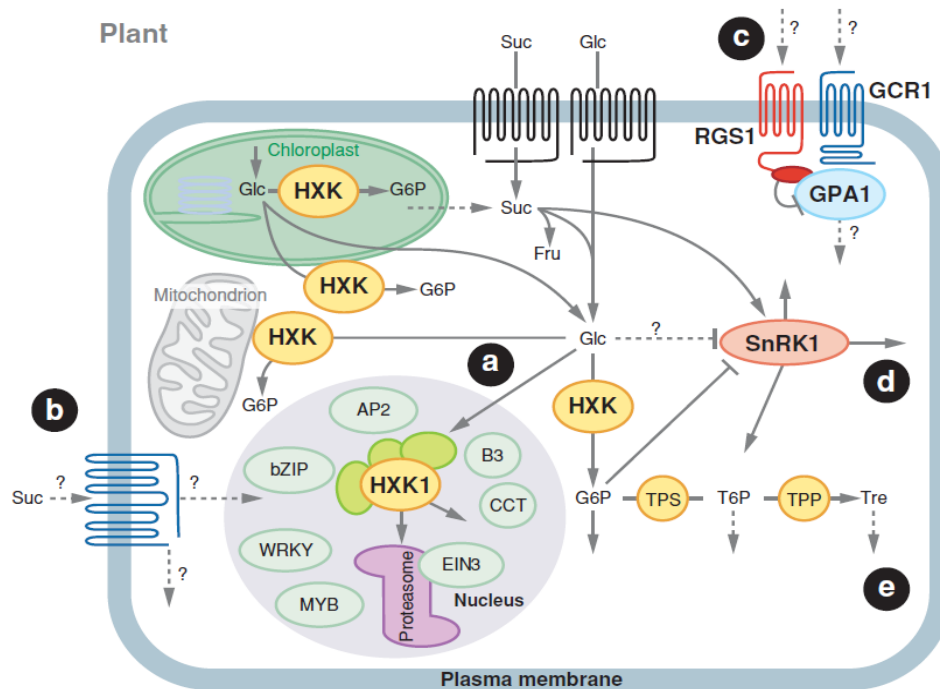


Рисунок 6. Модель механизмов сахарозного сигналинга в растении (по Rolland et al., 2006). Буквами (a-d) отмечены предполагаемые пути гексозного сигналинга, пояснения в тексте.

В цитоплазме сахара может быть метаболизирована ЦитИнв или СС. При высокой концентрации сахара в клетке СС переходит в связанное с цитоплазматической мембраной состояние и входит в состав целлюлозосинтазного комплекса. В результате, образуемая при расщеплении сахара УДФ-глюкоза, сразу поставляется на синтез целлюлозы/каллозы. Также, из цитоплазмы сахара может поступать в ядро, вакуоль, пластиды или митохондрии. В вакуоли молекула сахара метаболизируется ВаКИнв до двух молекул гексоз, что удваивает осмотический вклад сахаров, влияющий на клеточный тургор. В ядре сахара, а также образуемая при ее расщеплении глюкоза, могут регулировать некоторые транскрипционные факторы (Rolland et al., 2006; Wang, Ruan, 2013).

Образующиеся при расщеплении сахара инвертазами гексозы через гексозный сигналинг могут в свою очередь влиять на экспрессию генов (Rolland et al., 2006; Wang, Ruan, 2013). К элементам гексозного сигналинга относятся (рис. 6):

(a) Сенсор глюкозы гексокиназа 1 (НХК1) в основном связан с митохондриями. Кроме того, НХК1 обнаружена в высокомолекулярных комплексах в ядре, где она контролирует транскрипцию и опосредованную протеасомой деградацию. Другие белки НХК связаны с наружной мембраной пластид, присутствуют в цитозоле и в строме хлоропластов.

(b) Сахароза ощущается на плазматической мембране гомологами транспортера (Suc). Транспортеры моносахаридов (Glc) могут иметь аналогичные функции, такие как мембранные сенсоры.

(c) Передача рецептора G-белка с помощью RGS1 и GPA1 связана с контролем глюкозы, это путь, независимый от гексокиназы.

(d) Белки SnRK1 играют важную роль в сахарозном и глюкозном сигналинге.

(e) Регуляторный эффект для трегалозы (Tre) и трегалозо-6-фосфата (Т6Р), вероятно, располагается ниже SnRK1.

1.7. Азотные соединения как возможные экзогенные регуляторы ксилогенеза

Помимо сахаров для нормального роста растения и увеличения его продуктивности необходимы азотные соединения, которые в свою очередь индуцируют путь ассимиляции азота в растении и могут перепрограммировать углеродный метаболизм в направлении создания более благоприятных условий для этой ассимиляции (Чиков и др., 1998; Баташева, 2006; Crawford, 1995, 2006; Lam et al., 1996; Campbell, 1999; Stitt, 1999; Wang et al., 2000; Chikov et al., 2001, 2003; Chikov, Bakirova, 2004 и др.).

В период активных ростовых процессов у сеянцев карельской березы, по сравнению с обычной березой повислой, в коре и древесине выше содержание цитруллина (транспортной формы аммонийного азота), а в листьях больше глутаминовой, аспарагиновой кислот и глутамина (Шуляковская и др., 2011). Подкормки разными дозами азота 2-3-летних сеянцев обычной березы повислой и карельской березы привели к существенному увеличению содержания белкового азота во всех органах и тканях только у карельской березы, тогда как количество свободных аминокислот возросло в листьях и в коре у обеих форм, но у карельской березы в большей степени (Шуляковская и др., 2010а, б).

При усиленной подкормке растений азотными удобрениями избыточное поступление нитрат-ионов в апопласт первоначально тормозит транспорт ассимилятов по флоэме, что приводит к выходу и накоплению сахарозы в апопласте, повышая активность АПИ_{нв}. Образующиеся при гидролизе сахарозы гексозы не способны загружаться во флоэму и вынуждены возвращаться в клетки мезофилла листа. Поступление гексоз в клетку ингибирует ассимиляцию CO₂, что в свою очередь проявляется в снижении фотосинтеза (Chikov et al., 2001, 2003; Chikov, Bakirova, 2004; Баташева, 2006). Снижение загрузки сахарозы во флоэму, вероятно, связано с увеличением количества каллозы в ситовидных элементах, стимуляция синтеза которой может осуществляться продуктами неполного восстановления нитрата при участии NO сигнальной системы (Баташева и др., 2010; Хамидуллина и др., 2011). Роль нитратредуктазы в образовании оксида азота (NO), который является компонентом сигнальной системы растения, неоднократно обсуждалась в литературе (Dean, Harper, 1988; Yamasaki, Sakihama, 2000).

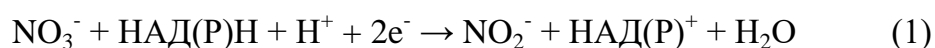
Повышенное азотное питание растений усиливает неуглеводную направленность фотосинтеза, при этом возрастает включение ^{14}C из $^{14}\text{CO}_2$ в продукты гликолатного пути, тормозится отток ассимилятов из листьев (Тарчевский и др., 1973; Чиков, 1987). Эти изменения, в основном, связаны с действием нитратного азота (Chikov, Bakirova, 1999). Включение в метаболизм нитрата регулируется фотосинтезом и интенсивно протекает только в световой период, а поглощаемый ночью в незначительных количествах нитрат используется почти исключительно на пополнение его свободного пула в листе (Matt et al., 2001).

На растениях гороха посевного было показано, что экзогенные соединения азота (соли нитрата и аммония) повышали активность СС в корнях, по сравнению с таковой у растений, росших на безазотной среде (Брускова и др., 2009; Никитин и др., 2010). Причем этот эффект проявляется только при достаточной освещенности, при низкой освещенности (2,5 клк в течение 16-часового фотопериода) положительный эффект нитрата на активность СС не наблюдался (Брускова и др., 2009).

Индущирующее действие нитратного аниона на экспрессию ряда генов азотного и углеродного обменов неоднократно описывается в литературе (Crawford, 1995; Lam et al., 1996; Campbell, 1999; Stitt, 1999). Метаболические процессы, стимулирующиеся нитратом, включают: поступление и восстановление нитрата, ассимиляцию аммония, синтез органических кислот, восстановление ферредоксина и окисление глюкозофосфата в пентозофосфатном пути (ПФП). Нитрат также подавляет синтез крахмала, помогая мобилизовать углерод в органические кислоты (Wang et al., 2000). На растениях *Arabidopsis* были изучены гены, чувствительные к нитратам, как при низких (250 мкМ), так и при высоких (от 5 до 10 мМ) концентрациях. Было выявлено более 40 нитратиндуцированных генов. Среди них гены, кодирующие (1) регуляторные белки, в том числе фактор транскрипции MYB, кальциевые антипортеры и предполагаемые протеинкиназы; (2) метаболические ферменты, в том числе трансальдолазы и транскетолазы ПФП, малатдегидрогеназы, аспарагинсинтетазы и гистидиндекарбоксилазы; и (3) белки с неизвестными функциями, в том числе метилтрансферазы. Первичный пример индукции, наблюдаемый для многих из этих генов, – это кратковременное повышение мРНК при низкой концентрации нитрата и устойчивый рост при обработке высокой концентрацией нитрата (Wang et al., 2000).

Растения могут накапливать нитрат в высоких концентрациях, и ион нитрата распределен в структурах клетки, тканях и органах растения неравномерно (Измайлов, 1986). В растении выделяют несколько пулов нитратов. Это вакуолярный (запасной), цитоплазматический (метаболический) (Jackson, 1978; Beevers, Hageman, 1980) и подвижный (эндогенный) (Харитоновшвили и др., 1993; Алехина и др., 1988; Харитоновшвили и др., 1997; Алехина и др., 2000) пулы нитратов. Нитрат большого вакуолярного пула малодоступен для восстановления, он формируется в зависимости от концентрации аниона в питательной смеси и в среднем составляет 85% от общего количества NO_3^- в тканях. Вакуолярный нитрат рассматривается как резерв азота, который растение использует при дефиците этого элемента в среде (Харитоновшвили и др., 1993). Размер цитоплазматического пула запрограммирован, и его величина остается одинаковой у проростков пшеницы с разным содержанием нитрата в тканях. Нитратредуктаза, локализованная в цитоплазме, в качестве субстрата использует NO_3^- цитоплазматического пула (Jackson, 1978; Beevers, Hageman, 1980). Эндогенный (подвижный) нитрат перемещается в радиальном и вертикальном направлениях и предназначен для оттока из корней в побеги (Алехина и др., 1988; Харитоновшвили и др., 1993; Alekhina et al., 2000).

Поглощенные нитраты могут включаться в метаболизм растений только после восстановления их до аммиака. Первым ферментом цепи восстановления нитратов является нитратредуктаза (NR, EC 1.7.1.2). Нитратредуктаза катализирует перенос двух электронов от восстановленных НАД(Ф)Н к нитрату с образованием нитрита:



Первичный продукт нитратной редукции – нитриты являются потенциально токсичными веществами для растительной клетки (Klimenko et al., 2006). Нитриты транспортируются в хлоропласты, где восстанавливаются нитритредуктазой (NiR, EC 1.7.1.4) до аммония.



Считается, что реакция (1) является лимитирующим шагом в цепи ассимиляции азота в растении (Campbell, 1999), поэтому NR рассматривают как ключевой фермент в азотном метаболизме (Huber et al., 1996a; Kaiser et al., 1999; Stitt, 1999). Нитратредуктаза регулируется на различных уровнях. Первый уровень – это экспрессия

соответствующих генов, что позволяет регулировать уровень нитратредуктазного белка в клетке. Второй уровень – это посттрансляционная регуляция активности нитратредуктазы за счёт обратимого фосфорилирования, которая позволяет очень быстро изменять активность фермента в клетке (Kaiser et al., 1999). Нитратредуктаза – субстратиндуцируемый фермент, т.е. ее активность в органах растений зависит от наличия нитратов. Экспрессия генов нитратредуктазы контролируется наряду с нитратами и другими факторами, такими как свет, сахара и др. (Cheng et al., 1992; Foyer et al., 1994; Kandlbinder et al., 2000; Klimenko et al., 2006).

У древесных растений первоначальное поступление нитратов в корни происходит через плазматическую мембрану эпидермальных и кортикальных клеток. Последующий транспорт к побегам может происходить с ксилемным соком. Восстановление нитратов возможно в корнях, а также в наземных органах. Многие травянистые растения восстанавливают нитраты преимущественно в листьях. Долгое время считалось, что древесные растения (деревья и кустарники) восстанавливают нитраты почти исключительно в корнях. Однако, более поздние исследования показали присутствие нитратов в побегах и локализацию нитратредуктазной активности в листьях у различных деревьев (Gebauer, Stadler, 1990).

Изучение нитрат- и нитритредуктазы в листьях и корнях сеянцев *Betula pendula* Roth выявило разное влияние нитратного обеспечения и света на эти ферменты. Так, в сеянцах, выросших на среде, содержащей в качестве источника азота соли аммония, наблюдали низкий уровень экспрессии генов NR и NiR в листьях и NR в корнях, в то время как экспрессия генов NiR в корнях была высокой. После переноса сеянцев на нитратсодержащую среду существенно возросли пулы мРНК и активности обоих ферментов, как в листьях, так и в корнях, с преобладанием в листьях. При этом во всех случаях увеличение количества мРНК предшествовало возрастанию активности ферментов, из чего следовало, что увеличение активности ферментов связано в основном с увеличением уровня экспрессии генов NR и NiR (Friemann et al., 1991, 1992a, 1992b).

Поскольку растения ведут прикрепленный образ жизни, для них особенно актуально наличие определенных механизмов, позволяющим им приспосабливаться к доступности минеральных питательных веществ в окружающей среде. В последнее

время все больше появляется данных, показывающие как сигналы азота контролируют гормональный статус растений и как гормональные сигналы взаимодействуют с азотным питанием (Krouk et al., 2011).

Азот вообще и NO_3^- , в частности, оказывают влияние на синтез, транспорт и сигнализацию гормонов, регулируя тем самым развитие растений (Krouk et al., 2011). На растениях сои (*Glycine max*) (Caba et al., 2000), пшеницы (*Triticum aestivum*) (Chen et al., 1998), ананаса (*Ananas comosus*) (Tamaki, Mercier, 2007), кукурузы (*Zea mays*) (Liu et al., 2010) и *Arabidopsis thaliana* (Krouk et al., 2010; Walch-Liu et al., 2006) показано, что в ответ на снижение поступления нитратов увеличивается содержание ауксина, который поступает из побега в корень. При этом на гормональный статус растения влияют транспортеры нитратов (NRT1.1 и NRT2.1). При снижении концентрации нитратов в среде ниже 0.2 мМ, белок NRT1.1 ведет себя как носитель ауксина (Krouk et al., 2010).

Содержание цитокинина также находится под контролем азотного питания (Sakakibara et al., 2006; Kiba et al., 2011). Если растения томатов (*Solanum lycopersicum*) выращивать на среде с NH_4^+ в качестве единственного источника азота, то рост побегов сильно снижается. При этом, для восстановления роста побегов даже 10 мкМ нитрат является достаточным (Rahayu et al., 2005).

Недавние исследования также показали, что в растениях, переносимых с низкой (0.1 мМ) в высокую (10 мМ) NO_3^- -содержащую среду, образование этилена усиливается в течение одного часа после переноса (Tian et al., 2009).

С другой стороны через гормональные сигнальные пути может регулироваться транспорт и включение в метаболические пути нитратов (Krouk et al., 2011). Показано, что цитокинины играют важную роль в реакции растений на нитраты (Werner, Schmülling, 2009; Ruffel et al., 2011), они могут регулировать размер листьев и развитие боковых корней (Rahayu et al., 2005; Walch-Liu et al., 2000; Müller et al. 2015). Ауксины и цитокинины приводят к увеличению нитратредуктазной активности (Lu et al., 1992; Suty et al., 1993; Vuylsteker et al., 1997a, b; Brenner et al., 2005). Два основных транспортера нитратов NRT1.1 и NRT2.1 находятся под контролем гормонов. Промоторная активность *NRT1.1* индуцируется экзогенным и эндогенным увеличением ауксина, причем эта индукция не зависит от присутствия нитратов в среде культивирования (Guo

et al., 2002). Уровень транскриптов мРНК гена *NRT2.1* сильно снижается в течение нескольких часов после воздействия ауксина и цитокинина (Gan et al., 2005).

Используя апикальную меристему *Arabidopsis* в качестве модельной системы, было показано, что растения могут адаптировать свой уровень органогенеза к изменениям в доступности нитратов в почве в течение нескольких дней благодаря передаче сигналов дальнего действия с помощью прекурсоров цитокинина, которые проходят через растение, превращаются в активные гормоны в меристеме побегов и модулируют экспрессию *WUSCHEL* – ключевого регулятора гомеостаза стволовых клеток. Этот механизм позволяет меристемам в течение нескольких дней адаптироваться к быстрым изменениям концентрации нитратов и тем самым изменять скорость образования органов (Landrein et al., 2018).

Таким образом, в основе процесса адаптации растений недостатку минеральных веществ лежат дифференциальный рост и развитие. С одной стороны, обеспечение питательными веществами способствует росту растения, а с другой стороны, рост порождает сигналы «запроса» на питательные вещества. Интеграция роста и питания растения опосредованна специализированными сигнальными путями, включающими, в том числе и гормоны.

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Растительный материал

Основными объектами исследования были две формы березы повислой разного возраста: обычная береза повислая (далее обычная береза) – *Betula pendula* Roth var. *pendula* и карельская береза – *B. pendula* var. *carelica* (Mercl.) Hämet-Ahti. В некоторых случаях, наряду с ними, исследовали березу пушистую, *B. pubescence* Ehrh., для получения сравнительной межвидовой характеристики.

40-45-летние деревья B. pendula var. pendula и B. pendula var. carelica

Деревья обычной березы имели типичную для вида прямослойную древесину со слабо выраженной текстурой. Среди деревьев карельской березы подбирали экземпляры с высокой степенью узорчатости древесины ствола (внешний вид окоренной поверхности ствола представлены на фотографиях в разделах 3.2 и 4.3.2). Все опытные растения произрастали в одинаковых почвенно-климатических условиях на Биологической станции Карельского научного центра РАН в 2 км от Петрозаводска. Отбор образцов проводили в 2010 и 2016 гг. Ткани препарировали в утреннее время (с 9:00 до 11:00), для отборов подбирали дни без осадков.

У березы повислой в условиях Карелии активное функционирование камбия наблюдается начиная со второй декады июня до первой декады августа (Новицкая, 2008). В это время основная масса ассимилятов тратится на новообразование клеток камбиальной зоны и рост клеточной стенки. В 2010 г. отбор образцов проводили в июне (21.06) и июле (19.07). В этот вегетационный сезон в связи с отсутствием дождей и высокими температурами в июле имело место преждевременное торможение деятельности камбия.

В 2016 г. исследования проводили при разных физиологических состояниях дерева. Даты отбора были приурочены к протеканию различных фенофаз (период покоя, выход из состояния покоя, сокодвигание, рост листовой пластинки, камбиальный рост, отток метаболитов в ствол, подготовка к покою).

На 40-45-летних растениях в тканях ствола изучали годичную динамику содержания сахаров, крахмала и активности ВаКИнв, ЦитИнв, АпИнв, СС,

неспецифической гексокиназы (ГК); в период камбиального роста уровень экспрессии генов, кодирующих пептид CLE-41 (*CLE41*) и его рецептор (*PXY*).

6-летние растения B. pendula var. pendula и B. pendula var. carelica с разной степенью узорчатости древесины ствола

Все растения произрастали в одинаковых почвенно-климатических условиях на Биологической станции Карельского научного центра РАН. Растения карельской березы были разделены на группы по степени проявления узорчатости древесины, согласно способу, предложенному В.И. Ермаковым (1986). Метод основан на корреляции между количеством углублений на обнаженной поверхности древесины и степенью ее узорчатости. На стволе дерева вырезали участок коры 2х4 см с более длинной стороной вдоль ствола. На обнаженной поверхности древесины подсчитывали число углублений, затем делали их пересчет на 1 см². К первой группе отнесли растения, имеющие 1-3 углубления на 1 см² (редкий рисунок – 1 балл), во вторую группу попали растения с 4-6 углублениям на 1 см² (плотный рисунок – 2 балла) и в третьей группе были растения с 7 и более углублениями на 1 см² (очень плотный рисунок – 3 балла). Для сравнения использовали растения обычной березы (прямослойная древесина – 0 баллов) (внешний вид окоренной поверхности ствола представлен на фотографиях в разделе 3.4.1). В период камбиального роста на 6-летних растениях исследовали фотосинтетическую активность листьев, содержания сахаров, крахмала, активности ферментов АПИИВ и СС в листьях, флоэме, ксилеме и корнях.

На 6-летних растениях обычной березы и карельской березы с высокой степенью узорчатости древесины (3 балла по шкале В.И. Ермакова) изучали влияние экзогенного нитрата на метаболизацию сахарозы в тканях ствола. Эксперимент проводили в период активного камбиального роста (2-4 июля 2012 года). Растения разделили на две группы: (1) опытные, подвергшиеся обработке нитратом калия (KNO₃), и (2) контрольные, без внесения нитратов. Под опытные растения вносили по 20 л 50 мМ раствора KNO₃, под контрольные деревья добавляли по 20 л воды. Опытная концентрация KNO₃ была взята на основании данных литературы: под травянистые растения вносили растворы нитрата калия в концентрации 10 мМ (Gordon et al., 2002) и 50 мМ (Batasheva et al., 2007), под виноград – 36 мМ (Barbier et al., 2005), под шестинедельные сеянцы березы – 10 мМ

(Friemann, 1992b); влияние нитратов на ген нитратредуктазы, выделенный из березы повислой, изучали при воздействии 50 мМ KNO_3 (Nachtel, Strater, 2000).

Схема эксперимента: 2 июля – внесение раствора KNO_3 под опытные растения и воды под контрольные растения; 3 июля – отбор контрольных растений; 4 июля – отбор опытных растений.

10 и 11-летние растения V. pendula var. pendula и V. pendula var. carelica с разной степенью узорчатости древесины ствола

Объектами исследования были 10 и 11-летние деревья обычной березы повислой и карельской березы. Посадки созданы на Биологической станции Карельского научного центра РАН. Растения выращены из семян, полученных от контролируемого опыления (Forelia OY, Финляндия). Семена карельской березы получены от родительских деревьев с ярко выраженными признаками узорчатости древесины.

Известно, что 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; Ветчинникова, 2005; и др.). Среди опытных деревьев карельской березы подбирали экземпляры с высокой степенью узорчатости древесины (далее в тексте – узорчатые растения) и растения, у которых признаки аномального строения древесины отсутствовали (далее в тексте – безузорчатые растения). Отбор образцов проводили в период активного функционирования камбия (конец июня – начало июля 2015-2016 гг).

Образцы для анализа отбирали с: (1) деревьев обычной березы, (2) безузорчатых деревьев карельской березы, (3) безузорчатой части ствола узорчатых деревьев карельской березы, (4) узорчатой части ствола тех же деревьев (внешний вид окоренной поверхности ствола представлен на фотографиях в разделах 3.4.3 (10-летние растения) и 4.1.1 (11-летние растения)).

На 10 и 11-летних растениях изучали содержания сахаров, крахмала и целлюлозы, активности АпИнв и СС, уровень экспрессии генов, кодирующих СС (*Sus1*, *Sus2*, *Sus3*), АпИнв (*CWIN1*, *CWIN1.1*, *CWIN4*), белковый ингибитор АпИнв (*CIF*), целлюлозосинтазу (*Ces8*, *Ces7*, *Ces3*), пептид CLE-41 (*CLE41*) и его рецептор (*PXY*).

25-летние растения V. pendula var. carelica с разной степенью узорчатости древесины ствола

Растения карельской березы с узорчатой и безузорчатой структурой древесины, произрастают в лесных культурах и лесосеменных плантациях на территории Республики Карелия на разных по плодородию почвах. Возраст деревьев на момент отбора материала составлял 25 лет. Все растения были выращены из семян, полученных из семян от контролируемого опыления плюсовых деревьев карельской березы. Растения карельской березы были разделены на группы по степени проявления узорчатости древесины согласно способу, предложенному В.И. Ермаковым (1986). 0 баллов – безузорчатые растения и 1-3 балла узорчатые растения (внешний вид окоренной поверхности ствола представлен на фотографиях в разделе 3.4.2). Отбор образцов проводили в период активного камбиального роста (конец июня – начало июля 2016-2017 гг).

На 25-летних растения карельской березы изучали содержание сахаров, крахмала и целлюлозы, активности АpИнв, СС, ГК и нитратредуктазы (НР), уровень 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*, 2) и сахарозы (*Suc*) в камбиальной зоне. На этих растениях изучали влияние плодородия почвы на соотношение апопластного и сахарозосинтазного пути метаболизации сахарозы в камбиальной зоне.

2-4 летние сеянцы из семян V. pendula var. pendula и V. pendula var. carelica

2-летние растения. Объектами исследования были сеянцы обычной березы повислой, карельской березы и березы пушистой (*B. pubescence* Ehrh). Последние использовали для сравнительной межвидовой характеристики. Растения были выращены из семян, полученных в результате контролируемого опыления (Финляндия), и произрастали в одинаковых почвенно-климатических условиях на Биологической станции Карельского научного центра РАН. У 2-летних растений карельской березы еще не выражены признаки узорчатости древесины. Во все даты отбора на биохимический анализ брали по 10-15 растений каждой формы березы повислой и

березы пушистой. На 2-летних сеянцах обычной и карельской березы в течение вегетационного сезона изучали содержание сахаров и крахмала.

4-летние растения. Изучение зависимости между содержанием растворимых сахаров и активностью ферментов метаболизации сахарозы проводили на двух формах 4-х летних растений березы повислой (*Betula pendula* Roth): обычной березы повислой (*B. pendula* var. *pendula*) и карельской березы (*B. pendula* var. *carelica*). Растения были выращены из семян (Финляндия), полученных в результате контролируемого опыления деревьев березы повислой (растения *B. pendula* var. *pendula*) и карельской березы с ярко выраженными признаками узорчатости (растения *B. pendula* var. *carelica*), в одинаковых почвенно-климатических условиях на Биологической станции Карельского научного центра РАН. Отбор образцов проводили в начале вегетации (май, 2009), в период активного роста (июль, 2009) и в период подготовки растения к состоянию покоя (октябрь, 2009).

Сеянцы 2-17-недельные сеянцы

Исследование проводили на сеянцах (2-, 5-, 6-, 7-, 8-, 10-, 17-недельных), выращенных из семян обычной березы повислой (*B. pendula* var. *pendula*) и карельской березы (*B. pendula* var. *carelica*). Растения выращены из семян, полученных от контролируемого опыления (Forelia OY, Финляндия). Семена карельской березы получены от родительских деревьев с ярко выраженными признаками узорчатости древесины. 2-недельные сеянцы выращивали на питательном растворе. 5-17-недельные сеянцы выращивали в камере при температуре 23°C, 16-часовом фотопериоде, освещенности 8 клк на питательном грунте Terra Vita следующего состава: N – 0.91%, P – 0.2%, K – 0.094%.

На 2-17-недельных сеянцах обычной и карельской березы исследовали активность ВаКИнв, ЦитИнв, АпИнв, СС, уровень экспрессии генов *Sus1*, *Sus2*, *CWIN1*, *CIF*, *CLE41*, *PXY*.

Экспериментальные подходы

Для изучения влияния разных концентраций сахаров на развитие тканей провели 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. Начало эксперимента 07.07.2009, окончание 21.08.2009. По окончании эксперимента в тканях ствола определяли активности ВаКИнв, ЦитИнв, АпИнв и СС.

Для изучения камбиального роста в условиях различной обеспеченности тканей ассимилятами нарушали нисходящий транспорт сахарозы путем кольцевания ствола деревьев. Для исследования использовали 22-летние растения обычной березы, произрастающие на Биологической станции КарНЦ РАН. Часть деревьев были помечены как контрольные и оставлены без каких-либо воздействий. 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

Для анализа отбирали листья с удлинённых (ауксибласты, АУ) и укороченных (брахибласты, БР) побегов, мелкие сосущие корни.

Образцы тканей ствола для биохимического анализа брали на высоте 1.3 м от земли. У карельской березы выбирали участки с наибольшей степенью проявления структурных аномалий. На стволе карельской березы вырезали окошки 4*6 см и отделяли кору от древесины. С обнаженной поверхности древесины бритвенным лезвием соскабливали ткани ксилемы, куда входили материнские клетки ксилемы и наружные слои прироста ксилемы текущего года. С внутренней поверхности коры препарировали комплекс тканей, включающий камбиальную зону, проводящую флоэму и самые внутренние слои непроводящей флоэмы. В дальнейшем эти ткани обозначены как «флоэма». Отбор образцов тканей ствола контролировали под световым микроскопом. Весь растительный материал замораживали в жидком азоте и хранили в низкотемпературной морозильной камере при -70°C .

2.3. Микроскопические исследования

После отделения коры от древесины с внутренней поверхности коры и обнаженной поверхности древесины вырезали кубики тканей объемом 3 мм³. Фиксацию тканей проводили в 70% спирте. 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 ксилеме и флоэме подсчитывали число рядов структурных элементов, сформированных в текущем году и имеющих явные признаки дифференцировки. В ксилеме выделяли зоны, лишенные сосудов, и подсчитывали число рядов волокнистых трахеид с признаками вторичного утолщения оболочек, во флоэме – число рядов ситовидных трубок. Остановку деятельности камбия в июле определяли по сокращению ширины камбиальной зоны и появлению сплюснутых в радиальном направлении клеток ксилемы, создающих контуры ложного годичного кольца.

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

При изучении слоев проводящей флоэмы использовали метод выявления каллозы 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 CHNS-анализаторе (Perkin-Elmer, model 2400). Содержание подвижного фосфора определяли спектрофотометрически (СФ-2000, Россия) с молибдатом аммония, подвижного калия методом атомно-абсорбционной спектрофотометрии (Shimadzu AA 7000). Во всех отобранных 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, так как именно здесь сосредоточены основные доступные формы элементов для растений. Кроме того, большая масса корней растений находится в пределах этой почвенной толщи. Запасы элементов, полученные для отдельных почв, пересчитывали на площади, занятые этими почвами в пределах ландшафта (Бахмет, 2012).

Для определения нитратного азота корнеобитаемого слоя почвы отбирали образцы почвы, в которых потенциометрическим методом определяли концентрацию нитратного (NO_3) азота (рН-метр Анион А4100, Россия). Содержание нитрата выражали в мг N от NO_3 на 100 г сухой массы почвы.

2.5. Биохимические исследования

Определение содержания пигментов

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 хл находится в ССК (Lichtenthaler, 1987).

Определение сахаров

Для определения сахаров весь растительный материал сразу после взятия проб замораживали в жидком азоте и лиофильно высушивали. Выделение и экстракцию сахаров проводили, по методике, которая подробно описана ранее (Галибина и др., 2012). Углеводы дважды экстрагировали 80% этиловым спиртом при 50°C в течение 30 минут. Спиртовые экстракты объединяли и упаривали на водяной бане при температуре 35-40°C. Полученный сухой остаток, содержащий моно-, ди- и олигосахара растворяли в 3-5 мл (в зависимости от предполагаемого количества углеводов) бидистиллированной воды и фильтровали через бумажные фильтры. Полученный фильтрат подвергали тщательной очистке методом твердофазной экстракции (ТФЭ), для освобождения от мешающих компонентов, таких как пигменты, полисахариды, различные соли и органические кислоты. Для этого растворы образцов пропускали через мембранные фильтры (d=25mm, 0.45µm, Nylon) (ProFill, Германия), а потом через картриджи для ТФЭ (NH₂, 500mg/6ml, 55µm, 70A) (Phenomemex Strata, США). Содержание растворимых углеводов в экстракте анализировали на ВЭЖХ системе серии «Стайер» (Аквилон, Россия) при следующих условиях: колонка - Rezex RCM-Monoscharide (Phenomemex, США), элюент бидистиллированная вода, скорость потока элюента – 0.6 мл/мин, детектор – рефрактометр. Критерием идентификации пиков служило время удерживания стандартных веществ: сахарозы, глюкозы, фруктозы (Panreac, Испания). Содержание углеводов выражали в мг на г сухой ткани.

Определение крахмала

Крахмал из органов и тканей извлекали 56 % 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 (рН 7.5), 1 мМ ЭДТА, 1 мМ ЭГТА, 3 мМ ДТТ, 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 АпИнв, в супернатанте – ВакИн, ЦитИнв, 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, рН 4.7 (АпИнв и ВакИнв) или 50 мМ Нерес, рН 7.5 (ЦитИнв), 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 (рН 7.4), 5 мМ MgCl₂, 1 мМ уридиндифосфат, 1 мМ пирофосфат, 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 (рН 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 (рН 8), 5 мМ MgCl₂, 5 мМ АТФ, 1 мМ НАДФ⁺, 5 мМ глюкозу, 1 единицу глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Глю-6-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 (Bradford, 1976).

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 *CC* (*Sus1*, *Sus2*), изоформы *АпИнв* (*CWIN 1*, *CWIN 1.1*, *CWIN 4*), белковый ингибитор *АпИнв/ВакИнв* (*Cif*), изоформы целлюлозосинтазы (*Ces 8*, *Ces 7*, *Ces 3*), транспортеры сахарозы (*Suc*) и гексоз (*Hex1*, *Hex 2*), CLAVATA-подобный пептид *CLE 41/44* (*CLE41/44*) и его рецептор *TDR* (*PXY*), а также транскрипционные факторы *VND6*, *VND7* с NAC-доменом (VASCULAR-RELATED NAC-DOMAIN), контролирующие синтез вторичной клеточной стенки, развитие и дифференцировку клеток ксилемы (*VND6*, *VND7*) и *APL* (ALTERED PHLOEM DEVELOPMENT, MYB-белки), который играет роль в развитии флоэмы (*APL*).

Подбор праймеров

Специфические праймеры (Евроген, Россия) для амплификации участков исследуемых генов (Табл.1) 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 (рис. 7) (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 тотальной РНК (тРНК) проводили с помощью реагента Extract RNA (Евроген, Россия) согласно протоколу производителя. Комплементарную ДНК (кДНК) синтезировали, используя набор реактивов для обратной транскрипции MMLV RT kit (Евроген, Россия), содержащий обратную транскриптазу (MMLV ревертаза), случайные праймеры (Randoom (dN)10-primer) и 5x буфер для синтеза первой цепи кДНК (280 mM Трис-НСl, рН 8.7; 375 mM КCl; 30 mM MgCl₂). Количество

и качество выделенной РНК и синтезированной кДНК проверяли спектрофотометрически с помощью прибора SmartSpecPlus («Bio-Rad», США).

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>	GGTGGTGAATGAGTAGCC	TTCTTTCCTTTATGCC	Bpev01.c0427.g0027
<i>CWIN1</i>	TATCAGACTCAAGCACCC AG	ATTACACGCCCAGAACAGAC	Bpev01.c0237.g0050
<i>CWIN1.1</i>	AGTGCCCCGATTTCTTCCC TG	GTCCACCTGCCCTTGTCCG	Bpev01.c0333.g0031
<i>CWIN4</i>	GCTCTACCACAATCCTCCC A	GCACTCGCATTCATCCCCTC	Bpev01.c0516.g0006
<i>Sus1</i>	TAGCATCAACCCCTGTCCC T	GTTCAGTTCCTCAACCGTCA	Bpev01.c0294.g0013
<i>Sus2</i>	CTGCTAACCGCAACGAAA T	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	AAAGAGTCATCCACAAGCACA T	Bpev01.c0777.g0012
<i>Ces7</i>	GTAATAGCCGGTGGTAGA TCC	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>	GGGGTGGTTGATTCTTA	TCCAGCAGAGCATTGTG	Bpev01.c0329.g0008
<i>Hex 2</i>	GGATTTGCTTGGTCATGG GGTCC	ATTTATACCCTTGGTCTCTGG	Bpev01.c0151.g0005
<i>Suc</i>	CTTCATCTGGCTCTGCG	GGTTTTCGTCGTCTTGTC	Bpev01.c0594.g0012

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. Смесь для ПЦР объемом 25 мкл содержала 100 нг кДНК (2 мкл), 5 мкл реакционной смеси qPCRmix-HS SYBR («Евроген», Россия), прямой и

обратный праймеры (конечная концентрация 0,4 мкМ) и 16 мкл деионизованной воды, свободной от нуклеаз. Протокол ПЦР: 5 мин при 95°C, далее 45 циклов 15с при 95 °С, 15с при 48-60°C. Специфичность продуктов амплификации проверяли плавлением ПЦР фрагментов: 30 с при 72 °С, 1 мин при 95 °С, 1 мин при 50 °С.

Данные, полученные в результате ПЦР, анализировали при помощи программного инструмента Relative Expression Software Tool 2009 V.2.0.13 (REST 2009).

Эффективность ПЦР (E) вычисляли по формуле (1):

$$E=10^{1/a}, \quad (1)$$

где a – коэффициент уравнения зависимости порогового цикла (C_t) от логарифма исходной концентрации ДНК – матриц. ПЦР для референсного и целевых генов протекала со сходной эффективностью, примерно равной 2.

Относительный уровень транскриптов генов (RQ) вычисляли по формуле (2):

$$RQ = 2^{\Delta C_t}, \quad (2)$$

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.

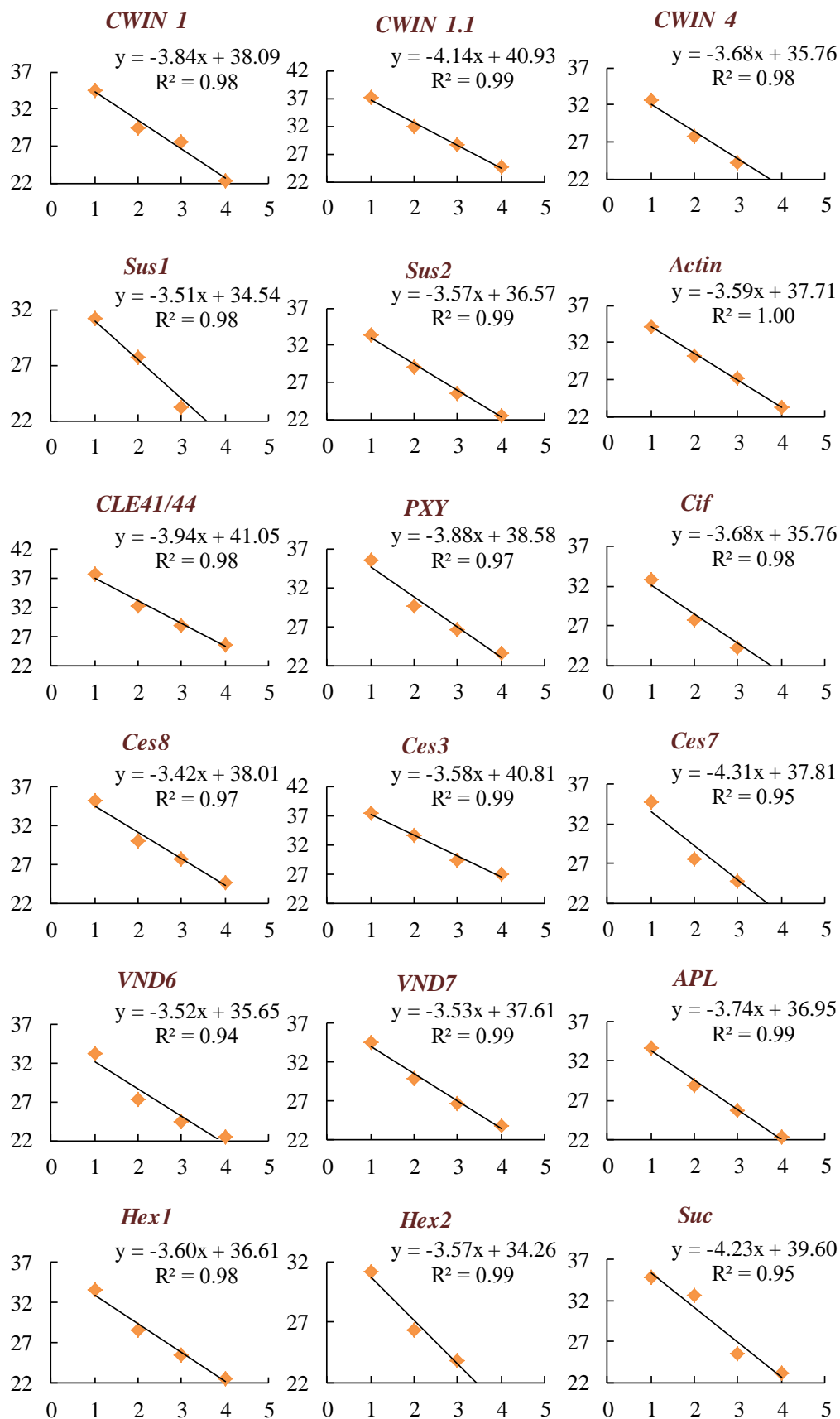


Рисунок 7. Графики зависимости порогового цикла (по оси абсцис C_t) генов от логарифма исходной концентрации ДНК-матриц (по оси ординат).

2.7. Статистическая обработка

Данные обработаны статистически 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. Приведенные данные представлены в виде средних значений и стандартных ошибок. 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

На основе результатов физиолого-биохимических и анатомо-цитологических исследований и постановки экспериментов (Новицкая 1997, 1999, 2008; Novitskaya, 1998; Novitskaya, Kushnir, 2006), было высказано предположение, что нарушение камбиальной деятельности у карельской березы, приводящее к формированию структурных аномалий ствола, индуцируется появлением избытка сахарозы в проводящей флоэме и камбиальной зоне. Сахароза оказывает влияние на экспрессию сахар-модулируемых генов (Gibson, 2004; Koch, 2004; Smeekens, 2000; Rolland et al., 2006 и др.), что имеет серьезные метаболические последствия, вплоть до изменения программы развития клеток.

Утилизация сахарозы в акцепторных тканях происходит при участии ферментов ее гидролиза – инвертазы и сахарозосинтазы (Курсанов, 1976; Sturm, Tang, 1999; Koch, 2002 и др.). Сахарозосинтаза (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. Три формы инвертазы – вакуолярная (ВакИнв), цитоплазматическая (ЦитИнв) и апопластная (АпИнв), отличаются по своим биохимическим свойствам, месту локализации и, следовательно, выполняемым функциям. С одной стороны, эти ферменты участвуют в создании концентрационного градиента сахарозы в месте разгрузки флоэмы, необходимого для поддержания транспорта ассимилятов в камбиальную зону. С другой стороны, соотношение активностей этих ферментов определяет включение расщепляемой ими сахарозы в различные метаболические пути и, как следствие, может определять направление дифференциации камбиальных производных.

Мы предположили, что нарушение процессов дифференциации материнских клеток ксилемы и флоэмы у карельской березы связано с изменением соотношения активностей инвертазы и сахарозосинтазы в отдельных участках ствола. В связи с этим

была изучена активность ферментов метаболизации сахарозы и содержание сахаров в тканях ствола обычной березы повислой и карельской березы. Исследования проводили в сезонной динамике, при разных сценариях ксилогенеза и на разных этапах онтогенеза растений.

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

Исследование проводили в течение 2016 г. на 2-х формах 45 – летних деревьев обычной березы и карельской березы. Деревья обычной березы имели типичную для вида прямослойную древесину со слабо выраженной текстурой. Среди деревьев карельской березы подбирали экземпляры с высокой степенью узорчатости древесины ствола. Отбор тканей осуществляли в пределах нижней трети ствола, поскольку у «узорчатых» растений карельской березы аномальность строения тканей здесь выражена наиболее ярко.

Температура, наряду с фотопериодом – основной фактор, запускающий или тормозящий важнейшие метаболические процессы, происходящие в растении, и, тем самым, характеризующий определенную фенологическую фазу (Федорков, 2007). На рис. 8 представлены среднесуточные температуры в день отбора (темные столбики), день до отбора и день после отбора (светлые столбики) образцов. Даты отбора были приурочены к протеканию различных фенофаз.

Период покоя:

26.01 – состояние глубокого покоя (в лабораторных условиях почки не распускаются),

16.02 – состояние вынужденного покоя (почки способны распускаться и расти).

Выход из состояния покоя, сокодвижение, рост листовой пластинки:

29.03 – выход из состояния покоя, в стволе начинается гидролиз запасных веществ (Галибина и др., 2012),

28.04 – активное сокодвижение,

12.05 – активные процессы во флоэме, клетки флоэмы сильно вакуолизированы, отделение коры от древесины идет по зоне дифференциации материнских клеток флоэмы (Барильская, 1978), лист распустился на 50-70 %.

Камбиальный рост:

25.05 – начало формирования прироста ксилемы, камбиальная зона оводнена и отделяется вместе с корой, лист распустился на 100 %,

15.06 – активное формирование ранней тонкостенной древесины,

07.07 – активизация утолщения клеточной стенки,

25.07 – продолжение формирования вторичной клеточной стенки,

10.08 – завершение камбиального роста, кора плохо отходит от древесины.

Подготовка к состоянию покоя:

13.09 – интенсивный отток метаболитов в ствол, кора не отделяется от древесины,

19.10 – подготовка к состоянию покоя.

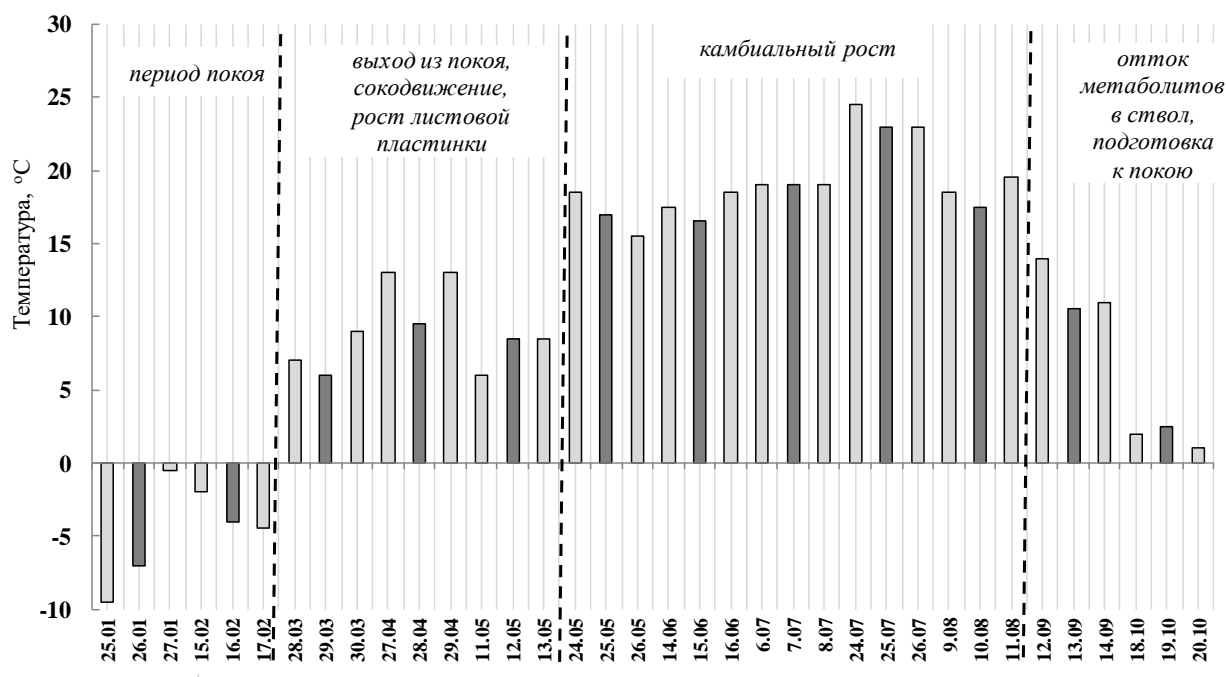


Рис. 8. Динамика среднесуточной температуры в течение 2016 года в г. Петрозаводске. Данные с сервера «Погода России» (<https://rp5.ru>). Темными столбиками обозначены даты отбора образцов в 2016 г.

Изучение активности ферментов проводили в тканях ствола – флоэме и ксилеме. Отбор образцов тканей ствола контролировали под световым микроскопом.

Период камбиального роста. У обычной березы активность камбия по окружности ствола примерно одинаковая, поэтому на поперечных микроскопических срезах строение ксилемы и флоэмы вдоль камбиальной зоны почти не меняется. На первый срок фиксации материала (25 мая) у обычной березы прирост ксилемы текущего года составил в среднем 23.2 ± 4.3 ряда волокнистых трахеид с характерными признаками дифференцировки. Во флоэме в это время насчитывалось в среднем 2 ряда ситовидных трубок. У березы реактивация камбия начинается с дифференцировки клеток флоэмы, непосредственно прилегающих к камбию и зимующих в недифференцированном состоянии. Без дополнительного деления эти клетки сильно вакуолизируются и превращаются в ситовидные трубки, функционирование которых обеспечивает ассимилятами дальнейшую камбиальную активность. Таким образом, в первый срок фиксации ситовидные трубки проводящей флоэмы обычной березы, очевидно, представляют собой элементы, сформированные из клеток, которые были отложены камбием в прошлом году. В зонах структурных аномалий ствола карельской березы деятельность камбия нарушена. Годичные кольца древесины имеют изогнутые очертания. Со стороны коры в древесину вдаются килевидные углубления. На поперечных срезах ксилемы и флоэмы размеры структурных элементов в разных участках среза сильно варьируют, часто они приобретают свилеватую форму, их ориентация может меняться от вертикальной до поперечной. Все это затрудняет оценку текущих приростов тканей. Тем не менее, можно отметить, что в зонах максимального прироста ксилемы количество рядов структурных элементов близко к тому, что было отмечено для обычной березы, в других участках среза оно значительно меньше (9 – 13 рядов). Во флоэме имеются зоны активного деления клеток, где количество ситовидных трубок существенно снижено. В этих местах формируется прогиб тканей флоэмы в сторону ксилемы.

У двух форм березы повислой сезонные колебания сахаров были одинаковые, в то время как в их количественном содержании проявлялись различия. В период покоя из-за воздействия низких температур (рис. 8) транспортные процессы отсутствуют. В этих условиях сахара локализованы в вакуолях и выполняют криопротекторную функцию (Курсанов, 1976; Новицкая, 1985; Софронова, 1985).

В период покоя у обычной березы содержание сахарозы во флоэме (~20 мг/г) было в 2 раза выше, чем в ксилеме. Количество гексоз при этом не превышало 3 и 9 мг/г в ксилеме и флоэме соответственно (рис. 9). У карельской березы в это время в ксилеме было в 2 раза больше сахарозы, а во флоэме моносахаров (рис. 9). До начала камбиальной деятельности содержание сахарозы и гексоз в стволе существенно не менялось, как у обычной, так и у карельской березы.

В период камбиального роста идет интенсивный осевой транспорт по ситовидным трубкам флоэмы. В этот период дифференцирующаяся ксилема является основной аттрагирующей зоной дерева и ориентирует на себя поток сахарозы из листьев. На протяжении камбиального роста содержание сахарозы во флоэме и ксилеме обычной березы было выше, чем у карельской березы.

У обычной березы в ксилеме содержание сахарозы колебалось в диапазоне 50-90 мг/г, при этом количество гексоз было примерно такое же. В тканях флоэмы, по сравнению с ксилемой, содержание сахарозы было значительно более высоким (140-200 мг/г), а содержание моносахаров (глюкозы и фруктозы) варьировало в диапазоне 16-50 мг/г (рис. 9).

У карельской березы в ксилеме в период камбиального роста содержание сахарозы и моносахаров колебалось в диапазоне 30-50 и 8-20 мг/г соответственно. Во флоэме количество дисахарида варьировало в пределах 90-130 мг/г, а гексоз 9-25 мг/г (рис. 9). Только в период подготовки растения к покою содержание сахарозы и гексоз в тканях ствола у карельской березы сравнивалось с таковым у обычной березы.

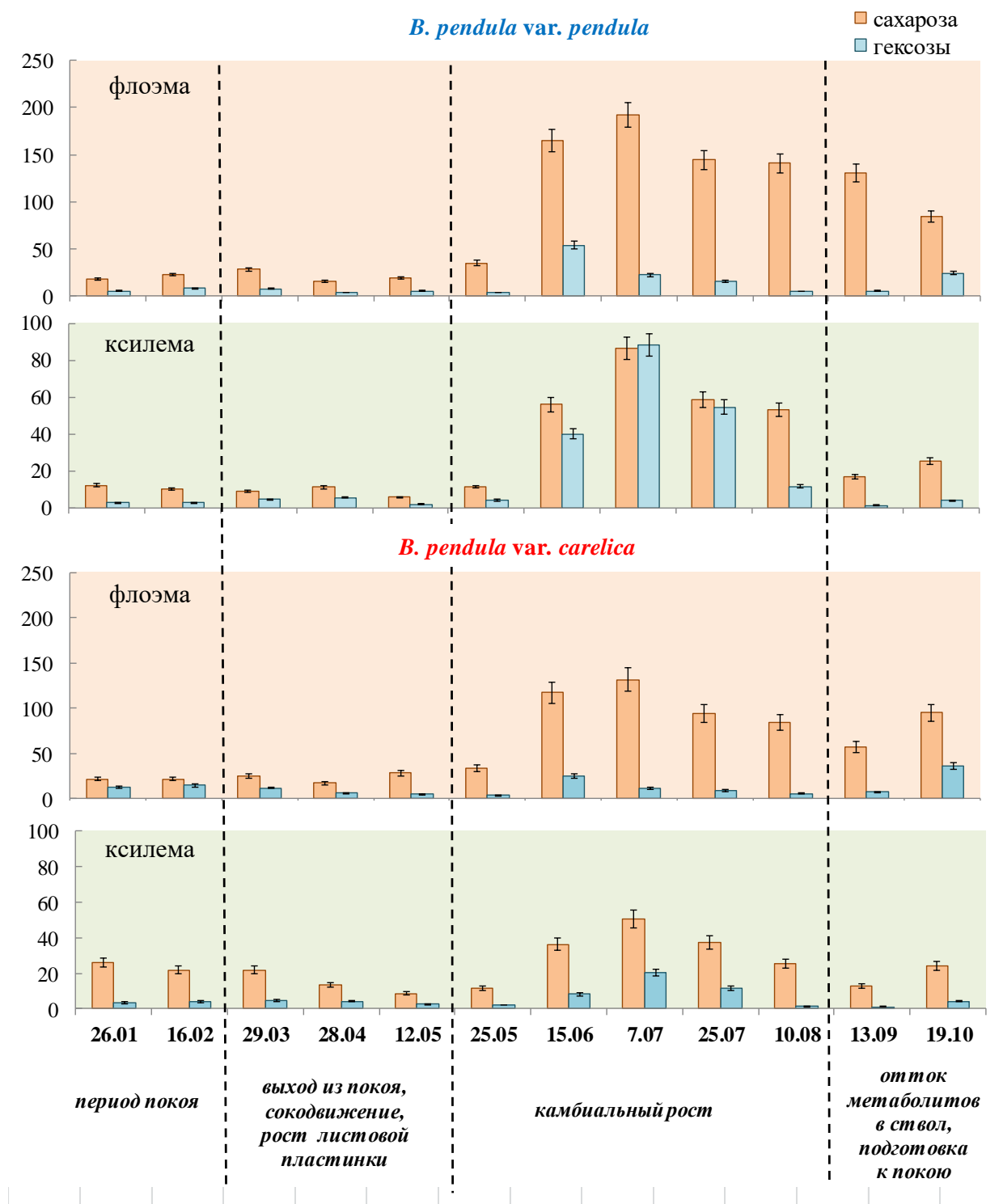


Рисунок 9. Годичная динамика сахарозы и гексоз (мг/г сухой ткани) в тканях ствола у растений березы повислой. Представлены средние значения пяти повторностей и их стандартные ошибки.

Ранее было показано, что сахароза в тканях ствола березы не выполняет запасную функцию и весь ее пул следует рассматривать как транспортную форму (Новицкая и др.,

2015). Полученные данные подтвердили это предположение. Наибольшее содержание сахарозы наблюдается в период камбиального роста во флоэме (рис. 9), обеспечивающей транспорт ассимилятов к дифференцирующимся клеткам ксилемы. Для поддержания транспорта дисахарида необходимо создание ее концентрационного градиента между донорными и акцепторными клетками и тканями, что обеспечивается интенсивной утилизацией дисахарида в зонах потребления. Определение активностей метаболизирующих сахарозу ферментов показало, что во флоэме и ксилеме обеих форм березы присутствуют все три формы инвертазы (ВакИнв, ЦитИнв, АпИнв) и СС, однако активности их различались.

Наши исследования показали, что ярко выраженной характеристикой ферментативной активности тканей березы является высокая активность АпИнв, что свидетельствует о важной роли апопласта в разгрузке флоэмы. Особенно высокую активность инвертазы клеточной стенки обнаружили в тканях ствола узорчатых растений. И во флоэме, и в ксилеме узорчатых растений на протяжении сезона вегетации активность АпИнв значительно превышала активность фермента в стволах без выраженного узорчатого строения древесины (рис. 10). Более высокая активность АпИнв – важная отличительная особенность ферментативной активности тканей ствола узорчатых растений.

Самая высокая активность АпИнв наблюдалась в период вынужденного покоя (16.02) и при выходе растений из состояния покоя (29.03) 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 31 и 6 мкмоль сахарозы на г ткани во флоэме и ксилеме соответственно (рис. 10). Основная функция инвертазы клеточной стенки – участие в разгрузке флоэмы и поддержании тем самым концентрационного градиента между донором и акцептором ассимилятов (Hubbard et al., 1989; Yelle et al., 1991; Weber et al., 1996; Carlson and Chourey, 1999; Tang et al., 1999; Iraqi and Tremblay, 2001).

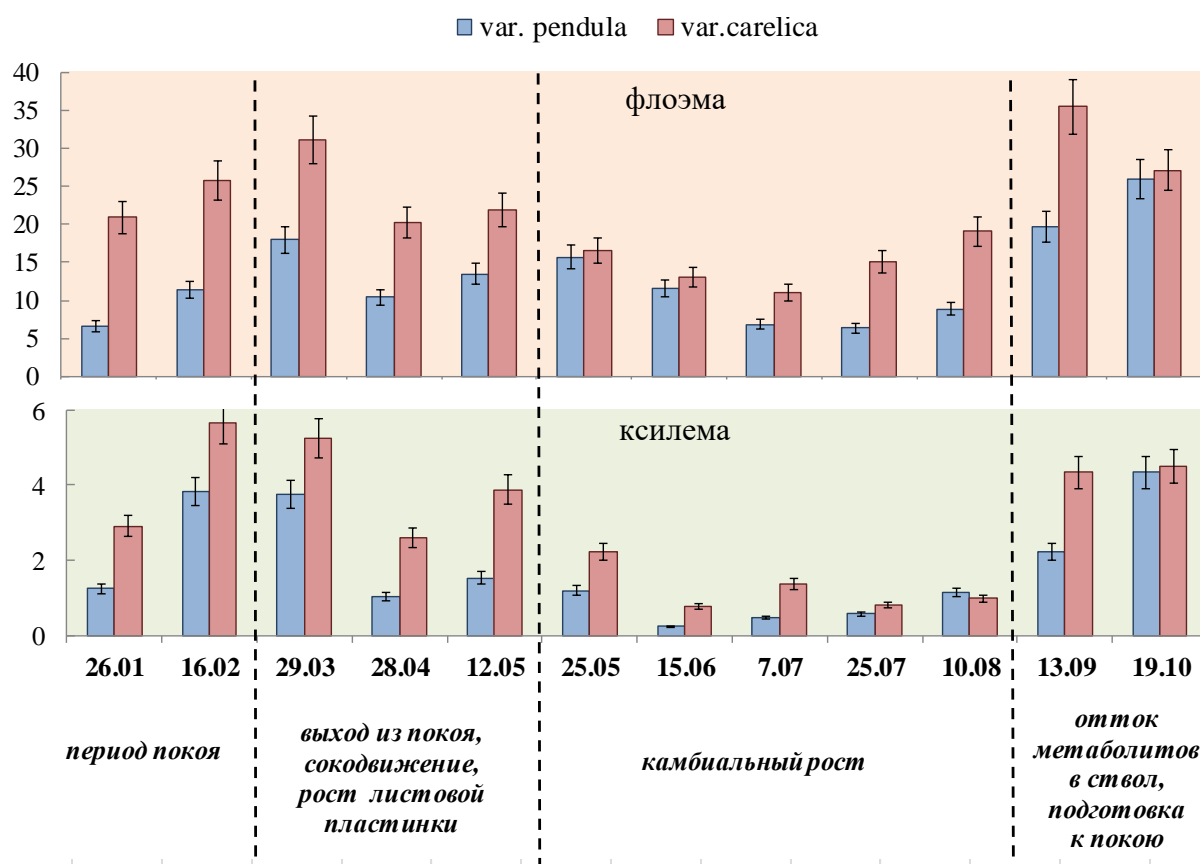


Рисунок 10. Годичная динамика активности апопластной инвертазы (μмоль сахаразы / г ткани) в тканях ствола у растений березы повислой. Представлены средние значения пяти повторностей и их стандартные ошибки.

Активный флоэмный транспорт у древесных растений наблюдается с началом экспорта ассимилятов из листа. Лист березы становится донором ассимилятов после достижения 50% своего окончательного размера (Цельникер, Малкина 1986), следовательно, в феврале-апреле у березы флоэмный транспорт отсутствует. В этот период все изменения в углеводном обмене обусловлены в первую очередь влиянием внешних факторов, таких как свет и температура. В зимний период метаболиты в клетках представлены запасной формой. В вакуолях, отличающихся зимой маленькими размерами, они присутствуют в виде сахаров, а в пластидах и в гиалоплазме, которая занимает основной объем клетки – в виде крахмала, липидов, танинов, белков (Курсанов, 1976; Новицкая, 1985; Софронова, 1985). Повышение температуры способствовало гидролизу отложенных с осени запасных соединений. Увеличение

содержания сахаров в тканях ствола наблюдали при выходе растений из зимнего покоя у персика и грецкого ореха (Ameglio, 2002), тополя (Schrader, Sauter, 2002; Guy, 2003), клена (Wong et al, 2003). В самом начале ростовых процессов резкое снижение содержания крахмала (Курсанов, 1976; Судачкова, 1977) приводит к увеличению уровня сахарозы. Выходя по градиенту концентрации в апопласт, сахароза метаболизируется там апопластной инвертазой (Курсанов, 1976; Кретович, 1986; Copeland, 1990; Koch, 1996; Tymowska-Lalanne, Kreis, 1998 и др.) с образованием моносахаров. Сахароза и полученные при ее расщеплении гексозы по градиенту концентрации перемещаются по апопласту до сосудов ксилемы и с ксилемным потоком поступают к набухающим почкам. В период интенсивного сокодвижения (28.04) активность АПИИв в тканях ствола несколько снизилась, но оставалась довольно высокой до середины мая у обычной и карельской березы (рис. 10).

Второй пик активности АПИИв наблюдался в сентябре-октябре (рис. 10). Рост активности фермента в это время может быть связан с повышением в стволе уровня сахарозы в результате осеннего оттока ассимилятов из кроны. Содержание дисахарида во флоэме достигало 130 и 57 мг/г у обычной и карельской березы соответственно (рис. 9). Гексозы, образующиеся в апопласте, возвращаются 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). Освобождение апопласта от глюкозы и фруктозы в результате их переноса в клетку через плазмалемму происходит намного медленнее, чем при весеннем оттоке моносахаров с ксилемным соком. У карельской березы активность АПИИв во флоэме (36 мкмоль сахарозы / г ткани) была в 1.8 раз выше, чем у обычной березы (20 мкмоль сахарозы / г ткани), что коррелирует с меньшим содержанием у нее сахарозы (рис. 9, 10) и, очевидно, способствует запасанию большего количества веществ в тканях ствола. Высокая активность АПИИв указывает на то, что в октябре имеет место интенсивный поток сахарозы из внутриклеточного пространства в апопласт. Осенью наблюдали самую высокую активность АПИИв и в тканях ксилемы у карельской березы (5 мкмоль сахарозы / г ткани). Этот факт можно связать с наличием в тканях ксилемы узорчатых

растений аномальных прослоек паренхимы, где так же могут откладываться запасные вещества.

В период камбиального роста у обычной березы происходило снижение активности АпИнв во флоэме и, особенно, в ксилеме (рис. 10). В этот период сахараза поступает в ткани ствола из фотосинтезирующих листьев. Нисходящий поток сахаразы идет по специализированным каналам дальнего транспорта – ситовидным трубкам проводящей флоэмы. Основным акцептором сахаразы в это время служит камбиальная зона, при этом некоторая часть сахаразы попадает в более периферийные по отношению к проводящей флоэме слои коры (Новицкая и др., 2015). В норме разгрузка сахаразы из ситовидных трубок и движение ее к камбиальной зоне происходят по симпласту (Fisher, Oparka, 1996; Oparka, Santa Cruz, 2000). Это значит, что сахараза движется к камбию по каналам эндоплазматической сети, переходя из клетки в клетку по плазмодесмам (Гамалей, 2004). Наличие интенсивного симпластного потока ограничивает выход сахаразы в апопласт клеток флоэмы, поэтому активность АпИнв во флоэме обычной березы ниже, по сравнению с другими фазами, несмотря на самое высокое в этот период содержание сахаразы (рис. 9).

Утилизация сахаразы в камбиальной зоне и дифференцирующейся ксилеме происходит в основном ЦитИнв и СС (рис. 11).

В период активного деления клеток камбиальной зоны (15.06) сахараза метаболизируется ЦитИнв с образованием фруктозы и глюкозы. Последняя увеличивает уровень экспрессии генов, кодирующих циклины D-типа, повышая митотическую активность клеток (Rolland et al., 2006; Ruan, 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; Haigler et al., 2001; Koch, 2004; Bieniawska et al., 2007; Coleman et al., 2009). У растений обычной березы на фоне большего в 1.5-1.6 раз содержания сахаразы (рис. 9) выше активности ЦитИнв и СС (рис. 11), то есть интенсивно идут процессы структурообразования ксилемы. В данном случае интенсивная метаболизация сахаразы 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.

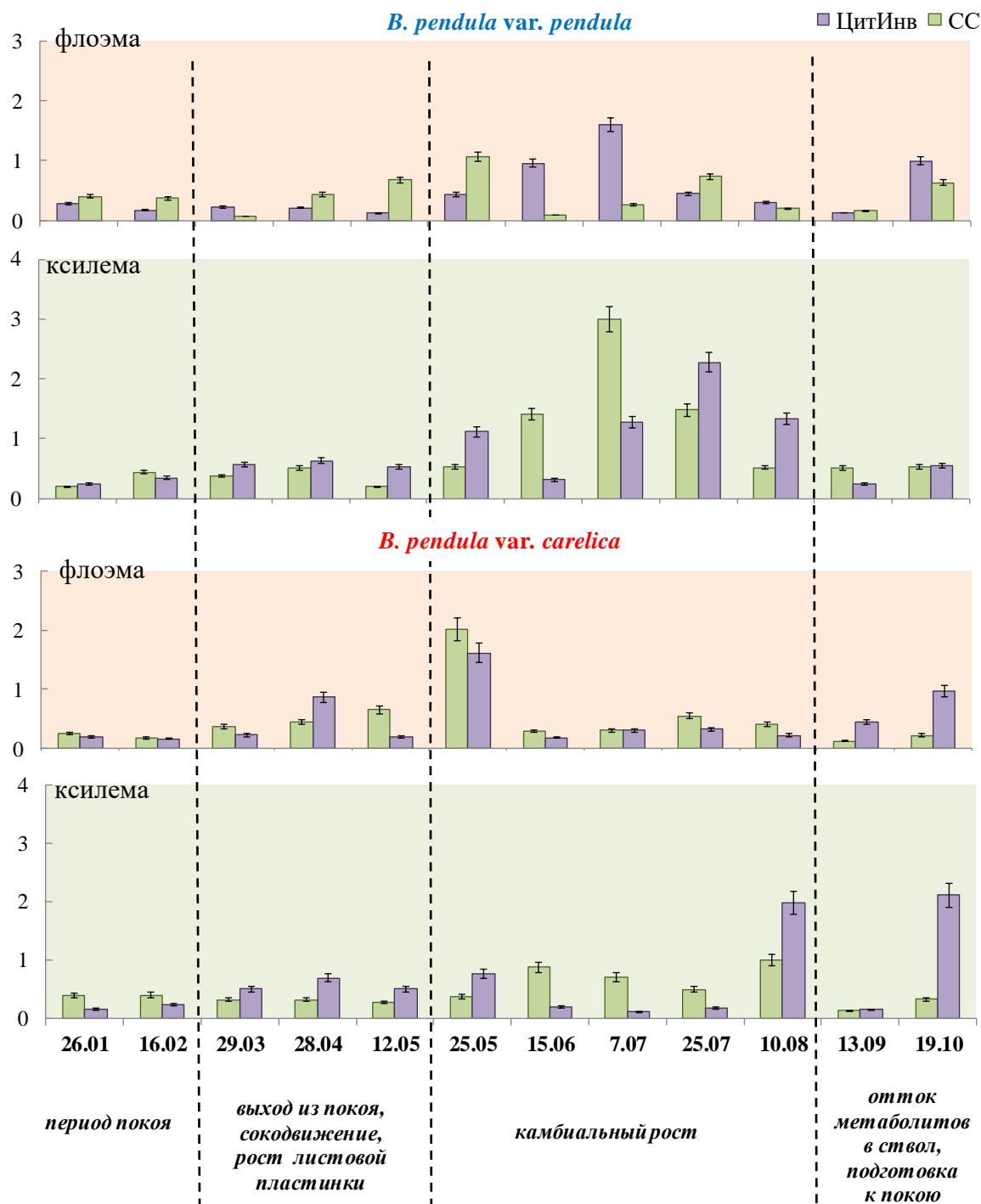


Рисунок 11. Годичная динамика активности цитоплазматической инвертазы и сахарозосинтазы (мкмоль сахарозы / г ткани) в тканях ствола у растений березы повислой. Представлены средние значения пяти повторностей и их стандартные ошибки.

У карельской березы в период активного формирования ранней тонкостенной древесины активность ЦитИнд и СС была ниже в 1.6 раз, а в период интенсивного формирования вторичной клеточной стенки – ниже в 4 раза для ЦитИнд и в 10 раз для СС (рис. 11).

Наряду с СС в создании концентрационного градиента сахарозы в месте разгрузки флоэмы может участвовать АпИнд. Активность апопластного фермента у карельской березы в период камбиального роста превосходила данный показатель у обычной березы в 2-4 раза (рис. 10). Несмотря на повышение активности АпИнд, метаболизация сахарозы в ксилемной части камбиальной зоны у карельской березы была существенно ниже, по сравнению с обычной березой.

Для обычной березы характерно интенсивное использование сахарозы в процессе формирования древесины, у карельской березы, наоборот, более слабая утилизация сахарозы в ходе ксилогенеза замедляет ее отток из флоэмы. Следствием этого может стать появление во флоэме «лишней» (неиспользуемой в ходе деятельности камбия) сахарозы, результатом чего, в свою очередь, станет уменьшение градиента ее концентрации и ухудшение донорно-акцепторных отношений в системе «лист-ствол». У карельской березы сахароза во флоэме не накапливается в связи с высокой активностью АпИнд (рис. 10) и ВакИнд (рис. 12). Известно, что в ситовидных трубках инвертаза отсутствует (Курсанов, 1976), поэтому выявленную активность инвертазы следует относить к паренхимным клеткам. Расщепление большого количества сахарозы в апопласте и вакуолях паренхимных клеток способствует уменьшению концентрации дисахарида во флоэме этого древесного растения до уровня даже более низкого, чем у обычной березы (рис. 9).

Формирование структурных аномалий проводящих тканей в стволе карельской березы подвержено сезонным колебаниям. Как правило, после весеннего пробуждения камбия формируются ткани обычного строения (активность ЦитИнд в ксилеме ниже только в 1.6 раз (рис. 11)), а с начала июля в коре и древесине дифференцируется большое количество паренхимных клеток (активность СС в ксилеме ниже в 10 раз (рис. 11), активность АпИнд во флоэме и ксилеме выше в 2-4 раза (рис. 10)), которые в

древесине образуют характерный узор (Любавская, 1978; Новицкая, 2008). Паренхима заполняется запасными веществами (Барильская, 1978; Коровин и др., 2003, Новицкая, 2008). Все это свидетельствует о том, что в данный период ткани ствола карельской березы являются мощной потребляющей зоной, где поступающие ассимиляты, с одной стороны, расходуются на ростовые процессы, связанные с формированием паренхимных клеток, а с другой – откладываются в запас в паренхимных клетках.

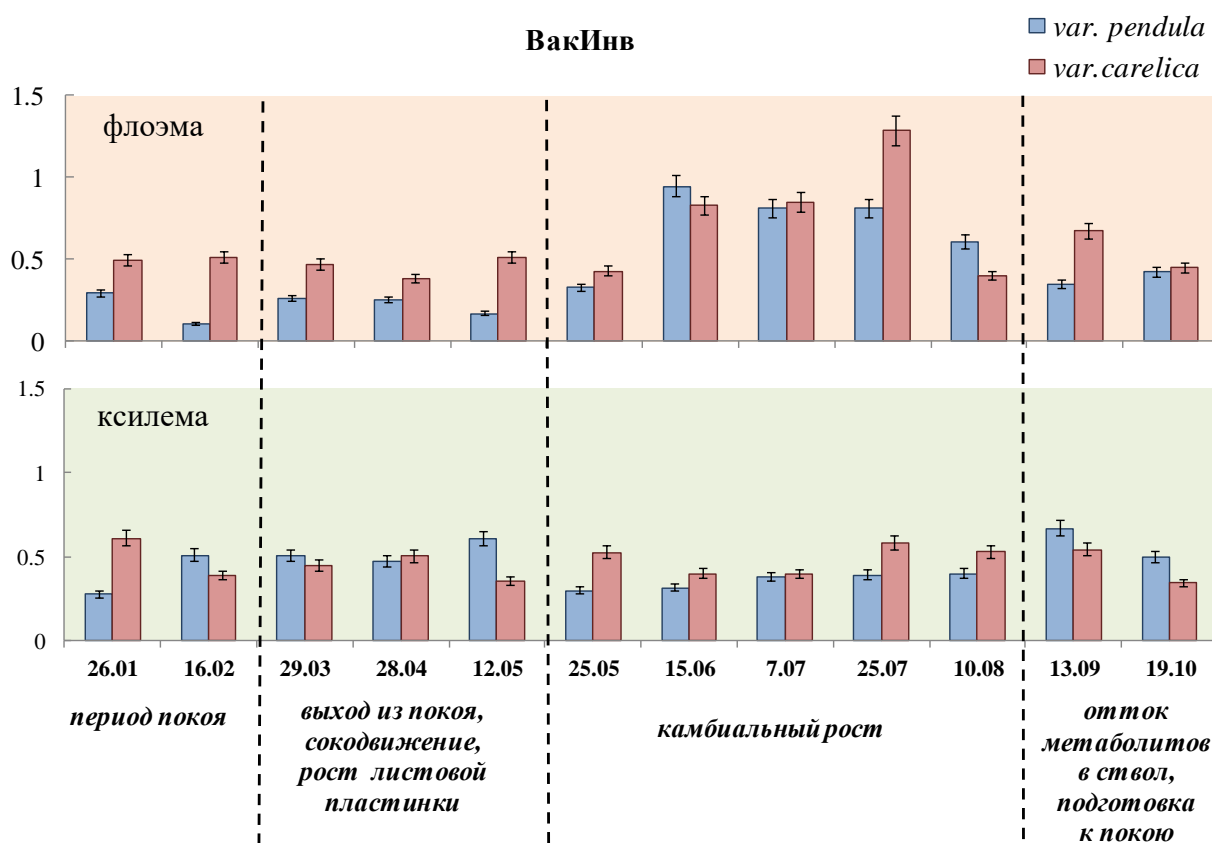


Рисунок 12. Годичная динамика активности вакуолярной инвертазы (мкмоль сахарозы / мг белка) в тканях ствола у растений березы повислой. Представлены средние значения пяти повторностей и их стандартные ошибки.

Активность ВаКИнв в тканях ствола в течение сезона варьировала слабо, значения ее не превышали 1.3 и 0.7 мкмоль сахарозы / мг белка во флоэме и ксилеме соответственно (рис. 12). Наибольшие ее значения отмечались в период камбиального роста в тканях флоэмы. Отличия между двумя формами березы проявлялись на начальных этапах формирования прироста ксилемы и в период формирования

вторичной клеточной стенки (конец июля), активность ВаКИнв у карельской березы была выше.

При рассмотрении сезонной динамики активности ферментов, метаболизирующих сахарозу (рис. 10-12), видно, что у обычной березы в период активного роста высокая акцептирующая сила камбиальной зоны (за счет высокой активности ЦитИнв и СС) обеспечивает активную утилизацию в ней сахарозы. У узорчатых растений (1) суммарная активность ферментов, метаболизирующих сахарозу в ксилеме, на протяжении всего сезона ниже, чем во флоэме, (2) при этом суммарная активность ферментов в тканях флоэмы имеет очень высокие значения (за счет высокой АпИнв). На фоне меньшей активности СС в ксилеме в период камбиального роста бросается в глаза более высокая активность АпИнв во флоэме. То есть, в условиях, когда акцепторная сила ксилемы снижена (снижена активность ЦитИнв и СС) избыток метаболитов может поступать в ткани флоэмы и выходить в апопласт, повышая активность АпИнв.

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

Исследование проводили на 2-х формах 40-летних деревьев *B. pendula*: обычной березе и карельской березе. Все опытные растения произрастали в одинаковых почвенно-климатических условиях на Агробиологической станции Карельского научного центра РАН. У березы повислой в условиях Карелии активное функционирование камбия наблюдается начиная со второй декады июня и до первой декады августа (Новицкая, 2008). В это время основная масса ассимилятов тратится на новообразование клеток камбиальной зоны и рост клеточной стенки. Отбор образцов проводили в июне (21.06) и июле (19.07) 2010 года. В июле 2010 года в период, предшествующий отбору, среднесуточная температура была выше 20°C и более 10 дней отсутствовали осадки, являющиеся главным источником влаги в почве в этот период. Подобные погодные условия приводят к снижению водного потенциала тканей ствола (физиологическая засуха) и, как следствие, подавлению камбиальной активности (Антонова, 1999). В этот период (19.07) имело место преждевременное торможение деятельности камбия.

Изучение активности ферментов проводили в тканях ствола – флоэме и ксилеме. В ткани ксилемы входили дифференцирующиеся клетки ксилемы и наружные слои прироста ксилемы текущего года. В ткани флоэмы входили камбиальная зона, проводящая флоэма и самые внутренние слои непроводящей флоэмы. Отбор образцов контролировали под световым микроскопом.

В июне-июле активно фотосинтезирующие листья являются донорами ассимилятов, основным местом потребления которых становятся наиболее активные ткани – в стволе это камбиальная зона и формирующиеся клетки ксилемы. У растений обычной березы в конце июня в ксилеме наблюдали высокую активность СС. Значения ее достигали 18.6 мкмоль сахарозы / г сырой ткани. Активность АПИИИВ достигала всего 0.6 мкмоль распавшейся сахарозы на г сырой ткани (рис. 13). Это позволяет заключить, что у обычной березы в период активного функционирования камбия СС принимает активное участие в формировании древесины ствола. Во флоэме обычной березы

активность СС была существенно ниже (0.02 мкмоль сахарозы / г сырой ткани), по сравнению с ксилемой. Известно, что экспрессия генов, кодирующих фермент СС, органоспецифична и зависит от стадии развития растения (Sturm, Tang, 1999; Kladnik et al., 2005), наиболее высокая активность СС наблюдается в акцепторных тканях (Coleman et al., 2008; Coleman et al., 2009). При этом во флоэме обычной березы наблюдали высокую активность АпИнв. Значения ее достигали 4.9 мкмоль сахарозы / г сырой ткани (рис. 13).

У растений карельской березы в период камбиального роста максимальная активность СС в ксилеме была в ~ 2.5 раза ниже (7.1 мкмоль сахарозы / г сырой ткани), по сравнению с обычной березой, что является важной отличительной особенностью узорчатых растений (рис. 13). Сравнительно невысокая активность фермента указывает на то, что у узорчатых растений в зонах структурных аномалий ствола формирование тканей ксилемы происходило менее интенсивно, чем у безузорчатых растений. Меньшая метаболизация сахарозы по сахарозосинтазному пути компенсировалась увеличением ее метаболизации по инвертазному пути. Активность АпИнв в ксилеме карельской березы, по сравнению с обычной березой, была в 2.5 раза больше (рис. 13). Пониженная активность СС в ксилеме может способствовать появлению избытка сахарозы во флоэме узорчатых растений. Во флоэме карельской березы в июне, по сравнению с обычной березой, активность АпИнв была выше и достигала 10.4 мкмоль сахарозы / г сырой ткани (рис. 13).

Таким образом, в период активного камбиального роста у обычной березы имеет место интенсивный поток сахарозы из флоэмы в ксилему, где она расходуется на формирование структурных элементов древесины. Основная функция клеток флоэмы в этот период – обеспечение транспорта ассимилятов в зону дифференциации ксилемы. У карельской березы отток сахарозы из флоэмы замедлен, и ее использование в значительной степени происходит во флоэме.

Сделанные выводы находятся в соответствии с величиной градиента концентрации сахарозы между флоэмой и ксилемой у двух форм березы у обычной березы этот

показатель в 3.2 раза больше ($144.6 \text{ мг/г} - 70.1 \text{ мг/г} = 74.5 \text{ мг/г}$), чем у карельской березы ($104.5 \text{ мг/г} - 81.4 \text{ мг/г} = 23.1 \text{ мг/г}$) (рис. 13).

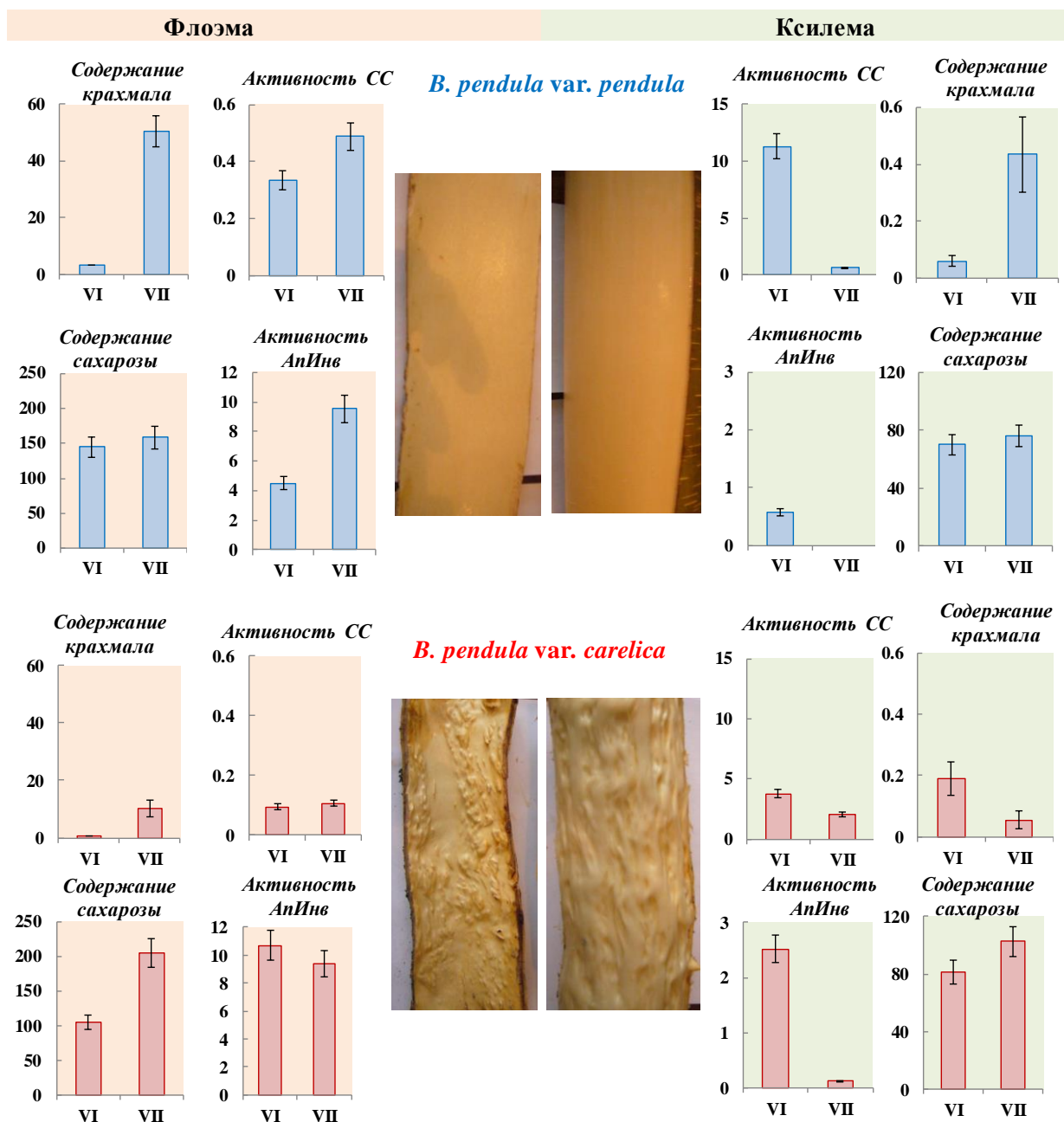


Рисунок 13. Активность сахарозосинтазы и апопластной инвертазы (мкмоль распавшейся сахаразы на г сырой ткани), содержание сахаразы и крахмала (мг/г) во флоэме (слева) и в ксилеме (справа) у 40-летних деревьев березы повислой в период камбиального роста (июнь – июль). Представлены средние значения пяти повторностей и их стандартные ошибки.

Объяснение причин выявленных особенностей метаболического статуса тканей ствола карельской березы возможно исходя из двух сценариев: (1) пониженная акцептирующая активность СС в ксилеме уменьшает отток сахарозы из флоэмы, следствием чего становится повышение во флоэме уровня дисахарида и, соответственно, активности АпИInv; и, наоборот (2) повышенная активность АпИInv во флоэме уменьшает количество сахарозы, поступающей в ксилему, что приводит к снижению здесь активности СС.

В июле погодные условия вызвали остановку деятельности камбия. В этих условиях запрос на ассимилянты со стороны ксилемы сильно ослабевает. В ксилеме обычной березы в 27 раз снизилась активность СС (до 0.7 мкмоль сахарозы / г сырой ткани) и практически полностью исчезла активность АпИInv. У карельской березы активность СС снизилась в 3 раза (до 2.4 мкмоль сахарозы / г сырой ткани), а активность АпИInv в 25 раз (до 0.1 мкмоль сахарозы / г сырой ткани) (рис. 13).

У обычной березы снижение запроса на сахарозу со стороны ксилемы сопровождалось 2-кратным увеличением активности АпИInv во флоэме (рис. 13). 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 АпИInv во флоэме карельской березы является следствием пониженной аттрагирующей способности ксилемы, вызванной низкой активностью СС.

У карельской березы при торможении камбиальной деятельности динамика изменения активности ферментов метаболизации сахарозы во флоэме была сходна с таковой у обычной березы. Активность СС возросла до 0.08 мкмоль сахарозы / г сырой ткани, а активность АпИInv оставалась почти такой же высокой, как в июне, и составила 9.4 мкмоль сахарозы / г сырой ткани (рис. 13).

С прекращением клеточных делений в камбиальной зоне меняется основной путь утилизация сахарозы: преимущественное ее использование на новообразование клеток сменяется тратой в реакциях запасного метаболизма. Одним из наиболее лабильных способов удаления излишка сахарозы является синтез крахмала.

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 у обычной березы, сопровождающееся снижением в ксилеме использования сахарозы на ростовые процессы, приводило к накоплению крахмала. Особенно большое его количество (~ 50 мг/г) скапливалось во флоэме, что позволяет заключить о появлении «лишней» сахарозы во флоэме в этот период. Временное накопление крахмала в паренхимных клетках флоэмы обычной березы можно рассматривать как один из механизмов поддержания концентрации сахарозы в проводящих путях на определенном уровне (Курсанов, 1976; Коровин и др., 2003, Новицкая, 2008). 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 (рис. 13).

У карельской березы в июле, в период снижения активности СС в ксилеме, накопление крахмала во флоэме происходило в 5 раз слабее, чем у обычной березы, а в ксилеме его содержание снизилось с 0.4 мг/г (июнь) до 0.1 мг/г (июль). У карельской березы торможение камбиальной активности в июле сопровождалось 2-х кратным увеличением содержания сахарозы, как в тканях флоэмы, так и ксилемы (рис. 13).

Существует биологический предел накопления сахарозы в запасящем пространстве клеток, превышение которого ведет к преобразованию сахарозы в те или иные запасные соединения. На корнях сахарной свеклы было показано, что в период интенсивного сахаронакопления синтез крахмала прекращался и начиналось образование более энергоемких веществ, в частности, липидов (Курсанов, 1976). Результаты исследований свидетельствуют о том, что в отличие от обычной березы, в паренхимных клетках проводящей флоэмы карельской березы в период активного камбиального роста также накапливаются значительные количества липидов и фенолов – танинов (Новицкая, 2008; Novitskaya, Kushnir, 2006). 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 липидные соединения.

У обычной березы во флоэме, в отличие от ксилемы, увеличение содержания крахмала сопровождалось увеличением активности СС (рис. 13). Участие СС в реакциях синтеза крахмала было установлено на примере исследования корнеплодных растений, у них наименьший уровень крахмала наблюдался в запасающих органах с меньшей активностью СС (Koch, 2002). СС в клетке может находиться в свободном или связанном состоянии, при этом субклеточная локализация фермента влияет на то, как углерод распределяется между конкурирующими путями (Koch, 2004; Winter et al., 1997; Komina et al., 2002; Ruan et al., 2003; Hardin et al., 2004; Duncan, Huber, 2007; Winter, Huber 2013). Мембраносвязанная СС может быть ассоциирована как с плазматической мембраной клетки, так и мембранами различных ее компартментов (аппарата Гольджи, амилопластов, вакуолей) (Koch, 2004). Продукты расщепления сахарозы СС, ассоциированной с клеточной стенкой и аппаратом Гольджи, расходуются на биосинтез целлюлозы и каллозы, связанные с мембраной амилопласта – на синтез крахмала (Koch, 2004). Можно предположить, что во флоэме преобладает связывание СС с мембраной амилопластов.

У карельской березы активность СС коррелировала с содержанием крахмала, не только во флоэме, как у обычной березы, но и в ксилеме (рис. 13). Причиной наблюдаемых отличий может быть преобладание у карельской березы в ксилеме других изоформ СС. У большинства растений присутствует несколько изоформ СС, кодируемых мультигенным семейством и отличающихся по своим биологическим функциям и кинетическим характеристикам. Гены сахарозосинтазного ряда различаются по нуклеотидной последовательности и профилям экспрессии (Ruan et al., 2003; Kladnik et al., 2005; Barratt et al., 2009; Zhang et al., 2011). Изучение активности СС и уровня экспрессии кодирующих ее генов в камбиальной зоне двух форм березы повислой показало, что основную роль в поддержании высокой активности СС у обычной березы играет высокая экспрессия гена *Sus1*, в то время как у карельской березы заметное участие в этом принимали также гены *Sus2* и *Sus3* (Мощенская, 2017). Для гена *Sus3* показан широкий диапазон экспрессии во всех органах и тканях древесных растений, из чего следует, что он относится к группе генов общего

метаболизма. *Sus3* практически не экспрессируется в формирующихся клетках ксилемы (Geisler-Lee et al., 2006), наиболее высокие значения его экспрессии обнаруживаются в паренхимных клетках лучей (Zhang et al., 2011).

Таким образом, у обычной березы в период активного камбиального роста имеет место интенсивный отток сахарозы из флоэмы в ксилему, где она метаболизируется по сахарозосинтазному пути и расходуется на формирование структурных элементов древесины. Снижение активности СС в ксилеме растений обычной березы, вызванное погодными условиями в июле, сопровождалось увеличением метаболизации сахарозы во флоэме по апопластному пути. Возрастание активности АПИ_{нв} можно рассматривать, как компенсаторный механизм, направленный на устранение избыточного содержания сахарозы во флоэме, для поддержания донорно-акцепторных отношений. Действительно, содержание сахарозы в тканях ствола обычной березы, а, следовательно, и градиент ее между флоэмой и ксилемой не изменились. Полученные данные свидетельствуют в пользу предположения о том, что высокая активность АПИ_{нв} во флоэме карельской березы в период камбиального роста является следствием пониженной аттрагирующей способности ксилемы, вызванной низкой активностью СС.

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

Объектами исследования были 6-летние деревья обычной березы и карельской березы с проявившимися признаками структурных аномалий тканей ствола. Все растения произрастали в одинаковых почвенно-климатических условиях на Агробиологической станции Карельского научного центра РАН. Отбор растительных образцов проводили в период активного камбиального роста (3 - 4 июля 2012 года). На анализ отбирали листья удлинённых (ауксибластов, АУ) и укороченных (брахибластов, БР) побегов, мелкие сосущие корни, ткани ствола (флоэма и ксилема). В ткани ксилемы входили дифференцирующиеся клетки ксилемы и наружные слои прироста ксилемы текущего года. В ткани флоэмы входили камбиальная зона, проводящая флоэма и самые внутренние слои непроводящей флоэмы. Микроскопические исследования показали, что для всех исследуемых растений был характерен активный камбиальный рост, т.е. в этот период основным акцептором ассимилятов являлись камбиальная зона ствола и дифференцирующаяся ксилема. Распределение сахаров, крахмала и активности ферментов метаболизма сахарозы в органах и тканях рассматривали с позиции донорно-акцепторных отношений.

В период активного роста фотосинтезирующие листья являются основным донором ассимилятов в растении. У березы формируется два основных типа побегов: удлинённые – АУ и укороченные – БР. Рост АУ продолжается в течение всего вегетационного периода: весной на них развиваются так называемые листья первого поколения, после чего по мере удлинения побега на нем появляются последующие листочки – листья второго поколения. Опыты Т. Козловского и Д. Клаузена (Kozłowski, Clausen, 1966) показали, что АУ большую часть вегетационного периода работают на обеспечение собственного роста и развития и лишь в конце вегетации становятся источником ассимилятов, откладываемых в запас. В отличие от АУ, на БР разворачивание листьев происходит очень быстро: после разворачивания почек на них сразу формируется розетка листьев. На этом процесс листообразования прекращается, после

чего БР становятся источником ассимилятов для обеспечения вторичного (камбиального) роста ветвей и ствола (Николаева, 2004; Николаева, Новицкая, 2007).

Одним из важных показателей фотосинтетической активности листового аппарата является содержание фотосинтетических пигментов. Суммарное содержание хлорофилла в листьях укороченных побегов (БР) обычной березы не отличалось от такового у карельской березы и составило ~ 2.2 мг/г. В листьях удлинённых побегов (АУ) у карельской березы количество хлорофилла (2.9 мг/г) было в 1.2 раза выше, чем в листьях обычной березы (2.5 мг/г) (рис. 14).

В хлоропластах основная масса хлорофилла входит в состав ССК, выполняющего роль антенны и передающего энергию к реакционному центру фотосистем I или II. Изменение размера ССК определяет формирование устойчивости фотосинтетического аппарата растений (Дымова и др., 2010). Доля хлорофиллов, принадлежащих ССК, составляла в листьях БР 43% и 48% у обычной и карельской березы соответственно. Достоверных отличий между двумя формами березы выявлено не было. В листьях удлинённых побегов содержание пигментов в ССК у обычной березы было 48%, в то время как у карельской березы этот показатель был в 1.5 раза больше и достигал 72%. Большее содержание пигментов в листьях АУ карельской березы было за счет хлорофилла *б*, о чем свидетельствует в 2 раза более высокое у нее, по сравнению с обычной березой, значение отношения Хл *a*/ Хл *б* (рис. 14).

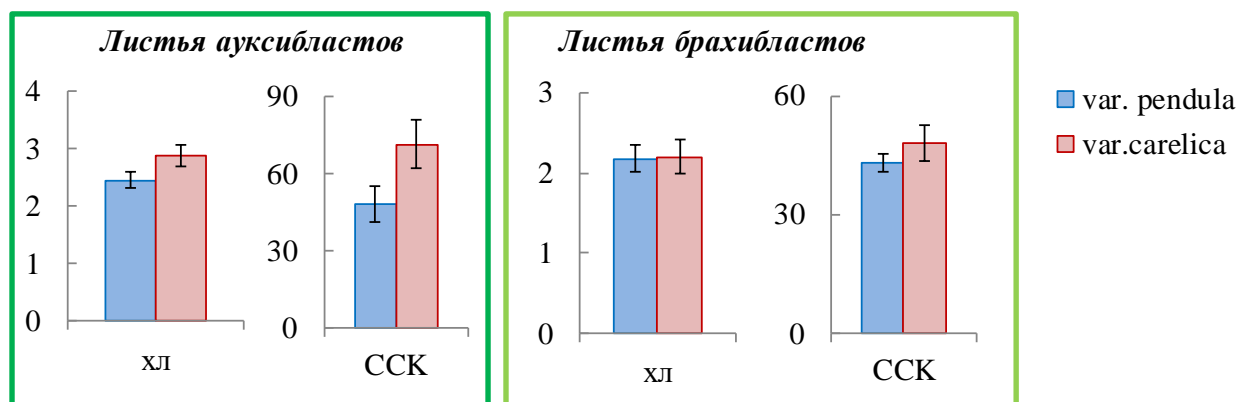


Рисунок 14. Содержание хлорофилла (хл, мг/г сырой ткани) и размер светособирающего комплекса (ССК, %) в листьях ауксибластов и брахибластов растений обычной (*var. pendula*) и карельской (*var. carelica*) березы. Представлены средние значения шести повторностей и их стандартные ошибки.

Фотоассимиляты, образующиеся в листьях АУ, используются в ходе роста апикальных меристем побегов и способствуют увеличению линейных параметров кроны. Возрастание фотосинтетической активности единицы площади листьев происходит, как правило, при увеличении запаса со стороны акцепторов, которым принадлежит ведущая роль в функционировании донорно-акцепторной системы растения. Увеличение аттрагирующей способности акцепторов может приводить к увеличению листовой поверхности (через увеличение площади листовой поверхности или заложение новых листьев) что сопровождается усилением суммарного оттока ассимилятов из функционирующих листьев (Мокронос, 1983; Роньжина, Мокронос, 1994). Установлено, что у карельской березы количество листьев на АУ, а также площадь их листовых пластинок, превосходят таковые у обычной березы (Николаева, 2004; Николаева, Новицкая, 2007). Применительно к АУ комплекс имеющихся данных позволяет заключить, что апикальные меристемы побега карельской березы, по-видимому, обладают большей аттрагирующей силой, по сравнению с аналогичными меристемами обычной березы повислой.

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 А_пИ_{нв} (рис. 15), из чего можно заключить, что отток сахарозы из листьев побегов к акцепторным тканям был очень высоким и значительно превышал использование дисахарида в листе.

В период активного камбиального роста у обычной березы содержание сахарозы в листьях АУ и БР не отличалось между собой и составило ~ 21 мг/г. У карельской березы в листьях количество сахарозы было ниже, по сравнению с обычной березой, в 4 и 2.7 раза в АУ и БР соответственно (рис. 15). 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; Роньжина, Мокроносков, 1994).

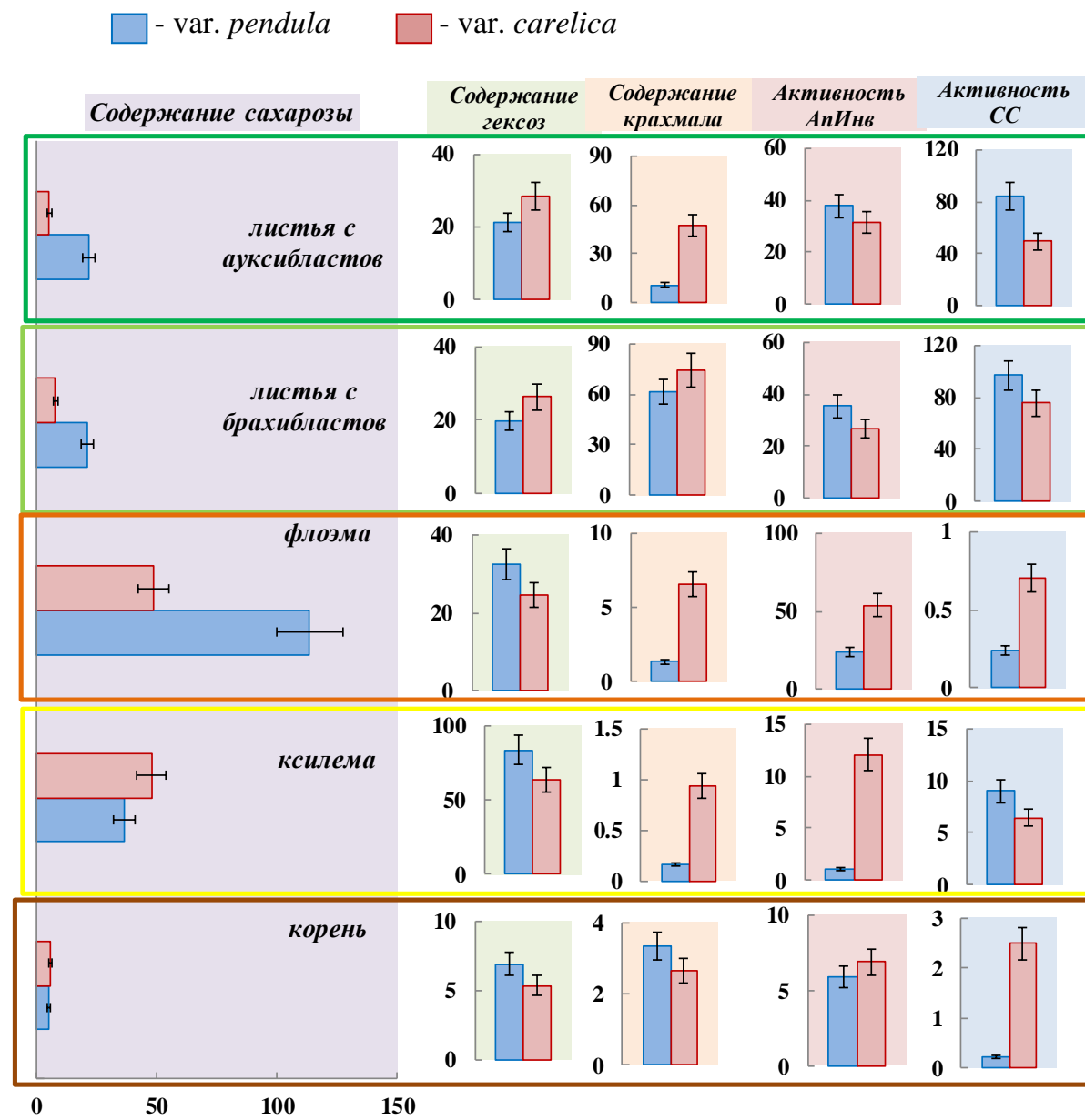


Рисунок 15. Содержание сахарозы, гексоз и крахмала (мг/г) и активность апопластной инвертаз (АпИнв) и сахарозосинтаз (СС) (мкмоль сахарозы на г ткани) в органах и тканях 6-летних растений обычной (var. *pendula*) и карельской (var. *carelica*) березы. Представлены средние значения шести повторностей и их стандартные ошибки.

В период камбиального роста у исследуемых растений наибольшее содержание запасного полисахарида крахмала наблюдалось в листьях БР (61 и 74 мг/г у обычной и карельской березы соответственно). У карельской березы накопление крахмала

наблюдалось также в листьях АУ (47 мг/г), у обычной березы его содержание в АУ составило 11 мг/г (рис. 15). Накопление крахмала в листьях АУ и БР у карельской березы, вероятно, было причиной меньшего количества в них сахарозы, по сравнению с обычной березой.

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, Мокроносков, 1994). В период активного камбиального роста ксилема – основной акцептор притекающей из листьев сахарозы (Антонова, 1999). У обычной березы содержание сахарозы в ксилеме было меньше, чем во флоэме (рис. 15). Высокий градиент сахарозы между ксилемой и флоэмой ($113.6 \text{ мг/г} - 36.3 \text{ мг/г} = 77 \text{ мг/г}$) свидетельствует в пользу активного использования дисахарида на формирование структурных элементов древесины.

Развитие ксилемы, особенно стадия отложения вторичной клеточной стенки, требует больших субстратных и энергетических затрат (Антонова, 1999). Основную роль в метаболизации сахарозы в ксилеме обычной березы играет СС: ее активность в 9 раз выше активности АпИнв (рис. 15). УДФ-глюкоза, образующаяся в ходе сахарозосинтазного расщепления сахарозы, служит субстратом для синтеза β -(1 \rightarrow 4)-глюкановых цепей целлюлозы (Amor et al., 1995; Coleman et al., 2009; Ruan 2014).

Формирование аномальной узорчатой древесины карельской березы происходит на фоне сравнительно низкой активности СС в ксилеме (рис. 15), что сопровождается снижением содержания целлюлозы. Так, содержание целлюлозы в ксилеме обычной березы (41 %) превышало таковое у карельской березы (38 %). При этом активность АпИнв здесь была ~ в 2 раза выше, по сравнению с активностью СС, и ~ в 12 раз выше, чем у обычной березы (рис. 15).

Содержание сахарозы в ксилеме карельской березы достоверно не отличалось от такового у обычной березы, но 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. 15). В ксилеме узорчатых растений на фоне снижения содержания целлюлозы возрастает количество крахмала (рис. 15). 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/синтез 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 (Nägele et al., 2010; Slewinski, 2011). Работой этого механизма регуляции метаболизма сахаров, очевидно, можно объяснить сравнительно небольшие различия в содержании гексоз в тканях между обычной и карельской березой (рис. 15). По нашему мнению 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 данной связи следует отметить, что в аномальных участках древесины карельской березы вместо волокон и сосудов наблюдается активная дифференцировка клеток запасающей паренхимы.

Основная роль флоэмы заключается в проведении ассимилятов к местам их потребления. У обычной березы содержание сахарозы во флоэме было максимальным, по сравнению с другими органами и тканями, что хорошо согласуется с ее главной функцией. У карельской березы количество сахарозы во флоэме было соизмеримо с таковым в ксилеме. Активность АПИ_И во флоэме карельской березы была самой высокой, по сравнению с другими органами и тканями, и превосходила таковую у обычной березы в 2 раза (рис. 3). Известно, что в ситовидных трубках инвертаза отсутствует (Курсанов, 1976), поэтому выявленную активность инвертазы следует относить к паренхимным клеткам. Высокая активность АПИ_И 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, по сравнению с

обычной березой, во флоэме содержание крахмала было в 5 раз больше (рис. 2), что согласуется с большей (в 1.6 раз) у нее активностью во флоэме СС (рис. 3), которая принимает активное участие в синтезе крахмала (Winter, Huber, 2000; Baroja-Fernández et al., 2003; Kladnik et al., 2005; Patrick et al., 2013 и др.).

Интенсивное расщепление сахарозы в апопласте и ее выведение из обмена через синтез крахмала должны приводить к уменьшению концентрации дисахарида в ткани. Действительно, у карельской березы количество сахарозы во флоэме было в 2.3 раза меньше, по сравнению с обычной березой (рис. 2). Как и в ксилеме, во флоэме карельской березы интенсивная утилизация сахарозы коррелировала с повышенной паренхиматизацией ткани. Формирование клеток паренхимы в этом случае происходит как в результате дифференцировки производных камбия, так и за счет активных повторных делений ранее сформированных паренхимных клеток. Из сказанного можно заключить, что утилизация в ткани большого избытка сахарозы возможна в результате изменения основного направления ее метаболизации: вместо преимущественного использования дисахарида на синтез компонентов клеточных стенок с последующим отмиранием протопласта наблюдается синтез запасных питательных веществ, что сопровождается формированием запасяющей ткани – паренхимы. Следствием такой перестройки метаболизма является сохранение и, вероятно, даже усиление аттрагирующей силы тканей ствола. Последнее должно находить отражение в структурно-функциональных особенностях донора фотоассимилятов, в нашем случае – листьев БР. Как было указано ранее, листья БР у карельской березы имеют более крупные размеры, по сравнению с аналогичными побегами обычной березы (Николаева, 2004; Николаева, Новицкая, 2007), что предполагает синтез в них большего количества сахарозы.

Проведенное исследование показало, что формирование нормальной по строению древесины обычной березы, в составе которой преобладают сосуды и волокна, происходит на фоне высокой активности СС и сопровождается активным синтезом структурных компонентов клеточных стенок. У березы, как и у других древесных растений, при интенсивной дифференцировке водопроводящих и механических элементов ксилемы СС является основным ферментом, участвующим в утилизации

притекающей сахарозы. Мембраносвязанная форма СС входит в состав целлюлозосинтазного комплекса, где УДФ-глюкоза сразу вовлекается в синтез целлюлозы, благодаря чему сахара необратимо выводятся из обмена веществ. Соответственно, в нормальной по строению древесине березы повислой мы наблюдали более высокое содержание целлюлозы.

Дифференциация производных камбия в паренхимные клетки, являющиеся основными анатомическими элементами в зонах структурных аномалий узорчатой древесины карельской березы, происходит на фоне низкой активности СС и сопровождается уменьшением содержания целлюлозы на единицу массы ксилемы. В образующихся паренхимных клетках накапливается большое количество запасных продуктов, основным из которых на первых этапах утилизации сахарозы является крахмал. У карельской березы акцепторная сила тканей ствола поддерживается благодаря интенсивной утилизации сахарозы в паренхимных клетках флоэмы апопластной инвертазой. Интенсивное расщепление сахарозы в апопласте способствует разгрузке ситовидных элементов и поддерживает концентрационный градиент фотоассимилятов между донором (фотосинтезирующие листья) и акцептором (камбиальная зона), регулируя тем самым дальний транспорт сахаров. Наши данные свидетельствуют о том, что изменение программы развития производных камбия у карельской березы, а именно, дифференцировка клеток паренхимы вместо волокон и сосудов ксилемы и ситовидных трубок флоэмы, связано с увеличением потребления сахарозы. Это коррелирует с увеличением площади донорных органов – листьев БР.

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

Несмотря на то, что предрасположенность к нарушению обмена веществ – наследуемый признак, проявление его при плюсовой селекции карельской березы происходит не у всех особей потомства. 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; Ветчинникова, 2005; Новицкая, 2008). Показательно, что даже у узорчатых растений, составляющих в среднем 50-70% от общего числа потомков, широко варьирует степень развития узора, а, следовательно, и хозяйственная ценность растений. Нас интересовало выявление взаимосвязи между степенью узорчатости древесины и распределением метаболитов углеводной природы и активностью ферментов утилизации сахарозы в камбиальной зоне карельской березы.

3.4.1. Распределение активности сахарозосинтазы и апопластной инвертазы, содержание сахаров и крахмала в тканях ствола 6-летних растений карельской березы с разной степенью узорчатости древесины

Исследование проводили в период активного роста на растениях с разной степенью узорчатости древесины: (1) ярко выраженные аномалии равномерно распределены по всему стволу (сильный узор, рис. 16Г), (2) растения со средней степенью узорчатости древесины (средний узор, рис. 16В) и (3) растения, у которых узор выражен слабо и встречается только в некоторых участках ствола (слабый узор, рис. 16Б). Для сравнения использовали растения обычной березы (рис. 16А).

Активность АПИ_{нв} во флоэме коррелировала со степенью узорчатости (коэффициент корреляции Спирмена $\rho=0.95$, при $p<0.05$), так ее значения в ряду: "обычная береза – слабый узор – средний узор – сильный узор" составили 24 – 30 – 47 – 84 мкмоль сахара на г сырой ткани.

– *B. pendula* var. *pendula*

 – *B. pendula* var. *carelica* с разной степенью узорчатости ствола

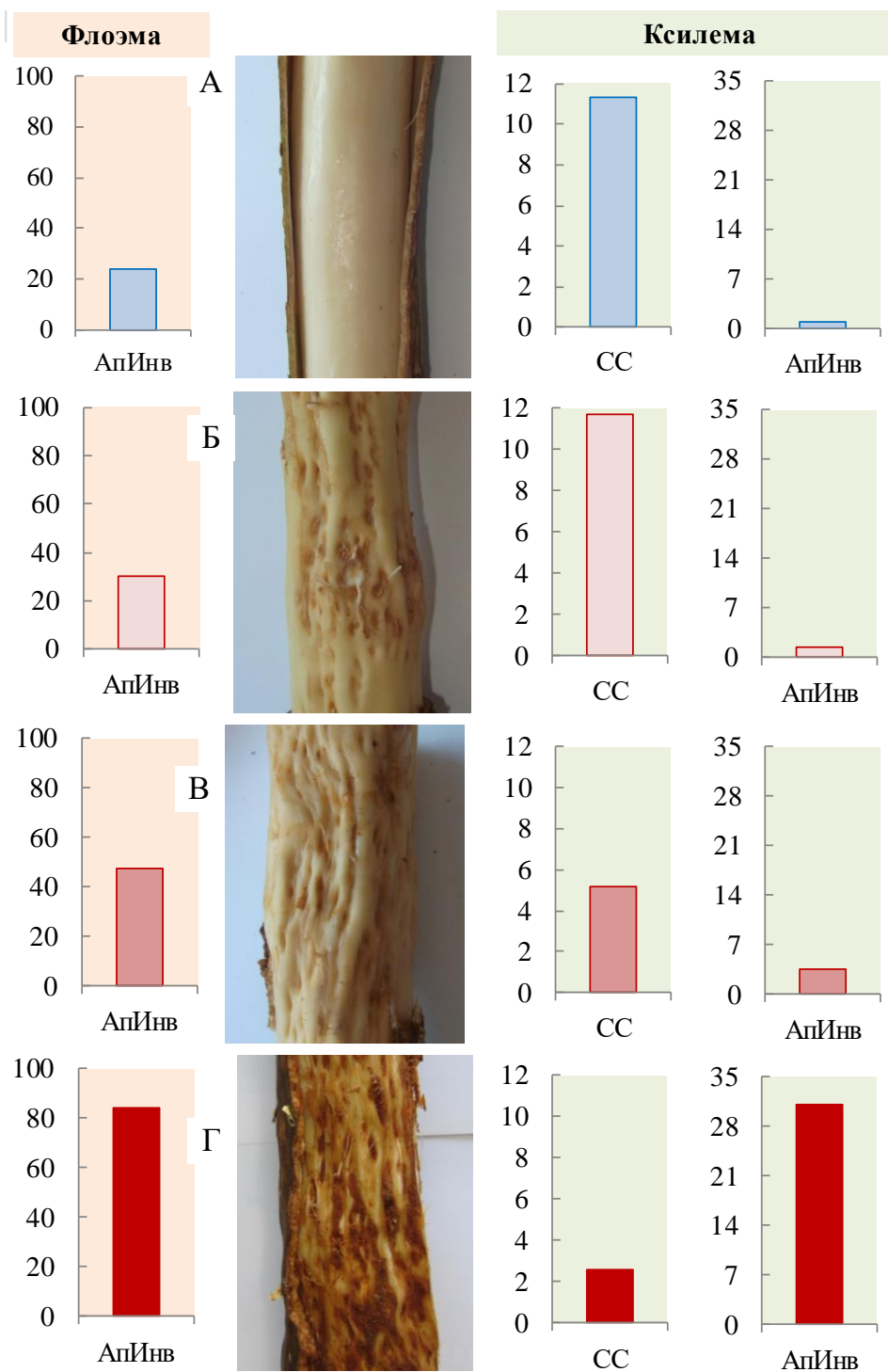


Рисунок 16. Активность апопластной инвертазы (АпИнва) и сахарозсинтазы (СС) (мкмоль сахарозы на г ткани) в тканях ствола обычной (А) и карельской (Б-Г) березы в период камбиального роста. Б – слабый узор, В – средний узор, Г – сильный узор

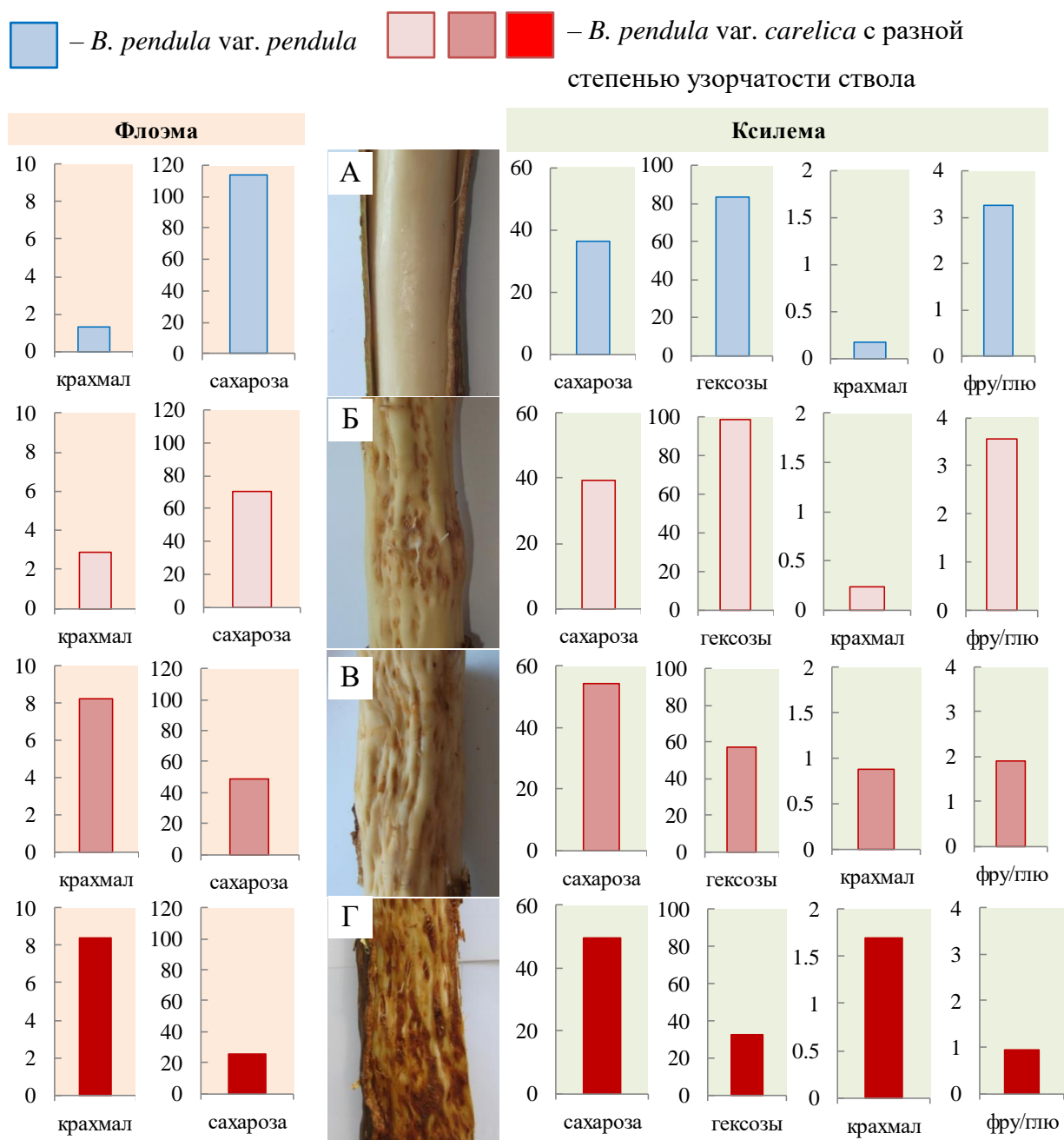


Рисунок 17. Содержание сахаров, и крахмала в тканях ствола и соотношение фруктоза/глюкоза в ксилеме у 6-летних растений обычной (А) и карельской (Б-Г) березы в период камбиального роста. Б – слабый узор, В – средний узор, Г – сильный узор.

Для АПИнв в тканях ксилемы распределение активности фермента в ряду увеличения узорчатости растения было подобным: 1 – 1.3 – 3.6 – 30 мкмоль сахара на г сырой ткани ($\rho=0.82$, при $p<0.05$). На фоне увеличения активности апопластного фермента в ксилеме при увеличении степени узорчатости растения происходило

снижение активности СС ($\rho=-0.93$, при $p<0.05$), значения ее составили: 2.5 – 5.1 – 11.7 – 13.2 мкмоль сахара на г сырой ткани (рис. 16).

Таким образом, с увеличением степени узорчатости происходит снижение утилизации сахарозы в дифференцирующейся ксилеме по СС-пути, что сопровождается возрастанием расщепления сахарозы с помощью А π И ν во флоэме и ксилеме. При этом возрастает содержание запасного соединения – крахмала, как во флоэме, так и в ксилеме. В ряду растений "обычная береза – слабый узор – средний узор – сильный узор" количество его составило 1.3, 2.9, 8.3, 8.4 и 0.17, 0.23, 0.88, 1.7 мг/г во флоэме и ксилеме соответственно (рис. 17).

У высокоузорчатой карельской березы (рис. 16Г) ростовые процессы сосредоточены преимущественно во флоэме. Об этом свидетельствуют приведенные ниже данные. У обычной березы величина градиента концентрации сахарозы между флоэмой и ксилемой (114 мг/г – 36 мг/г = 78 мг/г) (рис. 10А) существенно больше, чем у карельской березы. В ряду растений "слабый узор – средний узор – сильный узор" он составил 32 мг/г (71 мг/г – 39 мг/г), -5 мг/г (49 мг/г – 54 мг/г), -23 мг/г (26 мг/г – 49 мг/г) соответственно (рис. 17). О снижении интенсивности ростовых процессов в камбиальной зоне с увеличением степени узорчатости древесины свидетельствует уменьшение содержания гексоз ($\rho=-0.853$, при $p<0.05$). При этом изменяется соотношение фруктоза/глюкоза (рис. 17). На растениях *Scots pine* (Uggla et al., 2001), *Sasa palmate* (Magel et al., 2006) и на других объектах неоднократно было показано, что в камбии в период активного роста содержание фруктозы значительно превышает содержание глюкозы, из чего следует, что в зонах активного деления и растяжения клеток глюкоза быстрее расходуется в метаболических процессах. В зоне утолщения клеточных оболочек, где рост клеток уже прекращается, отношение фруктоза/глюкоза становится равным 1 (Uggla et al., 2001; Magel et al., 2006). На отношение фруктоза/глюкоза также влияет соотношение активностей И ν и СС, поскольку И ν дает одинаковый выход глюкозы и фруктозы, а СС образует только фруктозу. В ряду растений "обычная береза – слабый узор – средний узор – сильный узор" в ксилеме

отношение фруктоза/глюкоза составило 3.2, 3.6, 1.9, 1 (рис. 17), что указывает на снижение интенсивности ростовых процессов со стороны ксилемы с увеличением степени узорчатости древесины.

3.4.2. Метаболизация сахарозы в камбиальной зоне 25-летних растений карельской березы, произрастающих в лесных культурах

Исследования проводили на 25-ти летних деревьях карельской березы, произрастающих на лесосеменной плантации (Медвежьегорский район, Республика Карелия). Территория исследования относится к таежной лесорастительной зоне (среднетаежный район европейской части России). Все растения были выращены из семян, полученных из семян от контролируемого опыления плюсовых деревьев карельской березы. Образцы для анализа отбирали с высокоствольных узорчатых растений карельской березы и растений, у которых признак узорчатости не проявился. Узорчатые особи карельской березы на исследуемых участках обладали высоким уровнем индивидуальной изменчивости по расположению и плотности рисунка на стволе. Поэтому все растения были поделены на группы по степени проявления узорчатости, согласно способу диагностики узорчатой текстуры древесины, предложенному В.И. Ермаковым (1986). Каждой группе растений был присвоен балл от 0 до 3. К первой группе (0 баллов) отнесли растения, не имеющие углублений на поверхности древесины (деревья с прямослойной древесиной), ко второй (1 балл) – имеющие 1-3 углубления на 1 см² (редкий рисунок), в третью группу (2 балла) попали растения с 4-6 углублениями на 1 см² (плотный рисунок) и в четвертую (3 балла) особи с 7 и более углублениями на 1 см² (очень плотный рисунок) (рис. 18). Число растений в 1-4 группе составило 10, 7, 7 и 5 соответственно. Отбор образцов (начало июля 2016 г.) пришелся на период активного утолщения клеточной стенки.

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 сахарозы / мг белка в ксилеме и во флоэме соответственно); существенное расщепление

сахарозы в апопласте наблюдалось только в тканях флоэмы (активность АПИИв 6 мкмоль/г сырой ткани) (рис. 18).

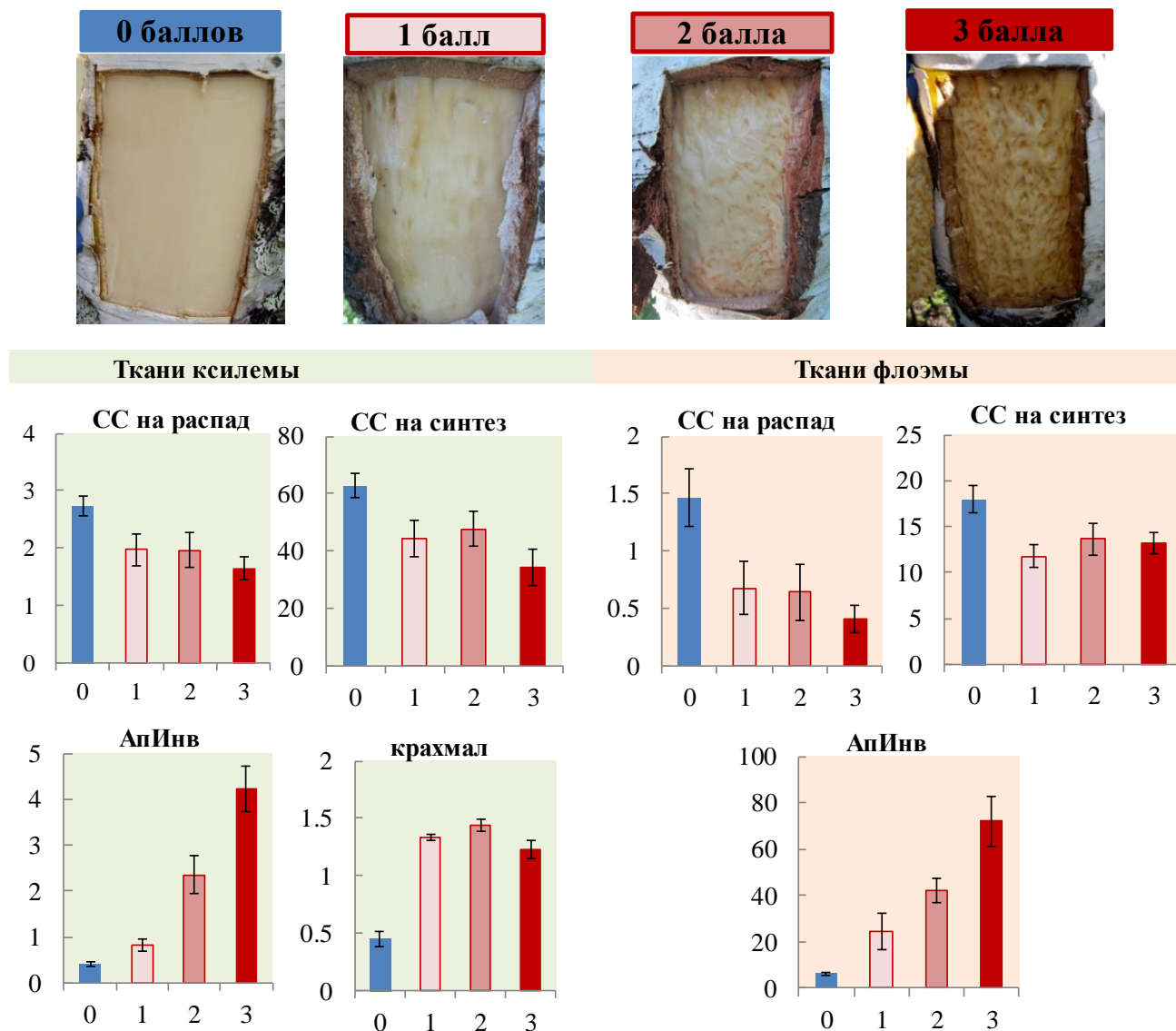


Рисунок 18. Активность сахарозосинтазы (СС, мкмоль сахарозы / мг белка) и апопластной инвертазы (АПИИв, мкмоль сахарозы / г сырой ткани) и содержание крахмала (мг/г) в ксилеме деревьев карельской березы, произрастающих на лесосеменной плантации (Заонежье). Степень узорчатости древесины обозначена в баллах от 0 до 3. Представлены средние значения десяти (0 баллов), семи (1, 2 балла) и пяти (3 балла) повторностей и их стандартные ошибки. Различия значимы при $p < 0.05$.

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. 18).

На фоне снижения активности СС повышалась активность АpИ_{нв} 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. 18).

Корреляция между баллом узорчатости и активностью ферментов метаболизации сахарозы была обнаружена только для АpИ_{нв}, как во флоэме ($\rho=0.99$, при $p<0.01$), так и в ксилеме ($\rho=0.97$, при $p<0.05$). Активность СС, как в сторону распада, так и в сторону синтеза сахарозы, была выше у безузорчатых растений, по сравнению с узорчатыми. Существенных отличий между растениями с разной степенью узорчатости древесины по активности СС не обнаружено. Как и у 6-летних растений, снижение активности СС и возрастание активности АpИ_в сопровождалось увеличением содержания крахмала в ксилеме. Причем отличия в количестве полисахарида отмечались между безузорчатыми и узорчатыми растениями карельской березы, среди растений с разной степенью аномального строения тканей таковых не было (рис. 18).

3.4.3. Метаболизация сахарозы в камбиальной зоне узорчатых и безузорчатых участков одного ствола 11-летних растений карельской березы.

Проведенные исследования показали, что в период активного камбия усиления ее расщепления по апопластному пути зависит от степени узорчатости растения. В связи с этим возникает вопрос: повышенная активность АpИ_{нв} наблюдается локально, в местах образования узора, или равномерно по всему стволу растения? Для ответа на него изучили активность ферментов метаболизации сахарозы и ее содержание в зонах роста и дифференциации ксилемы и флоэмы в узорчатых и безузорчатых участках одного и того

же ствола 11-летних деревьев карельской березы. Для контроля использовали растения обычной березы.

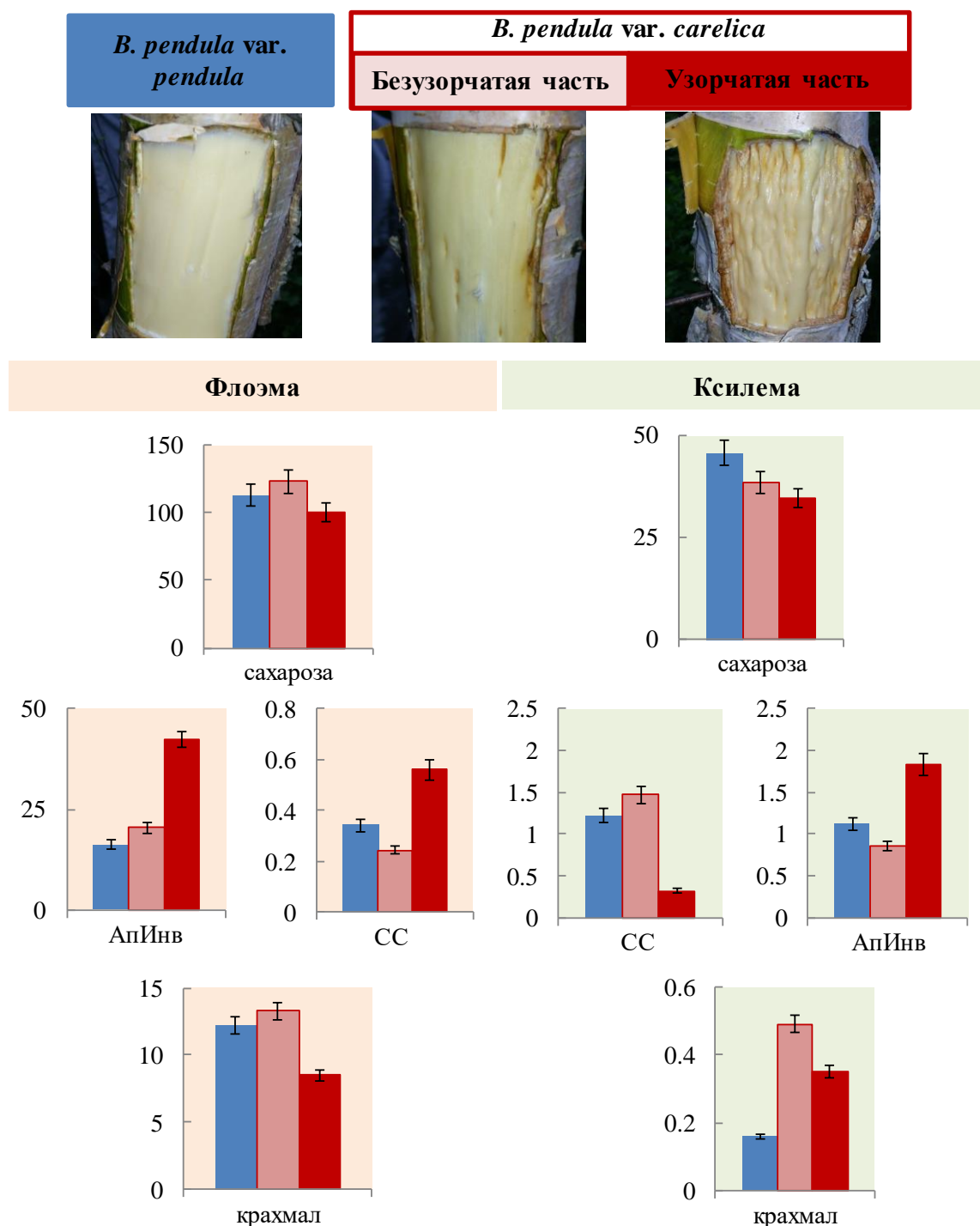


Рисунок 19. Активность апопластной инвертазы (АпИInv, мкмоль сахарозы/г ткани), сахарозосинтазы (СС, мкмоль сахарозы/мг белка) и содержание крахмала (мг/г сухой ткани) у 11-летних растений *B. pendula var. pendula* и *B. pendula var. carelica* в узорчатых и безузорчатых участках одного ствола. Представлены средние значения пяти повторностей и их стандартные ошибки.

В камбиальной зоне обычной березы, по сравнению с узорчатой частью ствола карельской березы, выявленные метаболические отличия подобны тем, что были показаны ранее (разделы 3.1-3.3). Во флоэме на фоне большего (в 1.2 раза) содержания сахарозы, ниже активность ферментов ее утилизации – АпИнв (в 2,6 раз) и СС (в 1.6 раз), при этом, в ксилеме утилизация сахарозы выше в 3.8 раз по СС-пути и ниже в 1.6 раз по апопластному пути, и возрастает в 2.2 раза количество крахмала (рис. 19).

В безузорчатой части ствола карельской березы активность АпИнв 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 (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. 19). В период камбиального роста у обычной березы в ксилеме запасание крахмала происходит слабо. Его содержание не превышало 0.2 мг/г сухой ткани. Низкие значения содержания крахмала в ксилеме наблюдаются на фоне высокой активности в них СС. В ксилеме узорчатых деревьев карельской березы накапливалось большое количество крахмала (0.5 и 0.4 мг/г в безузорчатой и узорчатой частях ствола соответственно). Накопление крахмала в безузорчатой части ствола происходит на фоне высоких значений активности СС, в узорчатой части, напротив, – на фоне снижения активности фермента (рис. 19).

Таким образом, формирование узорчатой древесины карельской березы происходит на фоне существенного снижения активности СС в ксилеме. Акцепторную силу камбиальной зоны в данном случае поддерживает высокая активность АпИнв в ксилеме и, особенно, во флоэме. Образующиеся при этом в большом количестве гексозы интенсивно расходуются на синтез запасного метаболита – крахмала. Увеличение узорчатости древесины коррелирует с возрастанием метаболизации сахарозы по апопластному пути. В стволе узорчатых растений в период камбиального роста изменение соотношения активностей СС и АпИнв в сторону последней наблюдаются

локально, только в местах аномалий. В безузорчатых участках ствола узорчатых растений карельской березы активность СС значимо выше, не только по сравнению с узорчатыми участками ствола того же дерева, но и относительно обычной березы. Повышенная активность СС обеспечивает расходование сахарозы на процессы образования вторичной клеточной стенки. На трансгенных растениях тополя показано, что сверхэкспрессия генов СС влияет на утолщение вторичных клеточных стенок ксилемы и приводит к увеличению прочности древесины (Coleman et al., 2009). У трансгенных растений табака сверхэкспрессия СС приводит к усилению запроса на сахарозу со стороны акцепторов, увеличению фотосинтетического образования сахарозы в листьях и, как следствие, возрастанию содержания дисахарида и крахмала в акцепторных тканях (Nguyen et al., 2016). Поскольку в безузорчатых участках ствола карельской березы запасается крахмал, можно заключить, что высокая активность СС наблюдается на фоне высокого содержания сахаров в тканях.

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

Формирование узорчатости древесины у карельской березы обычно начинается в возрасте от 5-6 до 14-15 лет (Новицкая, 2008). Любому морфологическому проявлению должны предшествовать перестройки в обмене веществ, которые, как правило, не проявляются визуально. Известно, что общие изменения возникают на основе свойственного данному виду растения генетически обусловленного хода жизненных процессов в онтогенезе, но они могут существенно варьировать под влиянием внешних условий. Именно на ранних этапах онтогенеза ярко проявляется готовность организма специфически реагировать на то или иное индуцирующее воздействие, как внутренней, так и внешней среды. В данной связи мы провели исследование ряда показателей углеводного обмена на сеянцах обычной и карельской березы.

3.5.1. Динамика неструктурных углеводов в органах и тканях двухлетних сеянцев *Betula pendula* и *B. pubescence* на ранних этапах онтогенеза

Изучение содержания метаболитов углеводной природы в органах и тканях сеянцев двух форм березы повислой (обычной и карельской березы) провели в периоды активного камбиального роста и подготовки растения к состоянию покоя. Для получения межвидовой сравнительной характеристики использовали растения березы пушистой. Сеянцы были выращены из семян, полученных в результате контролируемого опыления (Финляндия), они росли в одинаковых почвенно-климатических условиях на Агробиологической станции Карельского научного центра РАН. Возраст исследуемых растений – 2 года. На этом этапе онтогенеза у растений карельской березы еще не выражены признаки узорчатой древесины. Во все даты отбора на биохимический анализ брали по 10-15 растений каждой формы березы повислой и березы пушистой.

Отбор образцов проводили в течение вегетационного сезона 2008 года:

- середина мая - раскрывание почек (активный транспорт метаболитов из паренхимных клеток тканей ствола в сосуды ксилемы и по ним вверх к распускающимся почкам).

- конец июня – период камбиального роста на фоне интенсивного роста ауксибластов и формирования на них листьев второго поколения;

- середина июля – период активного камбиального роста, формирование вторичной клеточной стенки, клетки ксилемы становятся основной аттрагирующей зоной дерева, ориентирующей на себя поток фотоассимилятов;

- середина ноября – период затухания всех ростовых процессов, торможение транспортных потоков, идет подготовка растений к состоянию покоя.

В конце сезона (ноябрь) у исследуемых растений изучили некоторые структурные особенности древесины и коры. Анатомические исследования показали, что в средней части коры по окружности поперечного среза стебля имеет место кольцо из склереид – клеток с очень толстыми лигнифицированными оболочками. Толщина этого кольца у исследуемых растений значительно различалась. В коре карельской березы склереид было существенно больше, чем у обычной березы. Кроме того, в одних случаях кольцо было непрерывным (карельская и обычная береза), в других прерывистым (береза пушистая). В древесине карельской березы было больше сосудов, причем в древесине первого года жизни. Гистохимическое окрашивание препаратов крезилловым прочным фиолетовым позволило нам судить о степени лигнификации клеточных оболочек. В частности, появление синей окраски у оболочек сосудов ксилемы карельской березы свидетельствовало о большей степени их лигнификации. У березы пушистой степень лигнификации клеточных оболочек сосудов ксилемы была меньше, по сравнению с таковым показателем у березы повислой (табл. 2).

Изучение динамики неструктурных углеводов в течение весны – осени 2008 года в тканях и органах у двухлетних растений березы показало, что эти изменения находятся в тесной связи с температурными годовыми циклами, что неоднократно отмечалось в литературе (Piispanen, Saranpää, 2001; Groot, Wein, 2004; Saramäki, Hytönen, 2004; Pagter et al., 2008; Regieer et al., 2010).

Таблица 2. Некоторые анатомические характеристики коры и древесины 2-летних сеянцев березы

Вид и форма опытных растений	<i>B. pendula</i> var. <i>pendula</i>	<i>B. pendula</i> var. <i>carelica</i>	<i>B.</i> <i>pubescence</i>
Склерейды коры			
Прерывистость склерейдного кольца	Слой непрерывный	Слой непрерывный	Отдельные скопления
Максимальная толщина слоя, мкм	6.8 ± 0.4	10.3 ± 1.2	6.1 ± 0.2
Минимальная толщина слоя, мкм	2.2±0.2	4.3±0.6	1.3±0.3
Степень лигнификации оболочек	++	+++	+
Сосуды древесины			
Количество на площадь 50x30 мкм	17	23	19
Степень лигнификации оболочек	+++	+++	+

В середине мая изучаемые растения находились в фазе распускания почек. Лист березы становится донором ассимилятов после достижения 50% своего окончательного размера (Цельникер, Малкина, 1986), с этого момента начинается активный флоэмный транспорт ассимилятов. Следовательно, в мае у березы проводящая флоэма еще бездействует. Однако в это время идет интенсивный ксилемный транспорт. Вода восходящего ксилемного потока поступает в клетки и ткани всего ствола. При этом в цитоплазме паренхимных клеток, которыми особенно богата кора, активируется гидролиз запасных компонентов. В мае у всех исследуемых растений в тканях непроводящей флоэмы было самое высокое за весь сезон содержание крахмала ~ 28 мг/г у березы повислой и 17 мг/г у березы пушистой (рис. 20). Весной, при отсутствии фотосинтезирующих листьев, растение использует углеводный резерв коры и древесины (Piispanen, Saranpää, 2001; Groot, Wein, 2004; Saramäki, Hytönen, 2004; Percival, Barnes, 2007). Крахмал в этот период рассматривается как главный источник углерода и энергии для распускающихся почек (Галибина, 2003; Wong et al., 2003). Гидролиз полимерных компонентов в клетках коры приводит к повышению в них концентрации сахарозы. Основная масса сахарозы и полученные при ее расщеплении гексозы по градиенту

концентрации перемещаются по апопласту до сосудов ксилемы и с ксилемным потоком поступают к развивающимся листьям, главным акцепторам в этот период.

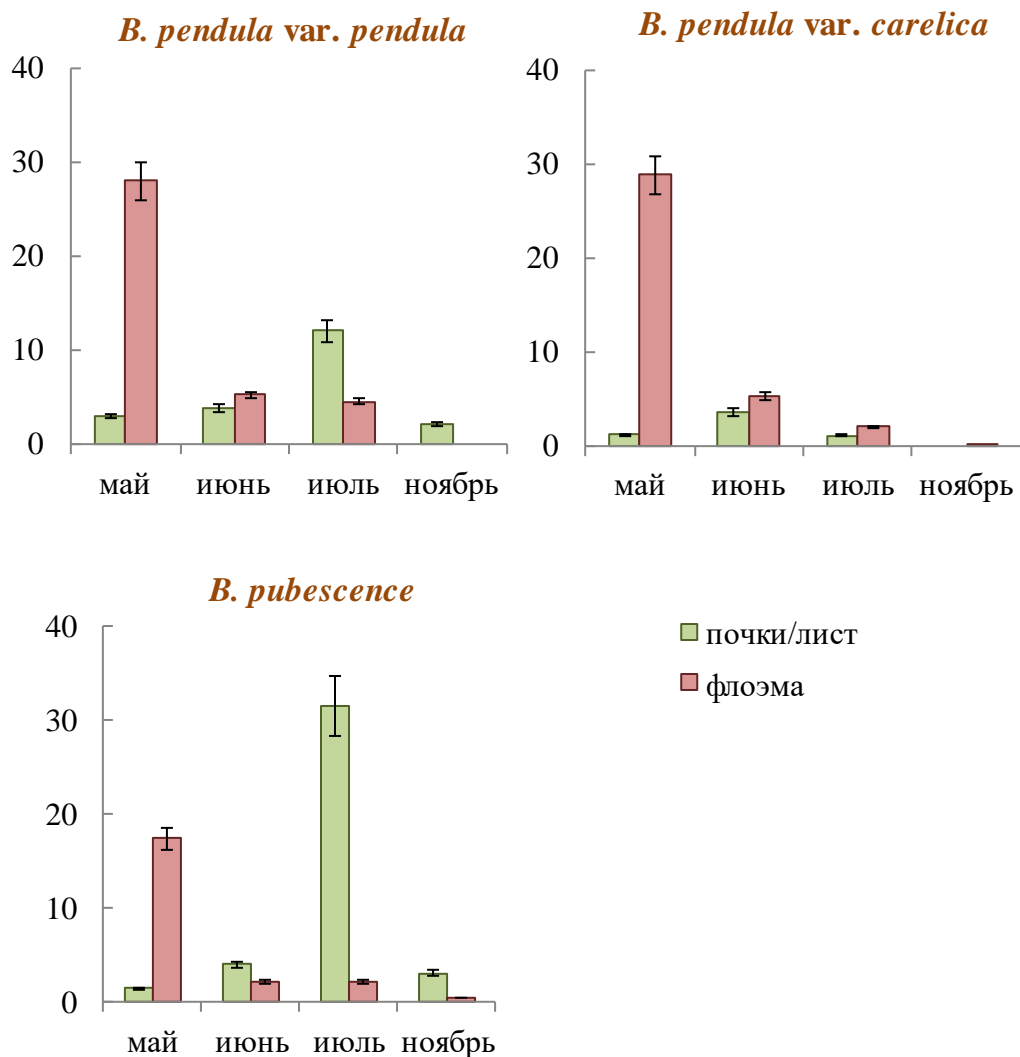


Рисунок 20. Содержание крахмала (мг/г сухой ткани) в почках (май, ноябрь), листьях (июнь, июль) и во флоэме 2-летних сеянцев березы в течение вегетационного сезона. Представлены средние значения десяти - пятнадцати повторностей и их стандартные ошибки.

У двух форм березы повислой, как содержание крахмала во флоэме (рис. 20), так и количество сахаров, поступающих из ствола в виде сахарозы к развивающимся почкам (рис. 21), значительно превосходит таковые у растений березы пушистой.

В период активных ростовых процессов (июнь, июль), основным донором ассимилятов в растении становятся фотосинтезирующие листья, из которых ассимиляты по флоэме транспортируются в стебель, где тратятся на рост и дифференциацию тканей флоэмы и ксилемы, на лигнификацию клеточных оболочек. У карельской березы в этот период в листьях на фоне высокого количества сахаров (рис. 21Б) не происходило накопления запасного полимера крахмала (рис. 20), что может быть связано с интенсивным оттоком метаболитов в стеблевую часть растения, где существенно повышалось количество сахаров за счет гексоз (рис. 21Д). Соотношение количества гексоз к сахарозе является важным показателем, характеризующим направленность метаболизма. Так, смещение этого соотношения в сторону накопления гексоз наблюдается в интенсивно растущих тканях (Sturm, Tang, 1999; Iraqi, Tremblay, 2001). На основании этого можно предположить, что у карельской березы в июле метаболизация сахарозы была выше в тканях флоэмы. Образующиеся гексозы являются субстратом для внутриклеточных синтезов не только углеводных полимеров, но и соединений липидной и фенольной природы. Окраска крезильовым прочным фиолетовым продемонстрировала в коре карельской березы наличие большого количества сильно лигнифицированных склерид (табл. 2). В результате исследований 40-летних растений было обнаружено, что в тканях ксилемы карельской березы, по сравнению с обычной березой повислой, на фоне высокой активности пероксидазы (Галибина и др., 2013) выше жесткость структуры клеточной стенки за счет увеличения доли компонентов фенольной природы, как в составе лигнина, так и в виде поперечных диферуловых мостиков (Галибина, Терехова, 2014).

У обычной березы повислой и березы пушистой в июле в листьях на фоне повышения уровня сахаров (рис. 21А, В) происходило накопление крахмала (рис. 20). Первичный крахмал, образующийся при фотосинтезе, накапливается в хлоропластах в виде слоистых зерен различного размера. Высокое содержание крахмала в листьях в июле может свидетельствовать об интенсивном фотосинтезе листьев, а также о том, что не все образующиеся сахара оттекают в ствол, часть из них временно депонируется в хлоропластах в виде крахмала. В литературе не раз отмечалось, что временное

увеличение количества крахмала может быть связано со снижением акцептирующей силы тканей (Wong et al., 2003). У обычной березы повислой накопление крахмала в листьях происходило на фоне высокого содержания сахаров в тканях ствола (рис. 21 Г, Ж), основная часть которых в виде моносахаров равномерно распределялась по тканям флоэмы и ксилемы, с преобладанием в ксилеме, где в этот период идет активный рост и утолщение клеточных оболочек. Можно предположить, что у обычной березы значительная часть ассимилятов из листьев оттекает в стеблевую часть, при этом основная метаболизация сахарозы идет в тканях ксилемы.

У сеянцев березы пушистой в стебле, напротив, количество углеводов было невысоким (рис. 21 Е, И). Еще одна особенность, не наблюдающаяся у растений березы повислой, – это существенное повышение содержания сахарозы в листьях (рис. 21В). Смещение соотношения гексозы/сахароза в сторону увеличения количества дисахарида может указывать на увеличение функции запасаания (Wobus, Weber, 1999). Возможно, что у березы пушистой преобладание метаболизации сахарозы в листе является причиной меньшего ее содержания в тканях стебля. Это, в свою очередь, приводит к формированию ксилемы с меньшей степенью лигнификации клеточных оболочек (табл. 2).

Переход растений к состоянию покоя сопровождался повышением сахаров в тканях стебля, что вероятно, связано с созданием зимнего резерва (Piispanen, Saranpää, 2001; Groot, Wein, 2004; Saramäki, Hytönen, 2004; Percival, Barnes, 2007). Больше количество сахаров к началу зимы отмечалось у березы пушистой (рис. 21 Е, И). Ареал березы пушистой распространяется на Север дальше ареала березы повислой, что способствует формированию у нее особых механизмов морозоустойчивости, связанных, в частности, с накоплением веществ, обладающих криопротекторными свойствами. Таким образом, интенсивный отток сахаров в ткани ствола у березы пушистой в конце сезона, можно рассматривать как защитный механизм от образования внутриклеточного льда и от обезвоживания в экстремальных условиях Севера.

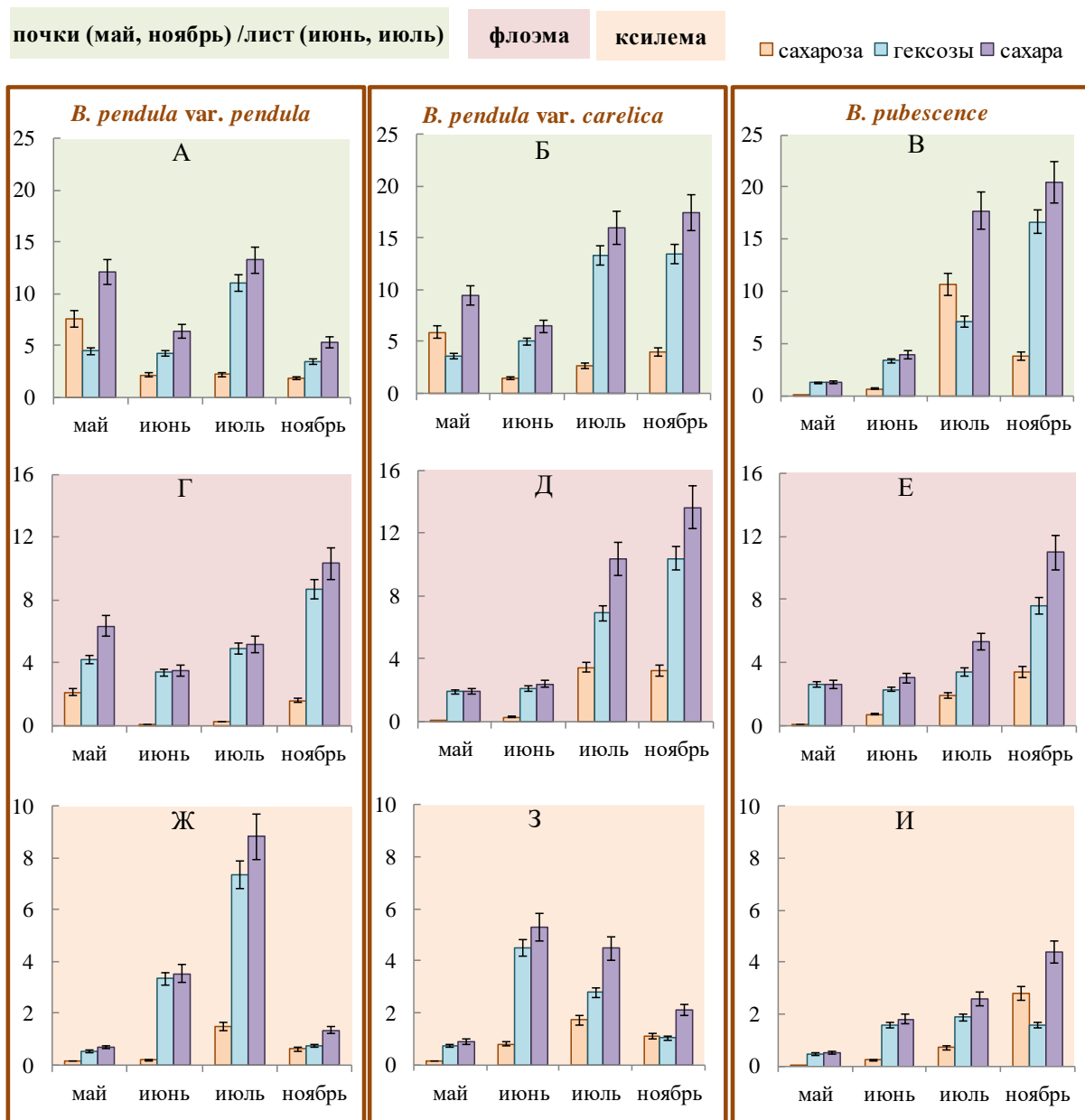


Рисунок 21. Содержание сахарозы, гексоз и других сахаров (мг/г сухой ткани) в почках (май, ноябрь) / листьях (июнь, июль) (А, Б, И), во флоэме (Г, Д, Е) и ксилеме (Ж, З, И) 2-летних сеянцев березы в течение вегетационного сезона. Представлены средние значения десяти - пятнадцати повторностей и их стандартные ошибки.

Таким образом, наши данные показывают, что береза повислая и береза пушистая уже на ранних этапах онтогенеза различаются между собой по стратегии распределения метаболитов. У берёзы пушистой в период активного камбиального роста аттрагирующая сила стебля, вероятно, слабее, что в свою очередь, приводит к

накоплению углеводов в листьях. В результате, в стебле формируются менее лигнифицированные клетки ксилемы, по сравнению с березой повислой. У берёзы повислой обеих форм на протяжении всего периода активного камбиального роста мощным аттрагирующим центром является стебель, и формирование его проводящей системы, очевидно, идёт на фоне высокого метаболического статуса. У обычной березы повислой равномерное распределение моносахаров по тканям стебля сопровождается формированием толстостенных сосудов ксилемы с сильно лигнифицированными клеточными стенками. У карельской березы интенсивное накопление сахарозы происходит в тканях флоэмы. Предполагается, что повышение в период активного камбиального роста у карельской березы во флоэме сахаров может нарушать камбиальную деятельность, приводя в будущем к формированию структурных аномалий древесины.

3.5.2. Утилизация сахарозы в акцепторных органах у растений обычной березы повислой и карельской березы на начальных этапах онтогенеза

Исследование проводили на 7- и 17-недельных сеянцах, выращенных из семян обычной березы повислой и карельской березы. Высота надземной части 7-недельных сеянцев составила 3-5 см, а 17-недельных сеянцев – примерно 25 см.

Транспорт сахарозы из фотосинтезирующих листьев контролируется способностью акцепторов к ее расщеплению, что поддерживает градиент дисахарида. В повышении акцепторной силы органа важную роль играют апопластная инвертаза (Koch, 2004; Iraqi et al., 2005; Godt, Roitsch, 2006; Canam et al., 2008; Barratt et al., 2009 и др.) и сахарозосинтаза (Godt, Roitsh, 2006; Coleman et al., 2008; Nilsson et al., 2010 и др.). В акцепторных органах как 7-недельных, так и 17-недельных растений активность данных ферментов значимо выше по сравнению с другими сахарозорасщепляющими ферментами (ВаКИнв, ЦпИнв) (рис. 22).

У 7-недельных растений обеих форм березы повислой основным потребляющим органом является корень (метаболизация сахарозы в корнях выше, по сравнению со стеблем) (рис. 22). Высокая акцепторная сила корня поддерживается в основном за счет

активности СС, что согласуется с литературными данными (Никитин, Измайлов, 2016). У обычной березы активность СС в корне достигала 44 мкмоль сахарозы / г сырой ткани, что в 2.2 раза больше, чем в стебле. У карельской березы метаболизация сахарозы в корнях за счет активности СС (88 мкмоль сахарозы / г сырой ткани) была в 3 раза больше, чем в стебле (рис. 22). СС присутствует в растении повсеместно, но наибольшая ее активность обнаружена в молодых растущих тканях (Coleman et al., 2008, 2009). В результате деятельности СС углерод расходуется на построение клеточных структур (Amor et al., 1995; Sturm, Tang, 1999; Winter, Huber, 2000; Ruan et al., 2003) и необратимо выводится из метаболизма. Таким образом, у сеянцев березы повислой СС – основной фермент, создающий акцепторную силу гетеротрофных тканей.

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. На 11-летних растениях карельской березы мы показали, что наибольшая активность СС на фоне интенсивного протекания ксилогенеза наблюдается в ксилеме безузорчатых участков ствола узорчатых растений (раздел 3.4).

В отличие от корня, в стебле наблюдалась высокая степень утилизации дисахарида по инвертазному пути, в основном за счет работы АпИнв (10 мкмоль сахарозы / г сырой ткани), а также ВакИнв (2.4 мкмоль сахарозы / г сырой ткани) и ЦитИнв (0.9 мкмоль/г сырой ткани). В корнях активность инвертаз была меньше в 1.5-2 раза (рис. 22).

У 17-недельных сеянцев обычной березы, по сравнению с 7-недельными растениями, интенсивность метаболизации сахарозы возрастает, особенно в надземной части. Так, в стебле 17-недельных сеянцев активность СС выше в 7 раз (139 мкмоль сахарозы / г сырой ткани), активность АпИнв в 3.6 раз (37 мкмоль сахарозы / г сырой ткани) и активность ЦитИнв в 2.3 раза (3.3 мкмоль сахарозы / г сырой ткани). В корнях к 17-ти неделям активность СС возрастает в 2.5 раза, ее значение достигает 111 мкмоль сахарозы / г сырой ткани (рис. 22).

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, ее значение достигает 54 мкмоль сахарозы / г сырой ткани. В корнях, отмечается снижение активности СС до 20 мкмоль сахарозы / г сырой ткани (рис. 22).

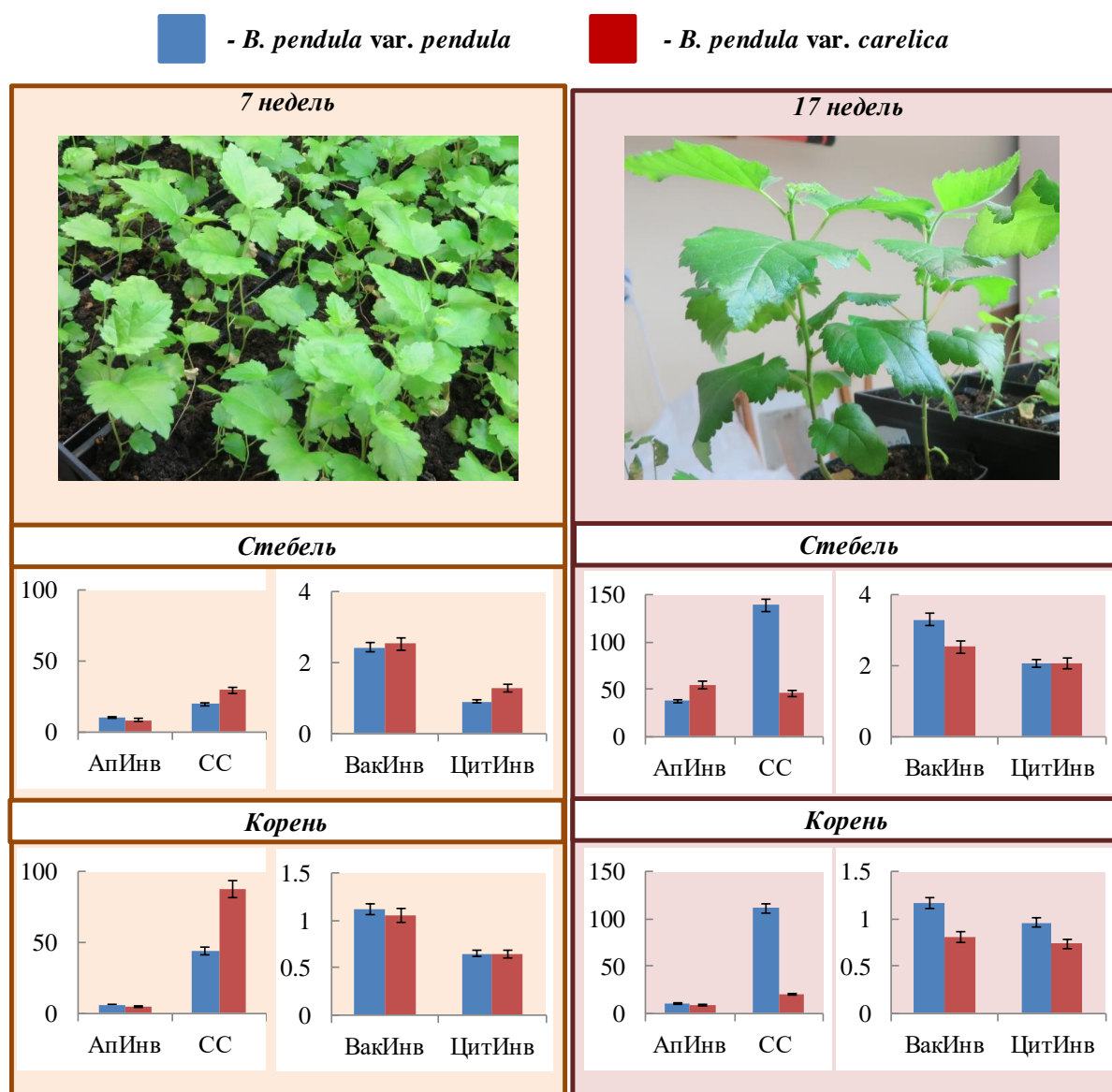


Рисунок 22. Активность апопластной инвертазы (АпИInv), вакуолярной инвертазы (ВаkИInv), цитоплазматической инвертазы (ЦитИInv) и сахарозосинтазы (СС) (мкмоль/г сырой ткани) в стебле и корне 7- и 17-недельных сеянцев обычной березы (*B. pendula* var. *pendula*) и карельской березы (*B. pendula* var. *carelica*).

Из представленных данных можно заключить, что у исследуемых растений на определенном этапе развития произошла смена основного акцептора ассимилятов. Если у 7-недельных сеянцев таким органом был корень, то уже в возрасте 17 недель основным акцептором ассимилятов становится стебель. Это коррелирует с положением о том, что аттрагирующая способность стебля возрастает по мере роста и развития древесных растений, при этом клеточные стенки ксилемы становятся основными аккумуляторами биомассы (Антонова, 2011).

У 17-недельных сеянцев обычной березы, как и у 7-недельных растений, в стебле и в корне выше активность СС, а активность АпИнв значительно ниже (рис. 22). 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). Таким образом, в стебле карельской березы уменьшение метаболизации сахарозы по сахарозосинтазному пути компенсируется увеличением ее утилизации по инвертазному пути. Эти закономерности согласуются с данными, полученными на взрослых деревьях (разделы 3.1-3.4).

Таким образом, уже на ранних этапах развития у двух форм березы повислой наблюдаются различия в путях метаболизации дисахарида. У обычной березы сахаразы преимущественно расходуется на синтез клеточных стенок дифференцирующихся структурных элементов ксилемы. У карельской березы наблюдается более низкая активность ферментов с внутриклеточной локализацией (СС, ВакИнв, ЦитИнв) и высокая активность АпИнв, что свидетельствует о расщеплении сахаразы в апопласте и накоплении гексоз, которые, являясь сигнальными молекулами, могут участвовать в реализации морфогенетических эффектов, лежащих в основе аномального ксилогенеза карельской березы. Повышенная активность АпИнв в стебле карельской березы на фоне сниженной активности СС подтверждает высказанные другими авторами предположения (Gerber et al., 2014; Barratt et al., 2009) о возможном участии инвертазы в синтезе компонентов клеточных стенок.

У растений карельской березы разного возраста, обладающих узорчатой древесиной и без признаков структурных аномалий тканей ствола, изучены особенности распределения активности ферментов, утилизирующих сахарозу, в процессе формирования ксилемы и флоэмы. Соотношение активностей разных форм Инв и СС определяет преимущественное включение расщепляемой ими сахарозы в те или иные метаболические пути и, как следствие, оказывает влияние на направление дифференциации производных камбия (Carlson, Chourey, 1999; Sturm, Tang, 1999; Maurel et al., 2004; Iraqi et al., 2005; Cho et al., 2005; Koonjul et al., 2005; Godt, Roitsch et al., 2000; Восock et al., 2008; Canam et al., 2008; Jia et al., 2008; Barratt et al., 2009; Welham et al., 2009). Проведенное исследование позволило выявить существенные отличия в путях метаболизации сахарозы в тканях ствола обычной березы и карельской березы в период камбиального роста. Наиболее важными из них являются: (1) формирование древесины обычной березы идет на фоне высокой активности СС, и, следовательно, синтеза УДФ–глюкозы и фруктозы; (2) у карельской березы активность СС в ксилеме понижена, в то же время имеет место высокая активность АпИнв в ксилеме и, особенно, во флоэме, что ведет к усиленной генерации в них гексоз (рис. 23).

Полученные данные свидетельствуют о том, что изменение программы дифференцировки клеток камбиальной зоны карельской березы, ведущее к повышению степени паренхиматизации проводящих тканей, связано с интенсивным гидролизом сахарозы в апопласте. Повышенная активность АпИнв в тканях ствола карельской березы в период камбиального роста на фоне сниженной активности СС подтверждает высказанное другими авторами предположение (Gerber et al., 2014; Barratt et al., 2009; Bieniawska et al., 2007) о возможном участии инвертазы в синтезе компонентов клеточных стенок.

Микроскопический анализ показал, что в июне у обычной березы наблюдается нормальное для данного периода течение ростовых процессов – наибольшая их активность сосредоточена в ксилеме, из чего можно заключить, что основной поток поступающих ассимилятов (сахарозы) расходуется на прирост древесины. Во флоэме у обычной березы на фоне высокого содержания сахарозы, активность ферментов ее

метаболизации ниже, по сравнению с ксилемой. В нормальных по строению тканях ствола ситовидные трубки флоэмы имеют нормальную вертикально-тяжевую ориентацию, количество проводящих элементов и их просвет больше, по сравнению с аномальными участками. Это должно способствовать большему притоку сахаров к основному акцептору в этот период – камбиальной зоне. На разных по возрасту растениях показано, что содержание основной транспортной формы сахаров – сахарозы во флоэме в нормальных по строению тканях ствола выше, по сравнению с аномальными (рис. 9, 13, 15, 17, 19). В узорчатых участках ствола проводящие элементы имеют свилеватое строение, в зонах аномалий их количество уменьшено в связи с преимущественной дифференцировкой клеток паренхимы, просветы ситовидных трубок также существенно меньше, по сравнению с нормальными участками. Все это может быть причиной замедления в этих зонах потока сахарозы, что приводит к ее накоплению во флоэме, способствует выходу сахарозы в апопласт и повышению активности А_пИ_{нв}. В узорчатых тканях больше паренхимных клеток, где продукты гидролиза сахарозы могут откладываться в крахмал и запасные соединения неуглеводной природы. Степень развития аномалии коррелирует с повышением активности А_пИ_{нв} (рис. 16, 18, 19). Полученные результаты показывают, что между двумя крайними вариантами (высокоузорчатые и безузорчатые растения карельской березы) существует большое количество промежуточных стадий, степень узорчатости которых коррелирует с изменением соотношения активностей ферментов.

С одной стороны, высокая активность кислой инвертазы в течение длительного времени смещает соотношение гексозы/сахароза в сторону накопления гексоз и тем самым способствует индукции клеточных делений (Sturm, Tang, 1999). В данной связи можно предположить, что высокая активность апопластной и вакуолярной инвертазы у узорчатых растений, возможно, является причиной увеличения числа клеток в зоне проводящей флоэмы. Кроме того, образующиеся гексозы являются субстратом для внутриклеточных синтезов, что коррелирует с накоплением в паренхимных клетках проводящей флоэмы узорчатых растений большого количества липидных и танниновых включений (Барильская, Ахтио, 1986; Novitskaya, Kushnir, 2006; Новицкая, 2008). Таким

образом, высокая активность инвертазы, очевидно, может приводить к усилению функции запасаания через образование запасных веществ и дифференцировку клеток запасающей паренхимы.

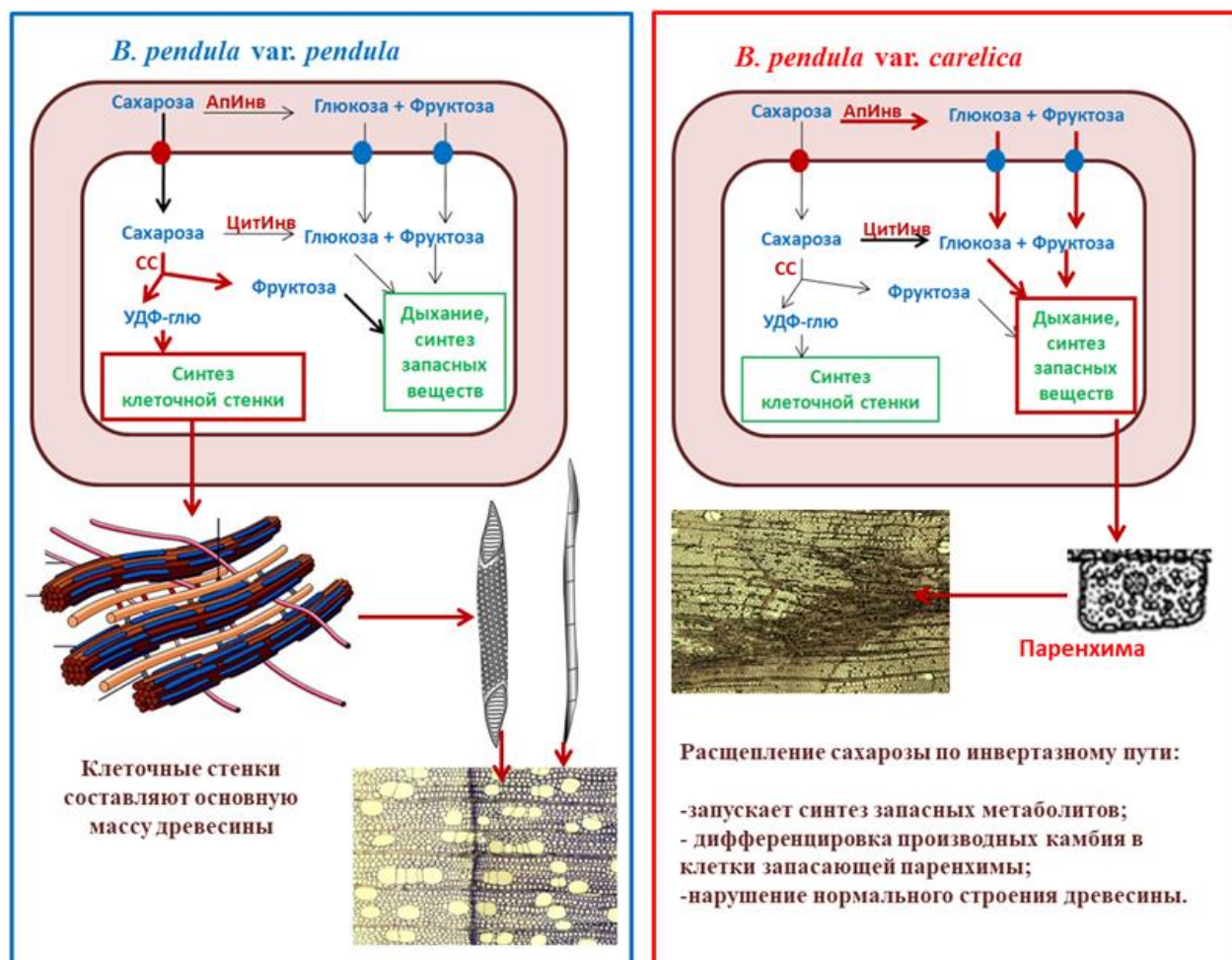


Рисунок 23. Схематическое изображение путей утилизации сахарозы при формировании нормальной по строению древесины обычной березы и аномальной древесины карельской березы. Пояснения в тексте.

С другой стороны, увеличение активности АпИInv в ответ на повышение сахарозы в апопласте, может, в свою очередь, повышать акцепторную силу флоэмы и способствовать еще большему притоку сахарозы в зону аномалий. Известно, что сверхэкспрессия инвертазы клеточной стенки в листьях приводит подавлению в них донорной функции и переходу листьев в состояние акцепторов ассимилятов (Stitt,

Sonnwald, 1995). В безузорчатых участках узорчатого ствола карельской березы была обнаружена высокая активность СС и накопление крахмала, что также может свидетельствовать о повышенном содержании сахарозы (рис. 19).

На сеянцах карельской и обычной березы показано, что нарушения в метаболизме наблюдаются уже на начальных этапах онтогенеза. У растений в возрасте 7 недель основным аттрагирующим центром является корень, а расщепление сахарозы в акцепторных тканях растения осуществляется преимущественно за счет активности СС. Показано, что на ранних этапах формирования растения метаболизация сахарозы у карельской березы происходит более интенсивно по сравнению с растениями обычной березы. По достижении растениями 17-недельного возраста происходит переориентация путей утилизации сахарозы, а наиболее высокая активность сахарозорасщепляющих ферментов наблюдается в стебле. У обычной березы большая часть синтезирующихся метаболитов расходуется на процессы структурообразования, о чем свидетельствует высокая активность СС. У растений карельской березы высокие значения активности кислых инвертаз способствуют накоплению в акцепторных органах большого количества гексоз и запасных метаболитов. Таким образом, биохимические и молекулярные различия между растениями обычной березы повислой и карельской березы закладываются еще на ранних этапах развития растения задолго до начала формирования аномальной узорчатой древесины.

Возникает вопрос, что может быть причиной изменения пути метаболизации сахарозы, а именно, перехода от преимущественного ее расщепления с участием сахарозосинтазы на преимущественное расщепление апопластной инвертазой. Изучению возможных путей регуляции активности ферментов, как на транскрипционном, так и на посттрансляционном уровне, посвящена следующая глава.

ГЛАВА 4. МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ РАЗНЫХ СЦЕНАРИЕВ КСИЛОГЕНЕЗА

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

Полученные результаты (Глава 3) позволяют предположить, что изменение активности СС представляет собой один из эффективных путей регуляции ксилогенеза древесных растений и тесно связано с формированием узорчатой древесины карельской березы. Как внешние, так и внутренние факторы изменяют количество фермента и его активность, главным образом, через регуляцию экспрессии генов. В связи с этим, проведено сравнительное изучение активности сахарозосинтазы и уровня транскриптов кодирующих ее генов в ходе ксилогенеза обычной березы повислой и карельской березы.

4.1.1. Активность СС и уровень экспрессии генов *Sus1*, *Sus2*, *Sus3* в развивающейся ксилеме 10-летних растений двух форм березы повислой

Объектами исследования были 10-летние деревья обычной березы и карельской березы, произрастающие на Агробиологической станции Карельского научного центра РАН. Растения выращены из семян, полученных от контролируемого опыления (Forelia OY, Финляндия). Семена карельской березы получены от родительских деревьев с ярко выраженными признаками узорчатости древесины. Деревья обычной березы имели типичную для вида прямослойную древесину со слабо выраженной текстурой. Среди деревьев карельской березы подбирали экземпляры с высокой степенью узорчатости древесины (узорчатые растения) и растения, у которых признаки аномального строения древесины отсутствовали (безузорчатые растения). Образцы для анализа отбирали с: (1) деревьев обычной березы, (2) безузорчатых деревьев карельской березы, (3) безузорчатой части ствола узорчатых деревьев карельской березы, (4) узорчатой части ствола тех же деревьев (рис. 24). На стволе вырезали окошки 2x6 см и отделяли кору от древесины. С обнаженной поверхности древесины бритвенным лезвием соскабливали тонкий слой ксилемы, куда входили дифференцирующиеся клетки ксилемы и наружные слои прироста ксилемы текущего года. Отбор тканей контролировали под микроскопом. Исследование проводили в период активного функционирования камбия (21.06.2015 г).

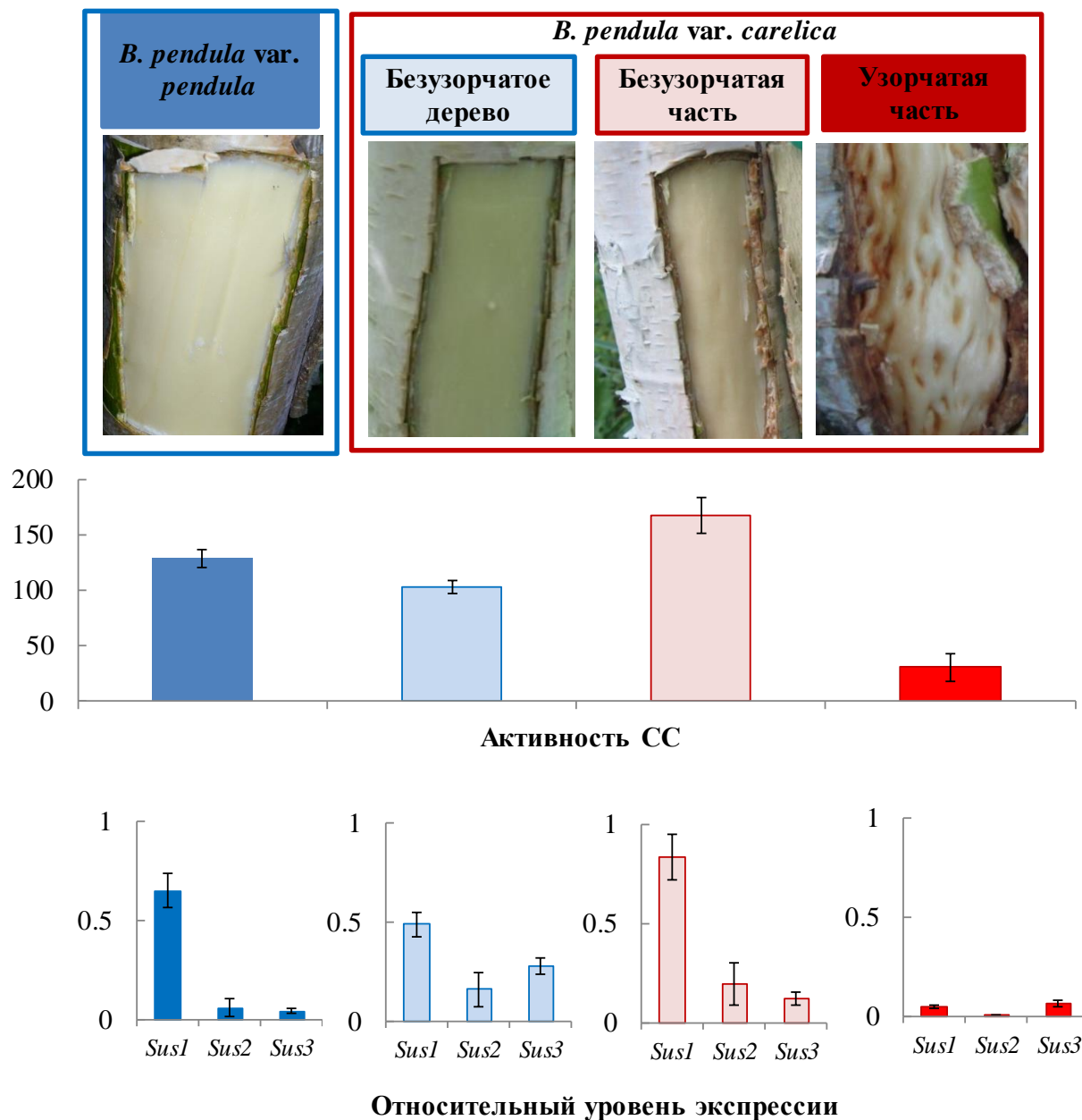


Рисунок 24. Окоренная поверхность древесины, активность сахарозосинтазы (СС) (мкмоль сахарозы / мг белка) и относительный уровень экспрессии генов (отн. ед.) *Sus1*, *Sus2*, *Sus3* в зоне формирования ксилемы 10-летних деревьев обычной березы (*B. pendula* var. *pendula*), безузорчатой карельской березы (*B. pendula* var. *carelica*), узорчатой карельской березы (безузорчатая и узорчатая части ствола). Представлены средние значения пяти повторностей и их стандартные ошибки.

У деревьев обычной березы в период активного камбиального роста в ксилеме наблюдали высокую активность СС. Значения ее достигали 129 мкмоль сахарозы / мг

белка. Высокая активность СС в ксилеме обычной березы поддерживается за счет изоформы *Sus1*, содержание транскрипта гена *Sus1* в ксилеме исследуемых деревьев составило 0.65 отн. ед., что более чем в 10 раз выше по сравнению с уровнем транскрипта генов *Sus2* и *Sus3* (0.06 и 0.04 отн. ед. соответственно) (рис. 24). Изоформы сахарозосинтазы *Sus1* и *Sus2*, кодируемые генами *Sus1* и *Sus2*, у древесных растений имеют перекрывающиеся биологические функции, основной из которых является поставка углерода к месту синтеза клеточных стенок ксилемы. У растений тополя более высокая экспрессия в ксилеме отмечена для гена *Sus1* (Geisler-Lee et al., 2006). Отличия в экспрессии генов *Sus2* и *Sus3* у обычной березы не достоверны (рис. 24).

У безузорчатых растений карельской березы активность СС была в 1.3 раза ниже по сравнению с обычной березой. Снижение активности СС обусловлено понижением уровня экспрессии *Sus1* (0.49 отн. ед.), однако это частично компенсируется подключением в метаболические процессы изоформ фермента, кодируемых генами *Sus2* и *Sus3* (0.16 и 0.27 отн. ед. соответственно). Ген *Sus2* может участвовать в синтезе целлюлозы при низком уровне транскрипции *Sus1* или пониженной активности *Sus1*, в частности, при избыточном накоплении в тканях фруктозы, высокие концентрации которой сильно ингибируют или инактивируют *Sus1* (Matic et al., 2004). У безузорчатых растений, как и у обычной березы, в дифференцирующейся ксилеме содержание транскрипта *Sus1* было выше, чем *Sus2* и *Sus3* (рис. 24).

У узорчатых растений карельской березы в участках ствола с узорчатой древесиной активность СС была очень низкой (30 мкмоль сахарозы / мг белка). Появление узорчатой древесины сопровождалось резким снижением количества транскрипта генов *Sus1* и *Sus2* до 0.05 и 0.002 отн. ед. соответственно. При этом уровень экспрессии гена *Sus3* (0.06 отн. ед.) достоверно не отличался от такового у обычной березы (рис. 24). В норме у древесных растений ген *Sus3* имеет широкий диапазон транскрипции в органах и тканях и рассматривается как ген общего метаболизма, он практически не экспрессируется в формирующихся клетках древесины (Geisler-Lee et al., 2006).

Анализ активности СС и уровня транскриптов кодирующих ее генов в безузорчатых участках ствола узорчатых растений карельской березы показал неожиданный результат. Так, активность СС была выше в 5.6 раза по сравнению с

узорчатой частью ствола, и в 1.3 раза по сравнению с обычной березой (167 мкмоль сахарозы / мг белка). При этом количество транскриптов генов *Sus1*, *Sus2* и *Sus3* было значительно больше, как относительно узорчатой части того же дерева, так и по сравнению с обычной березой. Уровень мРНК гена *Sus1* (0.84 отн. ед.) был в 17 раз выше, чем в узорчатой части, и в 1.3 раза выше, чем у обычной березы. Уровень мРНК гена *Sus2* (0.19 отн. ед.) – в 90 раз выше, чем в узорчатой части, и в 3 раза выше, чем у обычной березы. Количество мРНК гена *Sus3* (0.12 отн. ед.) – в 2 раза выше, чем в узорчатой части, и в 3 раза выше, чем у обычной березы (рис. 24). То есть, в пределах одного дерева карельской березы формирование безузорчатой древесины, в которой преобладают сосуды и волокна, происходит на фоне высокой экспрессии генов *Sus1* и *Sus2*, а при формировании узорчатой древесины с высоким содержанием паренхимных клеток уровень транскрипта этих генов снижен в 17 и в 90 раз соответственно.

Исходя из полученных результатов можно заключить, что в период камбиального роста активность СС в зоне формирования ксилемы исследуемых берез зависит от уровня мРНК генов *Sus1* и *Sus2*, являющихся тканеспецифичными для ксилемы. Для определения вклада каждого гена в регуляцию активности сахарозосинтазы был проведен корреляционный анализ. Установлено, что в наибольшей степени активность СС коррелировала с уровнем экспрессии гена *Sus1* ($R=0.90$), в меньшей степени с экспрессией гена *Sus2* ($R=0.68$), в случае гена *Sus3* – корреляции не наблюдалось (рис. 25). В связи с этим в дальнейших исследованиях регуляции активности СС в камбиальной зоне будем рассматривать только гены *Sus1* и *Sus2*.

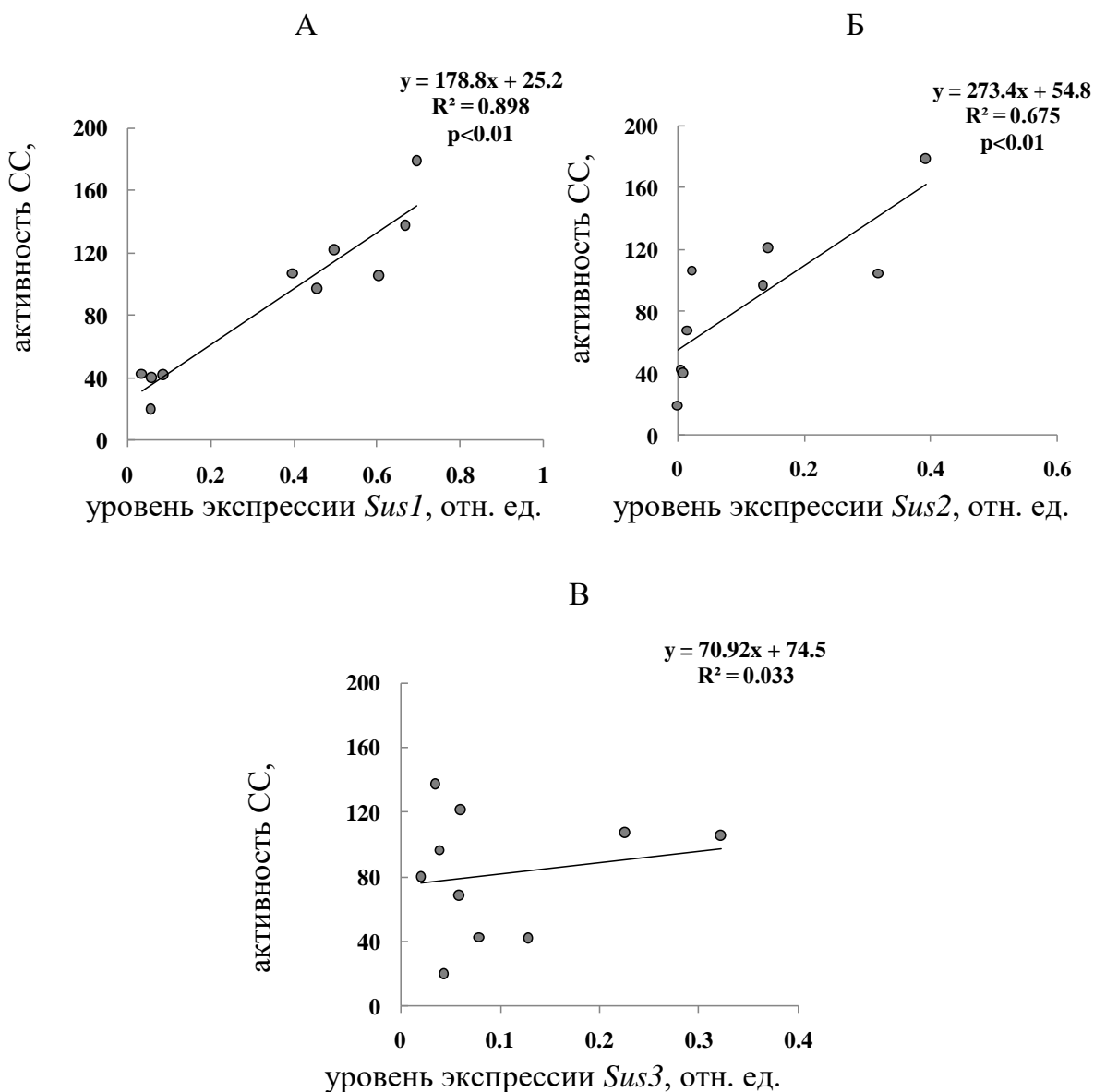


Рисунок 25. Зависимость активности сахарозосинтазы (СС) от уровня экспрессии генов (отн.ед.) *Sus1* (А), *Sus2* (Б), *Sus3* (В) в зоне формирования ксилемы 2-х форм березы повислой. Представлены средние значения пяти повторностей и их стандартные ошибки.

4.1.2. Активность сахарозосинтазы и уровень экспрессии генов *Sus1*, *Sus2* в развивающейся ксилеме 25-летних растений карельской березы с разной степенью узорчатости древесины

Исследования проводили на 25-ти летних деревьях карельской березы, произрастающих на лесосеменной плантации (Медвежьегорский район, Республика Карелия). Характеристика территории и объектов исследования приведены в разделе

3.4.2. Всем растениям был присвоен балл от 0 до 3 в зависимости от степени проявления узорчатости древесины (рис. 26). Число растений в 1-4 группах составило 13, 8, 9 и 5 соответственно. Отбор образцов проводили в период активного формирования ранней тонкостенной древесины (начало июля 2017 г.).

B. pendula var. carelica

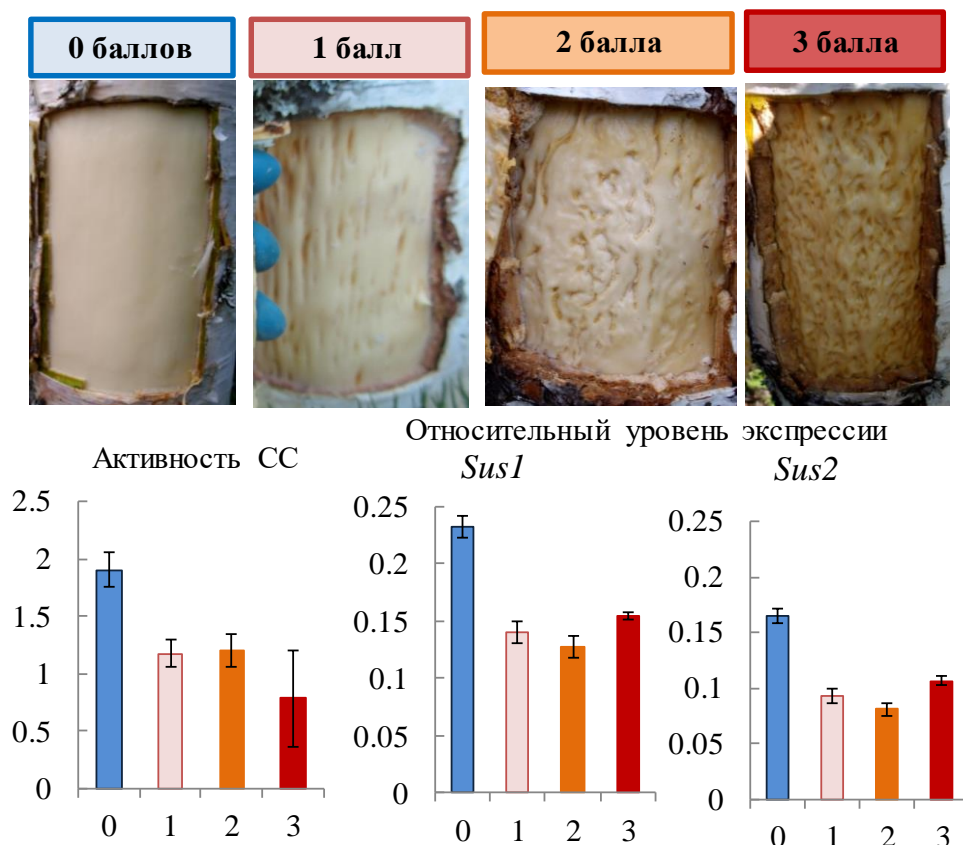


Рисунок 26. Окоренная поверхность древесины, активность сахарозосинтазы (СС) (мкмоль сахаразы/мг белка) и относительный уровень экспрессии генов (отн.ед.) *Sus1*, *Sus2* в зоне формирования ксилемы 25-летних деревьев карельской березы с разной степенью узорчатости древесины (от 0 до 3 баллов), произрастающих на лесосеменной плантации. Представлены средние значения 13, 8, 9, 5 повторностей (для растений со степенью узорчатости 0-3 балла соответственно) и их стандартные ошибки.

У безузорчатых растений активность СС (1.9 мкмоль сахаразы на мг белка) была в 1.7 раза выше по сравнению с узорчатыми растениями карельской березы (1.12 мкмоль сахаразы на мг белка). Высокая активность СС обусловлена большим, по сравнению с узорчатыми растениями, в 1.7 раз уровнем экспрессии гена *Sus1* (0.23 отн. ед.) и в 1.9

раз гена *Sus2* (0.17 отн. ед.). Как и у 10-летних растений обычной и карельской березы у 25-летних растений карельской березы содержание транскриптов мРНК гена *Sus1* было выше, по сравнению с мРНК гена *Sus2* (рис. 26).

Между узорчатыми растениями, различающимися по степени аномальности древесины, достоверных отличий по активности СС обнаружено не было. 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 генов *Sus1* и *Sus2* у высокоузорчатых растений (3 балла) был выше, по сравнению с растениями со степенью узорчатости 1-2 балла (критерий Фишера $F = 2.5 > 2.1$ при $p=0.03$ и $F = 2.9 > 2.3$ при $p=0.02$ для *Sus1* и *Sus2* соответственно) (рис. 26).

Еще одна особенность высокоузорчатых растений карельской березы (3 балла) – это большая индивидуальная изменчивость по активности СС. Значения ее варьировали от 0.3 до 1.8 мкмоль сахарозы/мг белка у растений, произрастающих на разных по почвенным условиям участках (рис. 27). Растения, произрастающие на первом участке, отличались от растений на 2-м и 3-м участках более толстой корой (рис. 27). В формирующейся ксилеме этих растений на фоне большей активности СС содержалось больше целлюлозы (41.4 %) и меньше лигнина (17.9 %), по сравнению с растениями 2-го участка (36.5% и 19.5 % целлюлозы и лигнина соответственно) и 3-го участка (36.8% и 19.3 % целлюлозы и лигнина соответственно). На гибридных линиях тополя *P. tremula* × *tremuloides* показано влияние СС на содержание целлюлозы, гемицеллюлоз, лигнина на единицу объема древесины (Gerber et al., 2014). Следует отметить, что при разной активности СС уровень экспрессии кодирующих ее генов *Sus1* и *Sus2* у исследуемых растений не различался (рис. 27). Регуляция активности СС может осуществляться не только на уровне транскрипции, но и на посттрансляционном уровне. Большое влияние на активность СС могут оказывать условия произрастания, в частности почвенные условия. Участок 1, на котором произрастали узорчатые растения (3 балла) с самой высокой активностью СС, отличался от участков 2 и 3 более низким значением рН почвы, более высоким содержанием гумуса, углерода и подвижного калия. На участке 2 в почве было выше содержание подвижного азота и меньше подвижного фосфора, по сравнению с 3-м участком. Участок 3 на фоне большего рН

характеризовался низким содержанием подвижного азота, при этом содержание подвижного фосфора было очень высоким. Данных о влиянии условий произрастания на активность СС у древесных растений в известной нам литературе очень мало, в основном рассматривается влияние нитратного азота. Подробнее влияние плодородия почвы на активность ферментов метаболизма сахарозы у карельской березы будет рассмотрено в главе 6.

***B. pendula var. carelica* 5 баллов**

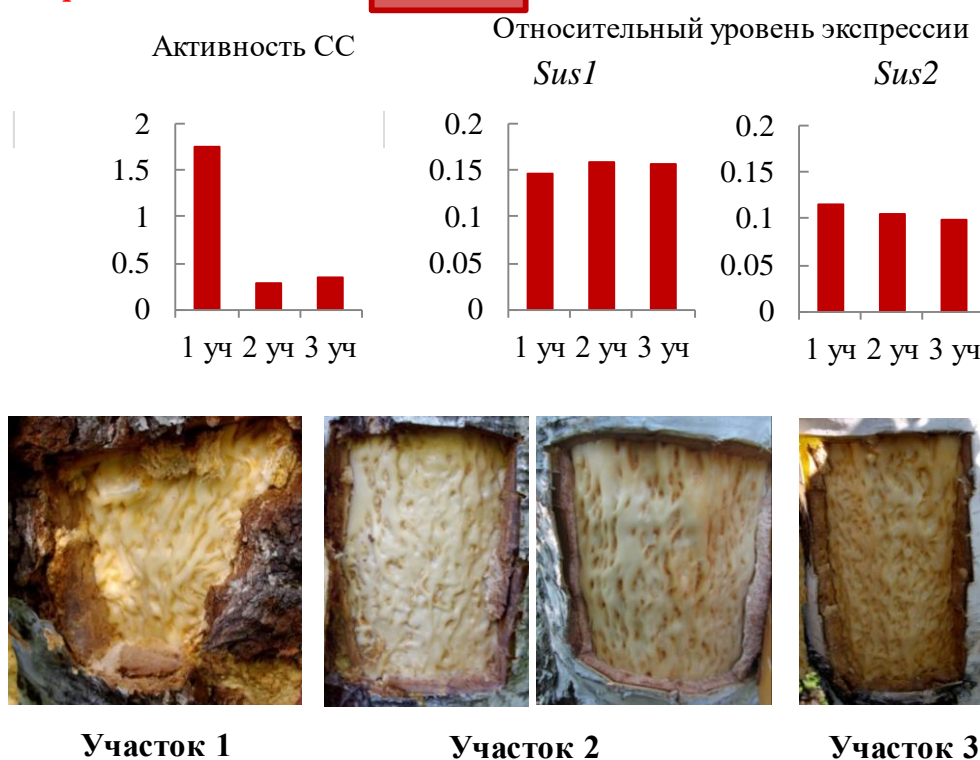


Рисунок 27. Активность сахарозосинтазы (СС) (мкмоль сахарозы / мг белка) и относительный уровень экспрессии (отн.ед.) генов *Sus1*, *Sus2* в зоне формирования ксилемы 25-летних деревьев карельской березы (узорчатость 3 балла), произрастающих на разных по уровню плодородия почвы участках. На фотографиях – окоренная поверхность древесины исследуемых растений. Пояснения в тексте.

4.1.3. Активность сахарозосинтазы и уровень экспрессии генов *Sus1* и *Sus2* у семян обычной березы повислой и карельской березы

В главе 3 было показано, что биохимические и молекулярные различия между растениями обычной и карельской березы закладываются еще на ранних этапах

развития до начала формирования узорчатой аномальной по структуре древесины. Уже у 17-недельных сеянцев соотношение активности СС и АпИнв в стебле было подобно взрослым растениям. В данном разделе мы попытались определить этап онтогенеза, на котором биохимические и молекулярные различия начинают проявляться. Исследование активности СС и уровня экспрессии кодирующих ее генов проводили на 5-, 6-, 7-, 8-, 10-недельных сеянцах карельской и обычной березы. На 2-х недельных сеянцах изучали только уровень экспрессии генов *Sus1* и *Sus2* (рис. 28).

Активность СС в стебле 5-10 недельных сеянцев обычной березы с возрастом увеличивалась от 0.4 до 2 мкмоль сахарозы / мг белка. Возрастание активности сопровождалось увеличением уровня экспрессии кодирующих ее генов, как *Sus1*, так и *Sus2*. Полученные данные согласуются с основной ролью СС в процессах структурообразования. Наибольшая активность СС обнаружена в молодых растущих тканях (Coleman et al., 2008, 2009), в результате ее деятельности углерод расходуется на построение клеточных структур (Amor et al., 1995; Sturm, Tang, 1999; Sturm, Tang, 1999; Winter, Huber, 2000; Ruan et al., 2003) и необратимо выводится из метаболизма.

В стебле 5-, 6-недельных сеянцев карельской березы активность СС была в 1.5-2 раза ниже, к 7-ми неделям она возростала до уровня обычной березы (1 мкмоль сахарозы/мг белка), снижалась в 2 раза к 8-ми неделям и оставалась на этом уровне у 10-недельных сеянцев (рис. 28). При этом количество мРНК гена *Sus1* возростало от 0.4 до 1.1 относит. ед., а гена *Sus2* от 0.2 до 0.6 относит. ед., что примерно в 2-3 раза ниже, по сравнению с обычной березой. У 2-недельных сеянцев уровень экспрессии генов, кодирующих СС, был существенно ниже, по сравнению с 5-недельными растениями. Между обычной и карельской березой существенных отличий в количестве транскрипта *Sus1* и *Sus2* обнаружено не было (рис. 28).

У сеянцев обычной березы наблюдается линейная зависимость активности СС и уровня экспрессии кодирующих ее генов от возраста. Коэффициенты аппроксимации составили 0.96, 0.87 и 0.82 для СС, *Sus1* и *Sus2* соответственно (рис. 29). У сеянцев карельской березы линейная зависимость от возраста наблюдается только для транскриптов мРНК генов *Sus1* и *Sus2* (коэффициенты аппроксимации 0.95 и 0.71 соответственно), а для активности СС она не обнаружена (рис. 29).

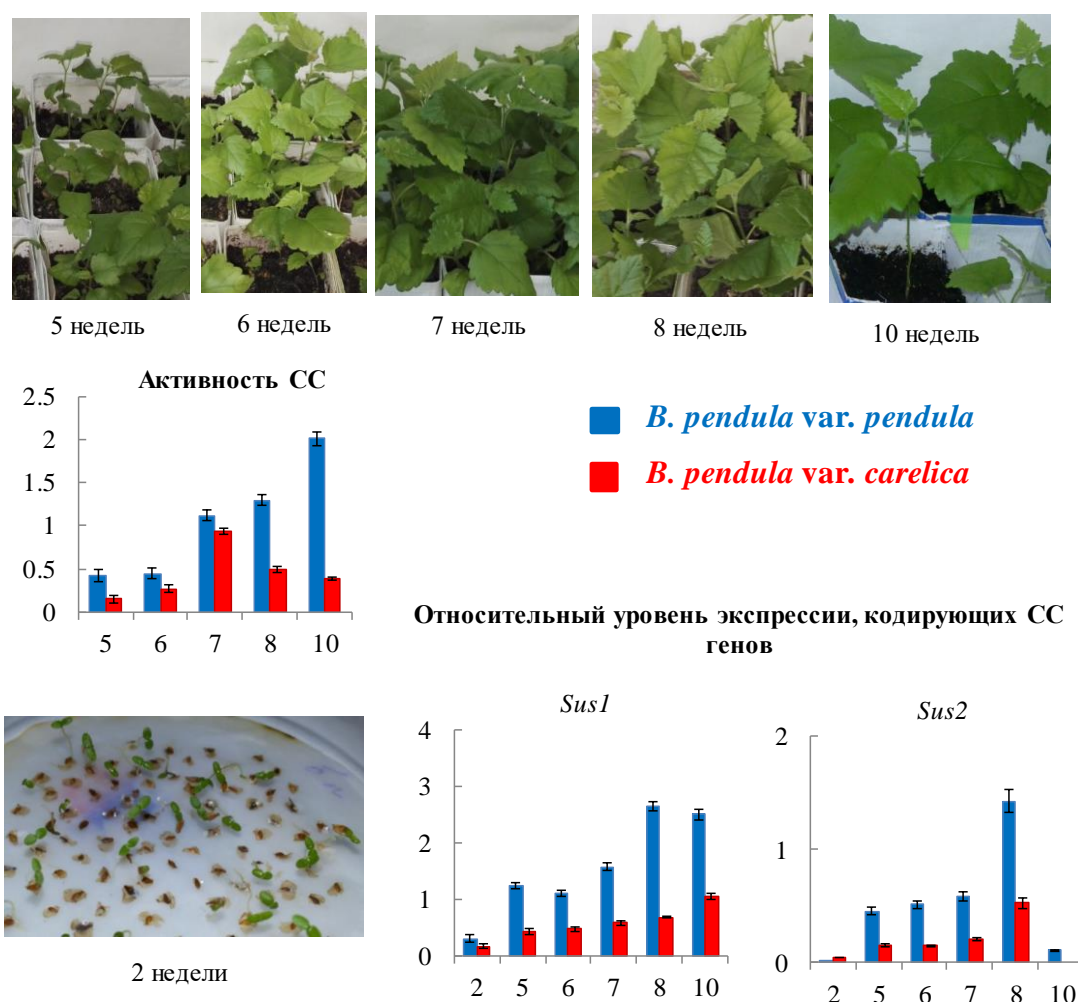


Рисунок 28. Активность сахарозосинтазы (СС) (мкмоль сахарозы/мг белка) и относительный уровень экспрессии кодирующих ее генов *Sus1* и *Sus2* (отн. ед.) в сеянцах разного возраста растений *B. pendula var. pendula* и *B. pendula var. carelica*. По оси абсцисс – возраст сеянцев (недели). На фотографиях внешний вид 5-, 6-, 7-, 8-, 10-недельных (вверху) и 2-недельных сеянцев.

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. Ранее мы показали (раздел 3.5.2), что в этом возрасте у сеянцев карельской березы активность СС в корне была в 2 раза выше, по сравнению с таковой у обычной березы (рис. 22). То есть 7-недельные сеянцы можно рассматривать, как растения, находящиеся в переходном состоянии, у которых начинается перестройка метаболических путей утилизации сахарозы.

Проведенное исследование показало, что активность СС в большинстве случаев регулируется на уровне экспрессии кодирующих ее генов *Sus1* и *Sus2*, как у взрослых растений (рис. 24, 26), так и у семян (рис. 28). Меньшая активность СС в узорчатых участках ствола карельской березы в период камбиального роста обусловлена снижением в этих зонах количества транскриптов мРНК генов *Sus1* и *Sus2*. У высокоузорчатых растений карельской березы активность СС не всегда коррелирует с уровнем экспрессии кодирующих ее генов (рис. 27), и зависит от условий произрастания растений.

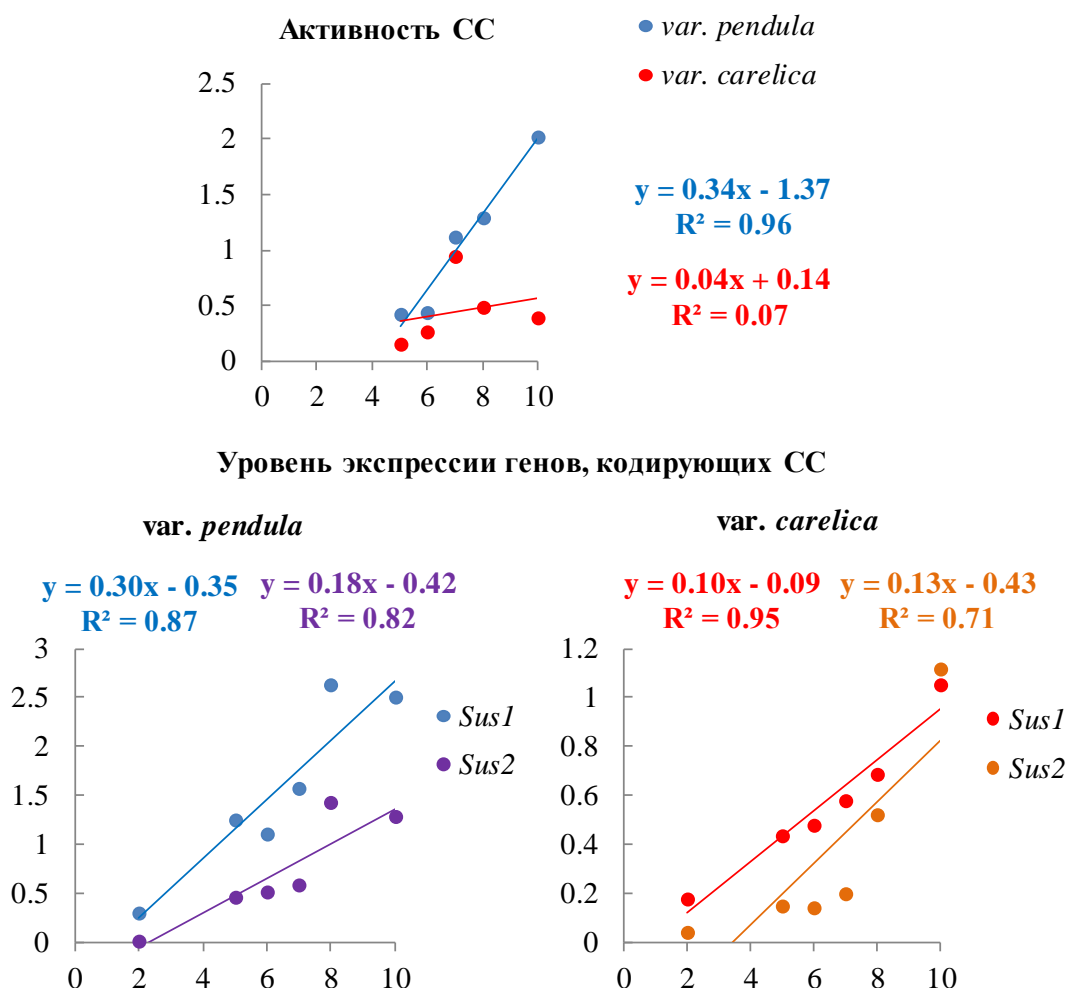


Рисунок 29. Изменение активности сахарозосинтазы (СС) (мкмоль сахарозы / мг белка) и уровня экспрессии кодирующих ее генов *Sus1* и *Sus2* (отн. ед.) в зависимости от возраста семян (недель) обычной (*var. pendula*) и карельской (*var. carelica*) березы. По оси абсцисс – возраст семян (недели). На графиках показаны линия тренда, уравнение описывающей ее функции и коэффициент аппроксимации.

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). На трансгенных растениях тополя показано, что высокий уровень экспрессии генов сахарозосинтазного семейства коррелирует с активным утолщением вторичных клеточных стенок ксилемы и приводит к увеличению прочности древесины (Coleman et al., 2009; Hauch, Magel, 1998; Salnikov et al., 2001; Nilsson et al., 2009). На взрослых деревьях тополя (*Populus tremula*) (Andersson-Gunneras et al., 2006), сеянцах его гибридных линий *P. alba*×*P. gradidentata* (Hertzberg et al., 2001; Coleman et al., 2009), *P. deltoides*×*P. trichocarpa* (Song et al., 2010), *P. tremula*×*P. tremuloides* (Tanase, Yamaki, 2000; Gerber et al., 2014) выявлена корреляция между уровнем экспрессии генов, кодирующих СС, и количеством содержащейся в древесине целлюлозы.

Хорошо известно, что в акцепторных тканях растений УДФ-глюкоза, образующаяся при расщеплении сахарозы СС, может расходоваться также на биосинтез крахмала (Echt, Chourey, 1985; Pozueta-Romero et al., 1999; Tauberger et al., 2000; Tiessen et al., 2002; Baroja-Fernández et al., 2003; Kladnik et al., 2005; Baroja-Fernandez et al., 2012). У древесных растений основная функция СС в тканях ствола в период камбиального роста – участие в синтезе компонентов клеточных стенок ксилемы, при этом запасание крахмала происходит слабо. В этом разделе на примере 10-летних растений обычной и карельской березы и 25-летних растениях карельской березы рассмотрена взаимосвязь между активностью СС и количеством целлюлозы и крахмала в формирующейся ксилеме.

4.2.1. Активность сахарозосинтазы, содержание целлюлозы и крахмала в развивающейся ксилеме 10-летних растений обычной березы повислой и карельской березы

У обычной березы в период активной деятельности камбия высокие значения содержания целлюлозы (41.1 %) на фоне высокой активности СС (129 мкмоль сахарозы

/ мг белка) свидетельствуют о том, что основная масса продуктов сахарозосинтазной реакции необратимо выводится из метаболизма, расходуясь на образование клеточных стенок сосудов и волокон, составляющих структурную основу древесины обычной березы (табл. 3 (Любавская, 1978)). Накопление основного запасного метаболита – крахмала в этот период практически не происходит, его содержание не превышало 0.3 мг/г сухой ткани (рис. 30).

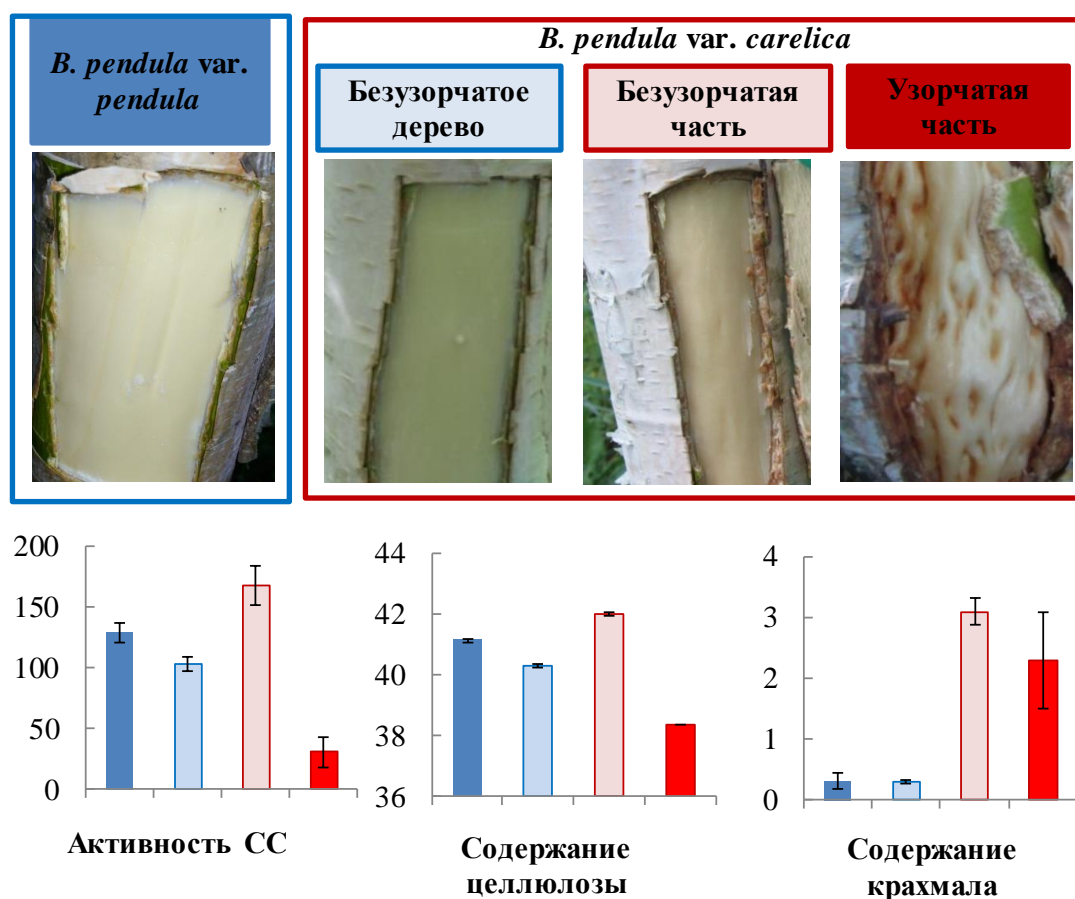


Рисунок 30. Окоренная поверхность древесины, активность сахарозосинтазы (СС) (мкмоль сахаразы / мг белка), содержание целлюлозы (%) и крахмала (мг/г) в ксилеме 10-летних деревьев обычной березы (*Betula pendula var. pendula*), безузорчатой карельской березы (*B. pendula var. carelica*), узорчатой карельской березы (безузорчатая и узорчатая части ствола). Представлены средние значения пяти повторностей и их стандартные ошибки.

При формировании узорчатой древесины карельской березы нарушение ксилогенеза приводит к росту числа радиальных лучей и количества составляющих их паренхимных клеток (Барильская, 1978). Сближенные радиальные лучи образуют крупные скопления клеток паренхимы, придающие древесине характерный узор. Соотношение структурных элементов в таких аномальных участках древесины изменено в сторону значительного увеличения доли лучевой паренхимы (табл. 3 (Любавская, 1978)). Это происходит на фоне падения активности СС (30 мкмоль сахарозы / мг белка) и уменьшения содержания целлюлозы на единицу массы ткани (38.4 %) (рис. 30).

Таблица 3. Сравнительная характеристика древесины 10 летних растений *B. pendula* var. *pendula* и *B. pendula* var. *carelica* (данные из монографии Любавская, 1978).

Форма березы повислой	Соотношение анатомических элементов, %			
	Волокна	Сосуды	Сердцевинные лучи	Древесная паренхима
<i>B. pendula</i> var. <i>pendula</i>	61.2	23.0	12.6	3.2
<i>B. pendula</i> var. <i>carelica</i> (аномальная древесина)	36.1	8.0	45.1	10.8

Причиной снижения процентного содержания целлюлозы в древесине узорчатой части ствола карельской березы, очевидно, стало возрастание здесь числа паренхимных клеток. Установлено, что клеточные стенки лучевой паренхимы обычной березы и карельской березы состоят из тех же слоев, что и клеточные стенки сосудов и волокон, однако, в среднем их толщина меньше, чем у элементов водопроводящей и механической систем древесины (Барильская, 1978).

Согласно результатам наших исследований, формирование узорчатой древесины у карельской березы связано с появлением избытка сахарозы в тканях ствола (Новицкая и др, 2015; Novitskaya, Kushnir, 2006). Акцепторную силу камбиальной зоны в данном случае поддерживает высокая активность апопластной инвертазы в ксилеме и, особенно, во флоэме. Образующиеся при этом в большом количестве гексозы интенсивно расходуются на синтез запасного метаболита – крахмала (рис. 5). Так, в ксилеме

узорчатых деревьев карельской березы накапливалось большое количество крахмала (3.1 и 2.3 мг/г в безузорчатой и узорчатой частях ствола соответственно). Если накопление крахмала в узорчатой части ствола происходит на фоне низких значений активности СС, то в безузорчатой части, напротив, – на фоне повышения активности фермента (167 мкмоль сахарозы / мг белка) (рис. 30).

В ксилеме безузорчатых участков ствола наряду с высоким значением активности СС выявлено максимальное значение содержания целлюлозы (42%). Высокое содержание целлюлозы на единицу массы древесины свидетельствует о том, что повышенная активность СС обеспечивает расходование сахарозы на процессы образования вторичной клеточной стенки. На трансгенных растениях тополя показано, что сверхэкспрессия генов СС влияет на утолщение вторичных клеточных стенок ксилемы и приводит к увеличению прочности древесины (Coleman et al., 2009). У трансгенных растений табака сверхэкспрессия СС приводит к усилению запроса на сахарозу со стороны акцепторов, увеличению фотосинтетического образования сахарозы в листьях и, как следствие, возрастанию содержания дисахарида и крахмала в акцепторных тканях (Nguyen et al., 2016). Поскольку в безузорчатых участках ствола карельской березы запасается крахмал, можно заключить, что высокая активность СС наблюдается на фоне интенсивного притока сахарозы в ткани (рис. 30).

У безузорчатых растений карельской березы формируется нормальная по строению ксилема, однако в ней наблюдается некоторое увеличение ширины радиальных лучей. Если у обычной березы в древесине преобладают лучи шириной в 1-3 клетки, то у безузорчатой карельской березы ширина лучей обычно составляет 3-4 клетки. Биохимический анализ показал, что безузорчатые растения по активности СС (99 мкмоль сахарозы / мг белка) и содержанию целлюлозы (40.3 %) занимают промежуточное положение между обычной березой и карельской березой с узорчатой древесиной. В период камбиального роста у безузорчатых растений карельской березы, как и у растений обычной березы, в ксилеме содержание крахмала не превышало 0.3 мг/г сухой ткани (рис. 30).

Таким образом, активность СС коррелирует с содержанием целлюлозы в формирующейся ксилеме обычной березы и карельской березы с узорчатой и

безузорчатой древесины. На фоне высокой активности СС высокое содержание крахмала наблюдалось только в безузорчатой части узорчатого дерева.

4.2.2. Активность сахарозосинтазы, содержание целлюлозы и крахмала в развивающейся ксилеме 25-летних растений карельской березы с разной степенью узорчатости древесины

У 25-летних растений карельской березы в период камбиального роста, как и у 10-летних растений обычной и карельской березы, снижение активности СС 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, 40.8, 38.2 % у растений со степенью узорчатости 1, 2 и 3 балла соответственно) (рис. 31). Целлюлозосинтаза в основном кодируется семейством генов *CesA*, которое содержит десять или более членов (Liu et al., 2012). В пределах семейства *CesA* у древесных растений существуют разные изоформы, участвующие в синтезе целлюлозы при формировании первичных клеточных стенок и образовании вторичных клеточных стенок (Wu et. al., 2000; Samuga, Joshi, 2002, 2004; Joshi, 2003; Joshi et. al., 2004; Kalluri et. al., 2004). Мы исследовали уровень экспрессии трех генов, кодирующих целлюлозосинтазу, *Ces8*, *Ces3*, *Ces7* (Salojärvi et al., 2017), которые участвуют в развитии различных тканей и, возможно, контролируются в *Betula* различными механизмами (Liu et al., 2012). Ген *Ces8* участвует в биосинтезе вторичной клеточной стенки, ген *Ces3* кодирует изоформу целлюлозосинтазы, участвующую в биосинтезе первичных клеточных стенок, а также может быть связан с синтезом гомогалактуронанов, ген *Ces7* кодирует специфическую целлюлозосинтазу ксилемы, в основном участвует в биосинтезе вторичной клеточной стенки (Liu et al., 2012; Salojärvi et al., 2017).

У березы в зоне дифференцирующейся ксилемы количество транскрипта мРНК гена *Ces8* было в 4 и 10 раз выше, чем гена *Ces7* и *Ces3* соответственно (рис. 31). Уменьшение содержания целлюлозы в формирующейся ксилеме у карельской березы происходило на фоне снижения уровня экспрессии генов, кодирующих целлюлозосинтазу (*Ces8*, *Ces3*, *Ces7*). В узорчатых участках ствола карельской березы

количество транскрипта мРНК генов *Ces8*, *Ces3* и *Ces7* было в 4, 2 и 2 раза соответственно меньше, по сравнению с безузорчатыми участками. Достоверных отличий по уровню экспрессии генов, кодирующих целлюлозосинтазу, между растениями со степенью узора 1-3 балла обнаружено не было (рис. 31).

B. pendula var. *carelica*

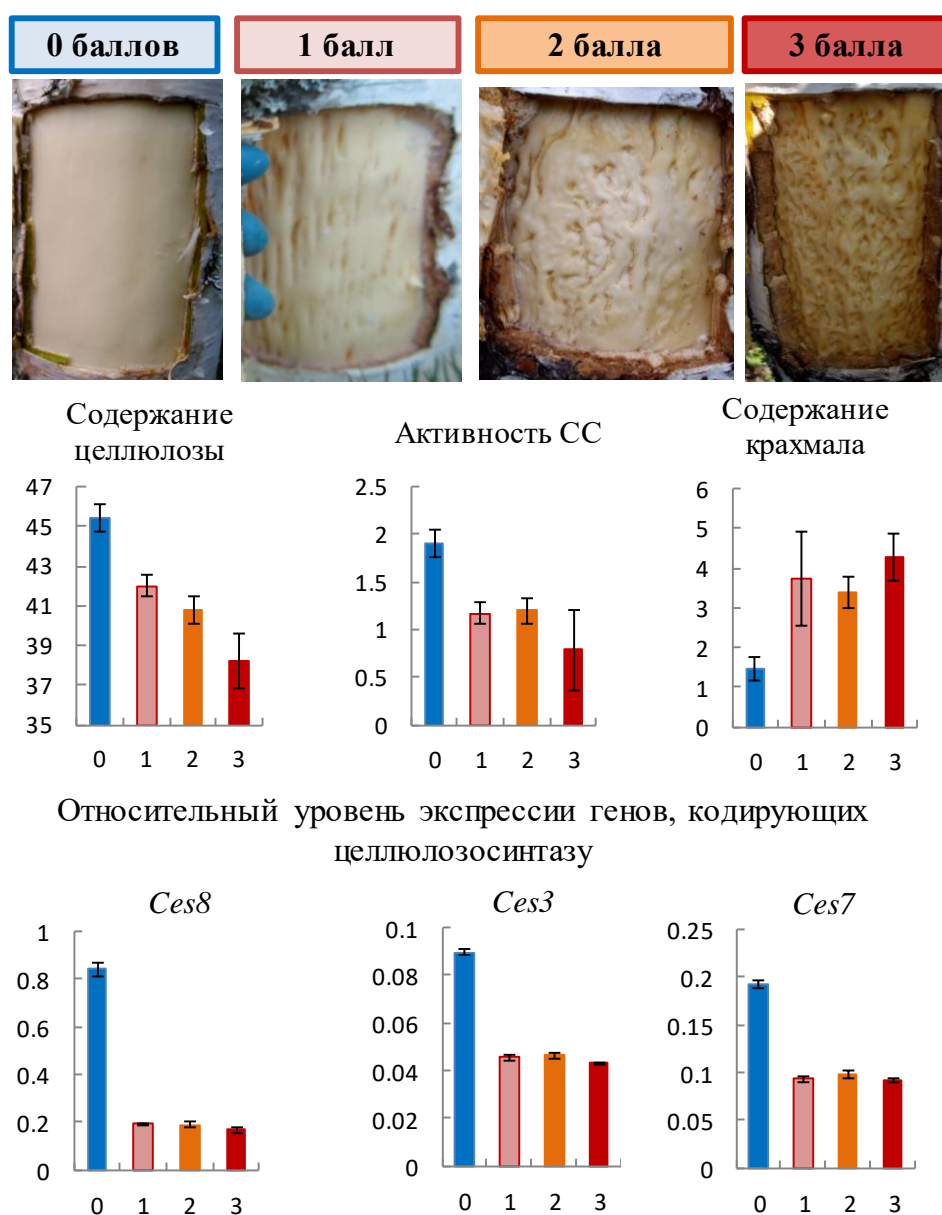


Рисунок 31. Окоренная поверхность древесины, активность сахарозосинтазы (СС) (мкмоль сахарозы / мг белка), содержание целлюлозы (%) и крахмала (мг/г) в ксилеме 25-летних безузорчатых (0 баллов) и узорчатых (1-3 балла степень узорчатости) растений карельской березы, произрастающих на лесосеменной плантации. По оси абсцисс – балл узорчатости. Представлены средние значения и их стандартные ошибки.

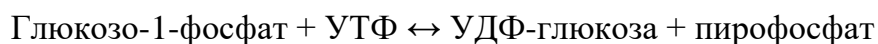
В узорчатых участках ствола возрастало содержание запасного полисахарида крахмала. Количество его изменялось от 1.5 мг/г у безузорчатых растений (0 баллов) до 3.7, 3.4 и 4.3 мг/г у растений со степенью узорчатости 1, 2 и 3 балла соответственно. Следует отметить, что достоверных отличий по содержанию крахмала между узорчатыми растениями обнаружено не было (рис. 31).

Таким образом, в формирующейся аномальной древесине карельской березы при меньшем уровне экспрессии генов, кодирующих целлюлозосинтазу, наблюдается снижение содержания целлюлозы (рис. 31). Субстратом для синтеза β -(1 \rightarrow 4)-глюкановых цепей целлюлозы служит УДФ-глюкоза, образующаяся в ходе сахарозосинтазного расщепления сахарозы (Amor et al., 1995; Haigler et al., 2001; Coleman, 2006; Coleman et al., 2009; Ruan, 2014). Из наших данных следует, что формирование древесины карельской березы, в которой увеличивается количество паренхимных клеток, происходит на фоне низкой активности СС при пониженном уровне экспрессии кодирующих ее генов (рис. 24, 26). Решающее значение для включения сахарозы в различные метаболические пути, помимо количества и активности СС, будет иметь и специфическое расположение фермента. Существует мнение, что на биосинтез целлюлозы расходуются продукты распада сахарозы, образующиеся в ходе деятельности только связанной с плазматической мембраной СС (Sturm, Tang, 1999; Amor et al., 1995; Koch, 2004), в то время как свободная СС поставляет субстраты на процессы дыхания и/или синтеза запасных веществ, таких как крахмал (Rees et al., 1984; Copeland, 1990; Quick, Schaffer, 1996; Winter, Huber, 1997; Komina et al., 2002). Более того, ассоциация СС на плазмалемме с целлюлозосинтазой может служить молекулярным переключателем метаболических процессов в клетке на биосинтетические, сопровождающиеся высокоскоростным синтезом целлюлозы. При этом регуляторные механизмы, приводящие к переходу СС из свободного в связанное состояние, могут отличаться в различных типах клеток (Haigler et al., 2001).

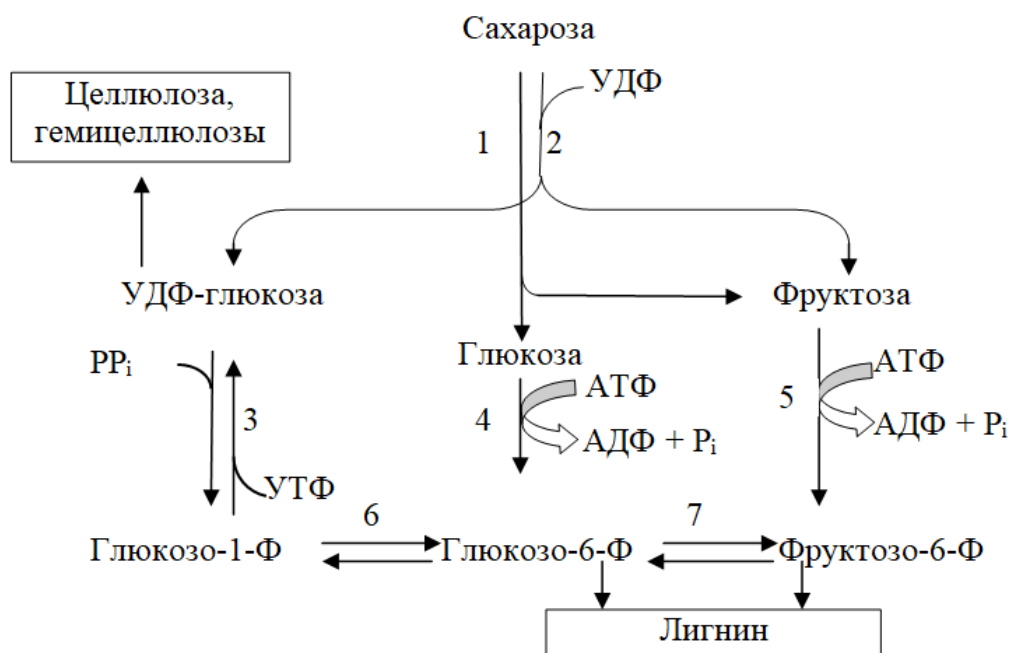
Поскольку синтез целлюлозы приводит к тому, что большое количество углерода необратимо выводится из обмена веществ и в последствии не может использоваться в альтернативных метаболических путях, то интенсивный (дополнительный) синтез β -(1 \rightarrow 4)-глюкана происходит только в специализированных типах клеток. Особенно большое количество целлюлозы требуется для вторичных клеточных стенок, которые

составляют основную массу древесины (Haigler et al., 2001). Можно предположить, что причиной понижения активности СС и меньшего количества целлюлозы в аномальных участках может быть высокое содержание в этих тканях паренхимных клеток, не предрасположенных для интенсивного (дополнительного) синтеза β -(1 \rightarrow 4)-глюкана.

В последнее время появились работы, в которых показано, что рост и формирование клеточных стенок могут идти при полном ингибировании СС (Gerber et al., 2014; Barratt et al., 2009; Bieniawska et al., 2007), тогда как отсутствие у трансгенных растений *Arabidopsis thaliana* (L.) 2-х из 9-ти изоформ нейтральных инвертаз приводит к сильному ингибированию роста (Barratt et al., 2009). Известно, что в образовании УДФ-глюкозы наряду с СС принимает участие УДФ-глюкозо-пирофосфорилаза:



При этом пул глюкозо-1-фосфата через ряд последовательных реакций (рис. 32) пополняется за счет глюкозы, образующейся при метаболизме сахарозы инвертазой.



- 1 – Инвертаза 2 – Сахарозосинтаза 3 – УДФГ-пирофосфорилаза
 4 – Гексокиназа 5 – Фруктокиназа 6 – Фосфоглюкомутаза
 7 – Глюкозофосфатизомераза

Рисунок 32. Пути метаболизма сахарозы в акцепторной клетке, приводящие к распределению углерода в компоненты клеточной стенки.

На растениях тополя было показано, что экспрессия гена, кодирующего фермент УДФ-глюкозо-пирофосфорилаза, повышается на конечной стадии роста клетки в период формирования вторичной клеточной стенки (Hertzberg et al., 2001), что согласуется с предположением об участии этого фермента в обеспечении клетки субстратом для синтеза компонентов клеточной оболочки. Учитывая результаты, полученные на карельской березе, нельзя исключить, что гексозы, необходимые для синтеза УДФ-глюкозы, могут поступать в клетку из апопласта, где они образуются в ходе реакции, катализируемой АпИInv.

С увеличением узорчатости древесины на фоне снижения содержания целлюлозы возрастает количество крахмала (рис. 30, 31). Если биосинтез целлюлозы сопровождается необратимым выведением большого количества 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/синтез 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). Хорошо известно, что глюкоза может оказывать ауксиноподобные эффекты, влияя тем самым на рост и развитие. На корнях *Arabidopsis* было показано, что наличие высокого уровня глюкозы (3%) может изменять уровень экспрессии 63% тех же генов, которые регулируются ИУК (Mishra et al., 2009). Уровень цитозольной глюкозы, опосредованный переносчиками, оказывает влияние на сигнализацию ауксина и на его биосинтез. Так увеличение гексокиназной активности в ответ на повышение глюкозы приводит к изменению реакции растения на действие ауксина и цитокинина (Moore et al., 2003). На растениях кукурузы было показано, что сахара также могут влиять на экспрессию генов *YUCCA*, регулируя тем самым синтез ауксина (LeClere et al., 2010). На основании полученных данных мы предположили, что 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. В этой связи, в клетке должно образовываться большее количество свободной глюкозы, о которой опосредованно можно судить по уровню гексозных транспортеров и/или активности фосфорилирующего ее фермента (гексокиназы).

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

4.3.1. Межклеточный транспорт сахарозы в камбиальной зоне

Развитие ксилемы (особенно стадия отложения вторичной клеточной стенки) требует больших субстратных и энергетических затрат (Антонова, 1999). Транспорт сахарозы из проводящей флоэмы к камбиальной зоне возможен через апопластный и симпластный пути. В первом случае сахароза из ситовидных элементов флоэмы попадает в клеточную стенку, откуда благодаря переносчикам транспортируется в клетку. Во втором случае пассивная (без затрат энергии) разгрузка по градиенту концентрации происходит из ситовидных трубок через плазмодесмы прямо в эндоплазматические сети окружающих паренхимных клеток (Гамалей, 2004) (рис. 33).

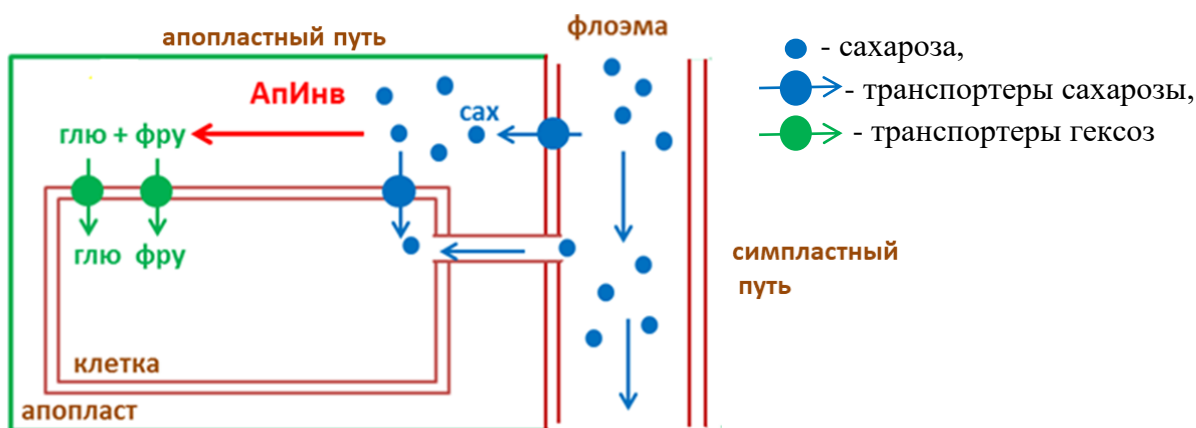


Рисунок 33. Схематическое изображение возможных путей межклеточного транспорта сахарозы.

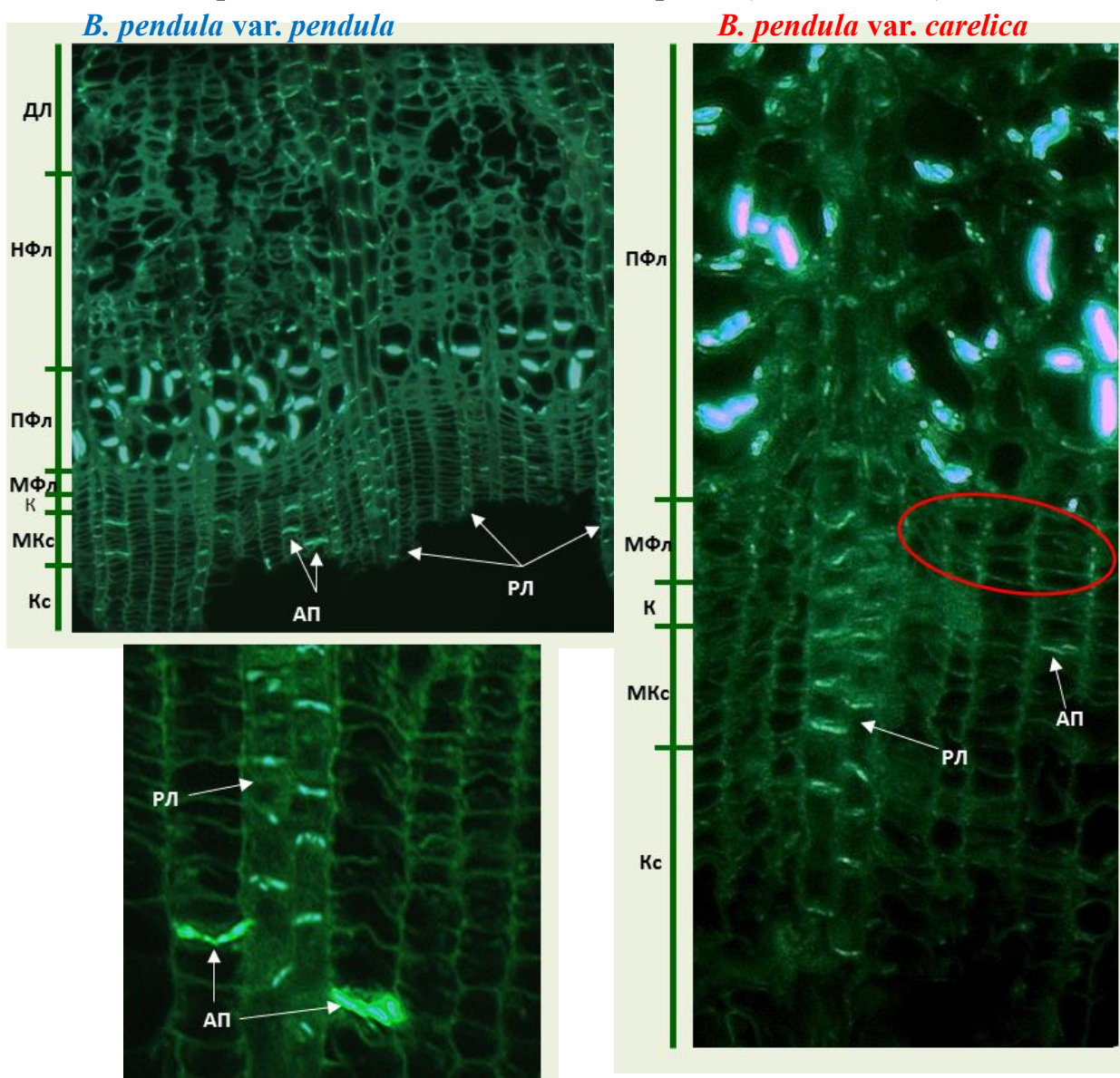
При изучении механизмов дифференцировки клеток камбиальной зоны древесных растений важным вопросом является наличие или отсутствие плазмодесменных связей между клетками проводящей флоэмы и камбиальной зоны. Исследования, проведенные на сосне скрученной, показали, что в камбиальной зоне ни в веретеновидных инициалах, ни в радиальных стенках недифференцированных камбиальных клеток плазмодесменных связей и поровых полей не обнаружено. Авторы предполагают, что до начала роста растяжением, когда уже наблюдается появление

поровых полей, в транспорте ассимилятов основная роль принадлежит апопласту (Barnett, Harris, 1975).

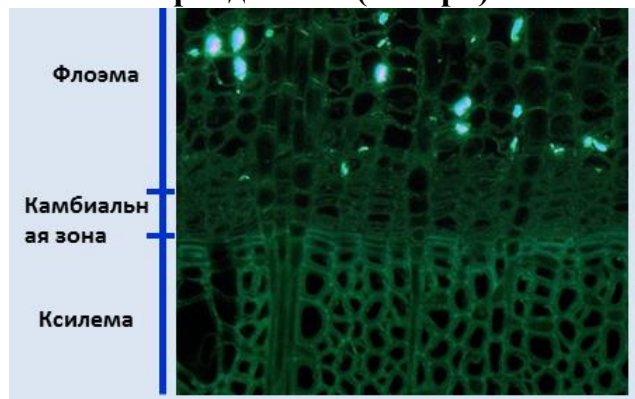
Мы провели изучение симпластных транспортных потоков сахарозы в тканях ствола березы повислой в период активного камбиального роста и в период покоя. Диаметр плазмодесм существенно ниже длины волны видимого света, поэтому их наблюдение с помощью классической световой микроскопии невозможно. Однако, поскольку в зоне расположения плазмодесм в клеточных оболочках имеют место отложения каллозы (Kumar et al., 2015), то локализацию этих мелких транспортных каналов, связывающих соседние клетки, можно обнаружить по свечению каллозы в люминесцентном микроскопе. Каллоза (β -(1 \rightarrow 3)-глюкан) представляет собой структурный полисахарид клеточных оболочек и особенно интересна в связи с ее участием в регуляции транспорта ассимилятов. Исследования показали (Л.Л.Новицкая, Л. Семенова, неопубликованные данные), что отложение каллозы на оболочках клеток аксиальной паренхимы и в клетках радиальных лучей наблюдается только в период камбиального роста и отсутствует в период покоя (рис. 34). Был сделан вывод, что отложения каллозы на оболочках клеток можно использовать в качестве маркеров наличия, направленности и интенсивности межклеточных симпластных потоков в паренхиме ствола древесных растений.

Результаты показали, что в период камбиального роста у березы повислой имеет место единая симпластная сеть, объединяющая ситовидные трубки флоэмы, клетки радиальных лучей, материнские клетки флоэмы. Симпластная связь между проводящей флоэмой и зоной дифференциации ксилемы у березы осуществляется только по паренхимным клеткам радиальных лучей, симпластические контакты между клетками лучей и прозенхимными ксилемными производными камбия отсутствуют (рис. 34).

Период активного камбиального роста (начало июля)



Период покоя (ноябрь)



ДЛ – зона дилатации лучей
 НФл – непроводящая флоэма
 ПФл – проводящая флоэма
 МФл – зона материнских клеток флоэмы
 К – камбий
 МКс – зона материнских клеток ксилемы
 Кс – зона роста и дифференциации клеток ксилемы
 РЛ – радиальный луч
 АП – аксиальная паренхима

Рисунок 34. Визуализация симпластного транспорта по свечению каллозы. (флуоресцентный микроскоп, окраска анилиновым голубым) (Новицкая, Семенова, неопубликованные данные).

Этот вывод находится в соответствии с данными электронно-микроскопического исследования камбиальной зоны березы повислой, полученными Л.А. Барильской (1978). В частности, было показано, что при отложении камбием клеток, преобразующихся в ходе последующей дифференциации в сосуды и волокна древесины, имеет место полная изоляция их протопластов уже в процессе формирования клеточной пластинки, поскольку плазмодесмы в них не закладываются. Вместе с тем при образовании будущих паренхимных клеток древесины заложение плазмодесм во время деления происходит, вследствие чего цитоплазматическая непрерывность в этих клетках сохраняется.

Полученные результаты подтверждают высказанное другими авторами (Barnett, Harris, 1975) предположение об апопластном транспорте сахарозы из клеток лучей в прозенхимные ксилемные производные камбия. Обязательное участие апопластного пути в транспорте сахарозы на определенном этапе развития является общей особенностью большинства репродуктивных органов (Patrick, Offler, 2001; Jin et al., 2009; Ruan et al., 2010).

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 гексозных транспортеров (Ruan et al., 2010; Wang, Ruan, 2013).

На 25-летних деревьях карельской березы с разной степенью узорчатости древесины определили уровень экспрессии генов, кодирующих переносчики сахарозы (*Suc*) и гексоз (*Hex1*, *Hex2*), в формирующейся ксилеме. Исследование проводили в период активного деления в камбиальной зоне.

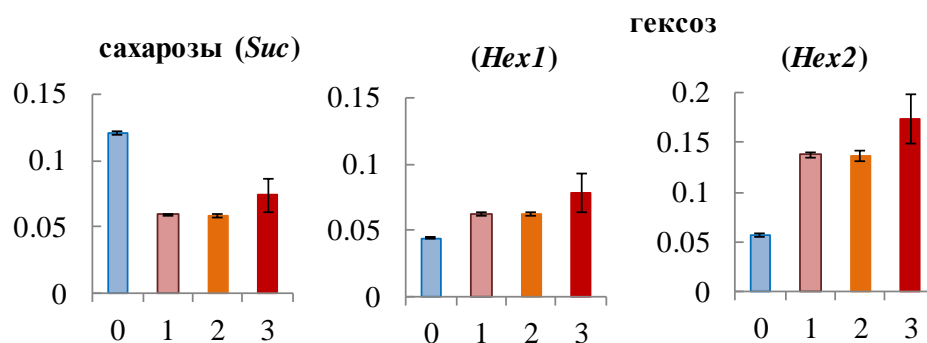
У безузорчатых растений карельской березы уровень экспрессии генов, кодирующих переносчики сахарозы, был в 2 раза выше, по сравнению с узорчатыми растениями. При этом количество транскриптов генов *Hex1* и *Hex2* было значительно больше в формирующейся аномальной древесине (рис. 35). В ксилемной части камбиальной зоны узорчатых растений снижается в 2-2.5 раза содержание гексоз и возрастает в 2.5-3 раза количество крахмала. 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 в формирующихся клетках ксилемы синтезируется большее количество крахмала (рис. 35).

B. pendula var. carelica



Относительный уровень экспрессии генов, кодирующих переносчики



Содержание в ксилемной части камбиальной зоны

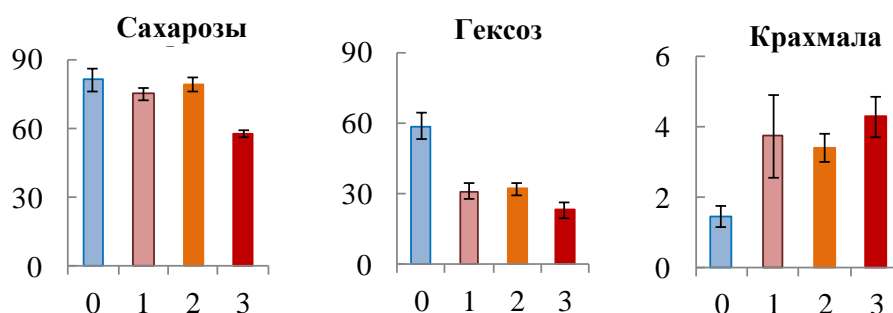


Рисунок 35. Окоренная поверхность древесины, относительный уровень экспрессии генов (отн. ед.), кодирующих переносчики сахарозы (*Suc*) и гексоз (*Hex1*, *Hex2*) и содержание (мг/г сухой ткани) сахарозы, гексоз, крахмала в ксилеме 25-летних безузорчатых (0 баллов) и узорчатых (1-3 балла степень узорчатости) растений карельской березы, произрастающих на лесосеменной плантации. По оси абсцисс – балл узорчатости. Представлены средние значения и их стандартные ошибки.

Полученные данные свидетельствуют о том, что при разных сценариях ксилогенеза прозенхимные ксилемные производные камбия получают ассимиляты в разной форме. При формировании нормальной 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 АПИ_{нв}, и в клетку в основном поступают образующиеся гексозы, которые в свою очередь запасаются в виде крахмала.

4.3.2. Зависимость активности гексокиназы в период камбиального роста от степени узорчатости древесины

Апопластная глюкоза может быть распознана RGS1, который передает внеклеточный сигнал сахара в клетку через G-белки (Wang, Ruan, 2013). Помимо G-белка, хорошо известным посредником, передающим сигналы, возникающие при увеличении уровня глюкозы в клетке, является гексокиназа (ГК) (Rolland et al., 2006; Balasubramanian et al., 2007; Karve et al., 2008; Wang, Ruan, 2013; Ruan 2014). Активированная глюкозой ГК1 входит в состав высокомолекулярного ядерного комплекса, регулирующего транскрипцию через прямое связывание с промоторами соответствующих генов (Ramon et al., 2008). ГК рассматривают в качестве главного кандидата на роль регулятора экспрессии ядерных генов в ответ на метаболическое состояние клетки. ГК в растении играет двойную роль: в глюкозном сигналинге и в фосфорилировании глюкозы (Wang, Ruan, 2013). Гексокиназа (КФ 2.7.1.1, АТФ-зависимая D-гексоза-6-фосфотрансфераза) катализирует необратимую реакцию фосфорилирования глюкозы:



Исследование активности ГК проводили на 40-летних деревьях обычной и карельской березы, произрастающих в одинаковых почвенно-климатических условиях на Агробиологической станции КарНЦ РАН. Отбор образцов вели в течение вегетационного периода 2010 года:

май – распускание листьев (активный ксилемный транспорт);

июнь – интенсивный прирост ксилемы (активный флоэмный транспорт ассимилятов к камбиальной зоне и ксилеме);

июль – период активного роста, формирование вторичной клеточной стенки, в связи с отсутствием дождей и высокими температурами в это время имело место преждевременное торможение камбиального роста;

октябрь – период затухания ростовых процессов, идет подготовка растения к состоянию покоя (транспортные процессы замедлены (Гамалей, 2004).

В мае, когда камбий еще бездействует, активность ГК в ксилеме практически не обнаруживалась, во флоэме ее значения достигали 9 и 14 нмоль образовавшегося глюкозо-6-фосфата на мг белка (нмоль Г-6-Ф/мг белка) у обычной и карельской березы соответственно (рис. 36). В период активного камбиального роста в ксилемной части камбиальной зоны у двух форм березы повислой активность ГК резко возрастала, и значения ее достигали 450 нмоль Г-6-Ф/мг белка. Во флоэме повышение активности ГК (до 23 нмоль Г-6-Ф/мг белка) наблюдали только у растений карельской березы, у обычной березы в период камбиального роста во флоэме активность фермента оставалась низкой (~ 2 нмоль Г-6-Ф/мг белка) (рис. 36).

В июле погодные условия вызвали остановку деятельности камбия. В этих условиях запрос на ассимилянты со стороны ксилемы сильно ослабевает и активность ГК снижается в 4 и 10 раз у карельской и обычной березы соответственно. Во флоэме активность ГК у обычной березы не изменяется, у карельской березы она падает в 10 раз (рис. 36). Подготовка растения к состоянию покоя сопровождается накоплением в тканях коры запасных метаболитов. В этот период во флоэме наблюдался пик активности АПИнв (рис. 10, раздел 3.2). Гексозы, образующиеся в апопласте, возвращаются 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). При этом активность ГК во флоэме возросла до 34 и 71 нмоль Г-6-Ф/мг белка у обычной и карельской березы соответственно (рис. 36). У карельской березы высокая активность ГК во флоэме наблюдалась на фоне большей в 1.8 раз активности АПИнв (рис. 10, раздел 3.2).

40-летние растения обычной и карельской березы

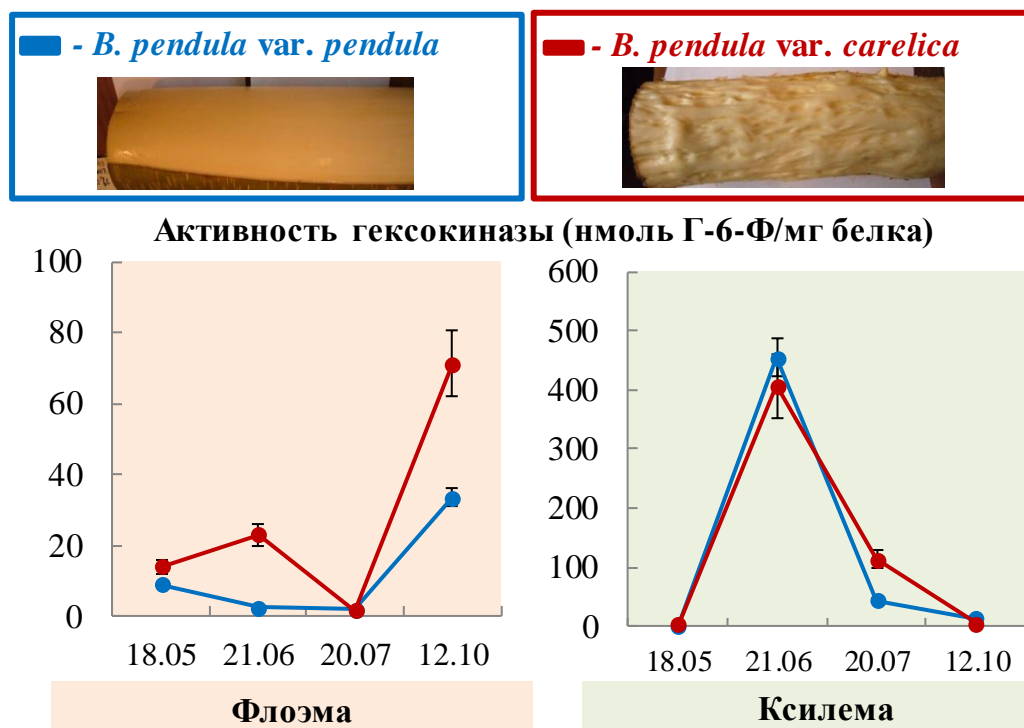


Рисунок 36. Окоренная поверхность древесины, активность гексокиназы (нмоль образовавшегося глюкозо-6-фосфата (Г-6-Ф) на мг белка) во флоэме и ксилеме 40-летних растений обычной (*B. pendula* var. *pendula*) и карельской (*B. pendula* var. *carelica*) березы в течение вегетационного сезона. По оси абсцисс – дата взятия образцов. Представлены средние значения и их стандартные ошибки.

Глюкозный сигналинг в растении, с одной стороны, инициирует рост, связанный с пролиферацией клеток, с другой стороны, контролирует энергетический и углеродный гомеостаз (Wang et al., 2006). В связи с этим интересные данные получены на 25-летних растениях карельской березы, отличающихся по степени узорчатости древесины и произрастающих на разных по уровню плодородия участках. На участке 1 (почва поверхностно-подзолистая песчаная) растения испытывали дефицит азота на фоне повышенного содержания фосфора. Участок 2 (почва дерново-средне-подзолистая, песчаная, каменистая) по запасам подвижных форм основных элементов питания относился к норме. Исследование проводили в период активного камбиального роста в начале июля 2013г. Безузорчатые растения, произрастающие на разных по уровню плодородия участках, не отличались между собой по активности НК, как и у 40-летних

растений обычной березы (рис. 36) ее активность в ксилеме превышала таковую во флоэме (рис. 37). У узорчатых растений, по сравнению с безузорчатыми, активность НК была выше во флоэме (участок 1, в почве дефицит азота на фоне повышенного содержания фосфора) или в ксилеме (участок 2, в почве нет недостатка в основных элементах минерального питания). При этом растения с первого участка отличались более толстой корой и меньшим диаметром ствола на высоте 1.3 м от земли, по сравнению с растениями со 2-го участка (рис. 37).

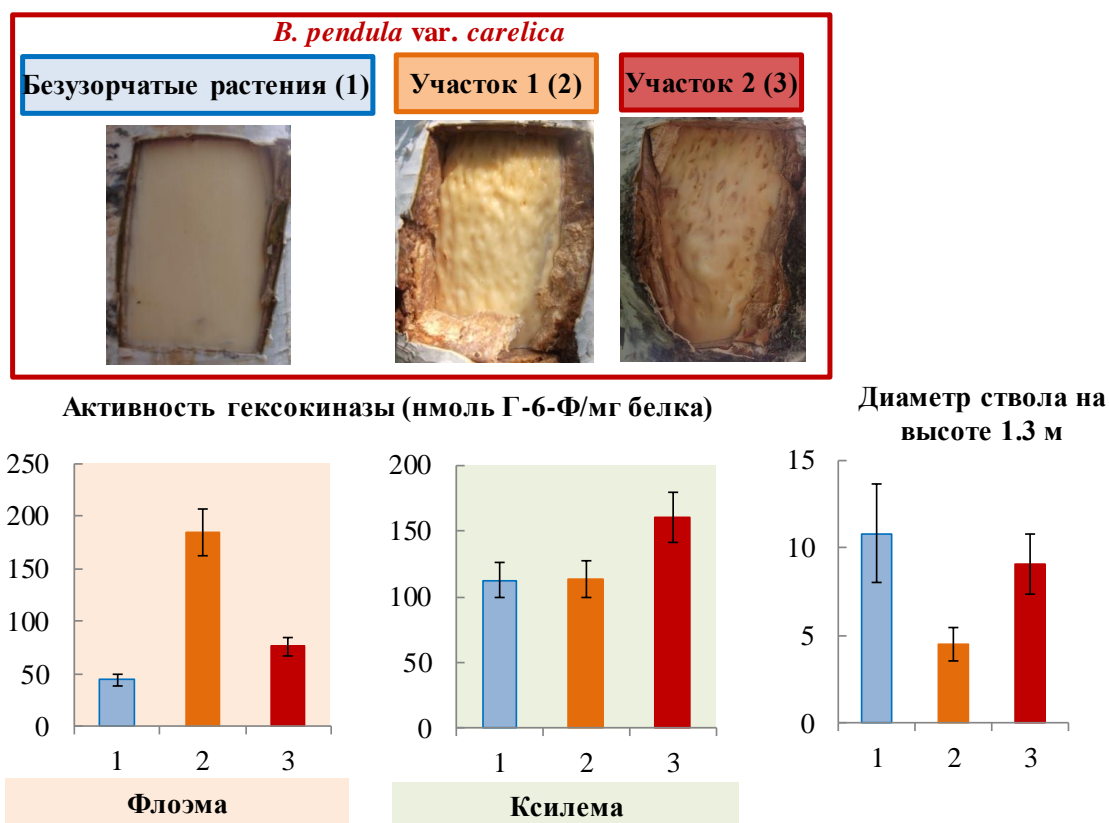


Рисунок 37. Окоренная поверхность древесины, активность гексокиназы (нмоль образовавшегося глюкозо-6-фосфата (Г-6-Ф) на мг белка) во флоэме и ксилеме и диаметр ствола на высоте 1.3 м от земли (см) 25-летних растений карельской березы, произрастающих на лесосеменной плантации. По оси абсцисс отмечены безузорчатые растения (1), узорчатые растения, произрастающие на первом (2) и втором (3) участках. Пояснения в тексте. Представлены средние значения и их стандартные ошибки.

Меньшая активность СС в ксилеме в период активного камбиального роста у карельской березы способствует (1) большому оттоку сахарозы в апопласт флоэмы и (2)

накоплению сахарозы в свободном пространстве дифференцирующихся ксилемных производных камбия. Это приводит к повышению активности АПИИВ как в тканях флоэмы, так и ксилемы, и, следовательно, к возращанию содержания свободных гексоз в клетке. Таким образом, в период активной камбиальной деятельности формирование аномальной древесины идет на фоне большего количества свободных гексоз в клетке. Фосфорилирование глюкозы гексокиназами играет ключевую роль в триггерной регуляции сахарами экспрессии основных генов углеводного обмена (Graham et al., 1994; Roitsch et al., 1995; Jang, Sheen, 1994; Gibson, 2000).

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

Исследования проводили на 25-летних деревьях карельской березы, произрастающих на лесосеменной плантации (Медвежьегорский район, Республика Карелия). Характеристика территории и объектов исследования приведена в разделе 3.4.2. Всем растениям был присвоен балл от 0 до 3 в зависимости от степени проявления узорчатости древесины (рис. 38). Отбор образцов проводили в период активного формирования ранней тонкостенной древесины (начало июля 2017 г.).

Показано, что при формировании нормальной по строению древесины (безузорчатые растения, 0 баллов) в камбиальной зоне и дифференцирующейся ксилеме (основной акцептор фотоассимилятов в середине июня – июле) утилизация сахарозы происходит в основном с участием СС (рис. 26). Образующаяся в результате сахарозосинтазного расщепления УДФ-глюкоза активно расходуется на синтез компонентов клеточной стенки (Amor et al., 1995; Koch, 2004; Coleman et al., 2009; Naigler et al., 2001; Bieniawska et al., 2007). Формирование аномальной (узорчатой) древесины происходит на фоне меньшей в 1.7 раз активности СС (рис. 26). Снижение активности СС сопровождалось снижением содержания целлюлозы в формирующейся ксилеме с 45.5% у безузорчатых растений до 42, 40.8, 38.2 % у узорчатых растений со степенью узорчатости 1, 2 и 3 балла соответственно (рис. 31). Уменьшение содержания целлюлозы в формирующейся ксилеме происходило на фоне снижения уровня экспрессии генов, кодирующих целлюлозосинтазу (*Ces8*, *Ces3*, *Ces7*) (рис. 31). Избыток сахарозы может утилизироваться в апопласте с помощью АпИInv. У безузорчатых растений карельской березы в ксилемной части камбиальной зоны активность АпИInv была низкая и не превышала 0.4 мкмоль сахарозы/г ткани (рис. 38). У узорчатых растений активность АпИInv в ксилеме была в 2.5-4.5 раз выше и составила 1, 1.3, 1.8 мкмоль сахарозы/г ткани у растений со степенью узорчатости 1, 2 и 3 балла соответственно (рис. 38). У растений со степенью узорчатости 3 балла активность АпИInv была выше, по сравнению с растениями карельской березы со степенью узорчатости 1 и 2 балла.

Рассмотрим возможные пути регуляции активности АпИInv.

У безузорчатых растений содержание транскриптов генов *CWIN1*, *CWIN1.1*,

CWIN4, кодирующих АпИньв, 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 таковой в нормальных тканях ксилемы в 4-5 раз (рис. 38). Между растениями с разной степенью узорчатости древесины не было обнаружено отличий по количеству транскриптов генов *CWIN1*, *CWIN1.1*, *CWIN4*. Относительный уровень их экспрессии, как и активность АпИньв, сильно варьировали в зависимости от условий произрастания дерева. Следует отметить, что узорчатые растения не отличались между собой и по количеству транскриптов генов *Sus1* и *Sus2* (рис. 26).

B. pendula var. carelica

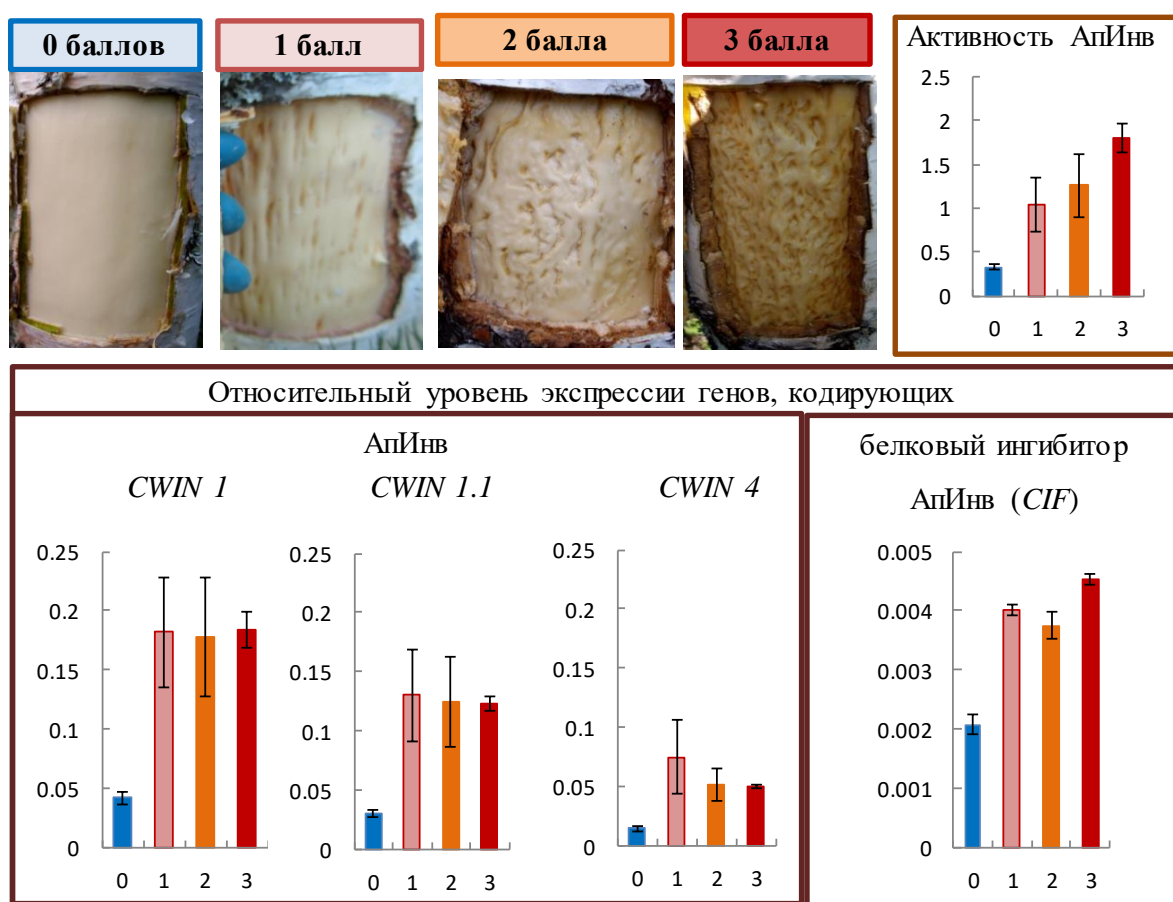


Рисунок 38. Активность апопластной инвертазы (АпИньв) (мкмоль сахарозы/г сырой ткани), относительный уровень экспрессии генов, кодирующих АпИньв (*CWIN1*, *CWIN1.1*, *CWIN4*), и гена, кодирующего белковый ингибитор АпИньв (*CIF*) в тканях ствола 11-летних растений обычной березы, безузорчатой и узорчатой частях ствола карельской березы. Представлены средние значения и их стандартные ошибки.

Более тонкая регуляция активности АпИнв осуществляется на посттрансляционном уровне. Белковый ингибитор апопластной инвертазы растений, кодируемый геном *C/VIF* (*CIF*), участвует в регуляции транспорта сахарозы и ее метаболизма (Rausch, Greiner, 2004; Roitsch, Gonzalez, 2004). На травянистых растениях показано, что наибольшая экспрессия *CIF* наблюдается в стебле (Greiner et al., 1998; Rausch, Greiner, 2004). Появление избытка сахарозы в апопласте снижает уровень экспрессии генов *CIF*, приводя к возрастанию активности АпИнв (Ruan et al., 2010; French et al., 2014; Ruan, 2014; Tang et al., 2017).

Низкий уровень экспрессии *CIF* в камбиальной зоне и формирующейся ксилеме (рис. 38) у обеих форм березы свидетельствует о довольно высоком количестве сахарозы в апопласте. Как было показано (раздел 4.3.1), 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 АпИнв был выше и уровень экспрессии генов, кодирующих белковый ингибитор АпИнв (*CIF*) (рис. 38). Подобное, казалось бы, противоречие может свидетельствовать о том, что в камбиальной зоне узорчатых растений в период активного формирования ранней тонкостенной древесины содержание сахарозы в апопласте меньше, чем у безузорчатых растений. Косвенным подтверждением этого является высокая утилизация сахарозы АпИнв у узорчатых растений (рис. 38) и тот факт, что в формирующейся аномальной древесине было значительно больше транскриптов генов *Hes1* и *Hes2* (рис. 30).

В данной связи представляет интерес рассмотрение путей регуляции активности АпИнв 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) (рис. 39). Отбор и фиксация растительного материала проведены в период активного формирования вторичной клеточной стенки (июль 2016 года). Формирование нормальной по строению древесины, в составе которой преобладают сосуды и волокна, происходит на фоне высокой активности СС в ксилеме (рис. 19, раздел 3.4.3) и сопровождается активным синтезом структурных компонентов клеточных стенок (целлюлозы) (рис. 34). Формирование аномальной узорчатой древесины, для которой характерны крупные включения клеток паренхимы, происходит

на фоне низкой активности СС в ксилеме (рис. 19, раздел 3.4.3) и сопровождается уменьшением содержания целлюлозы (рис. 39).

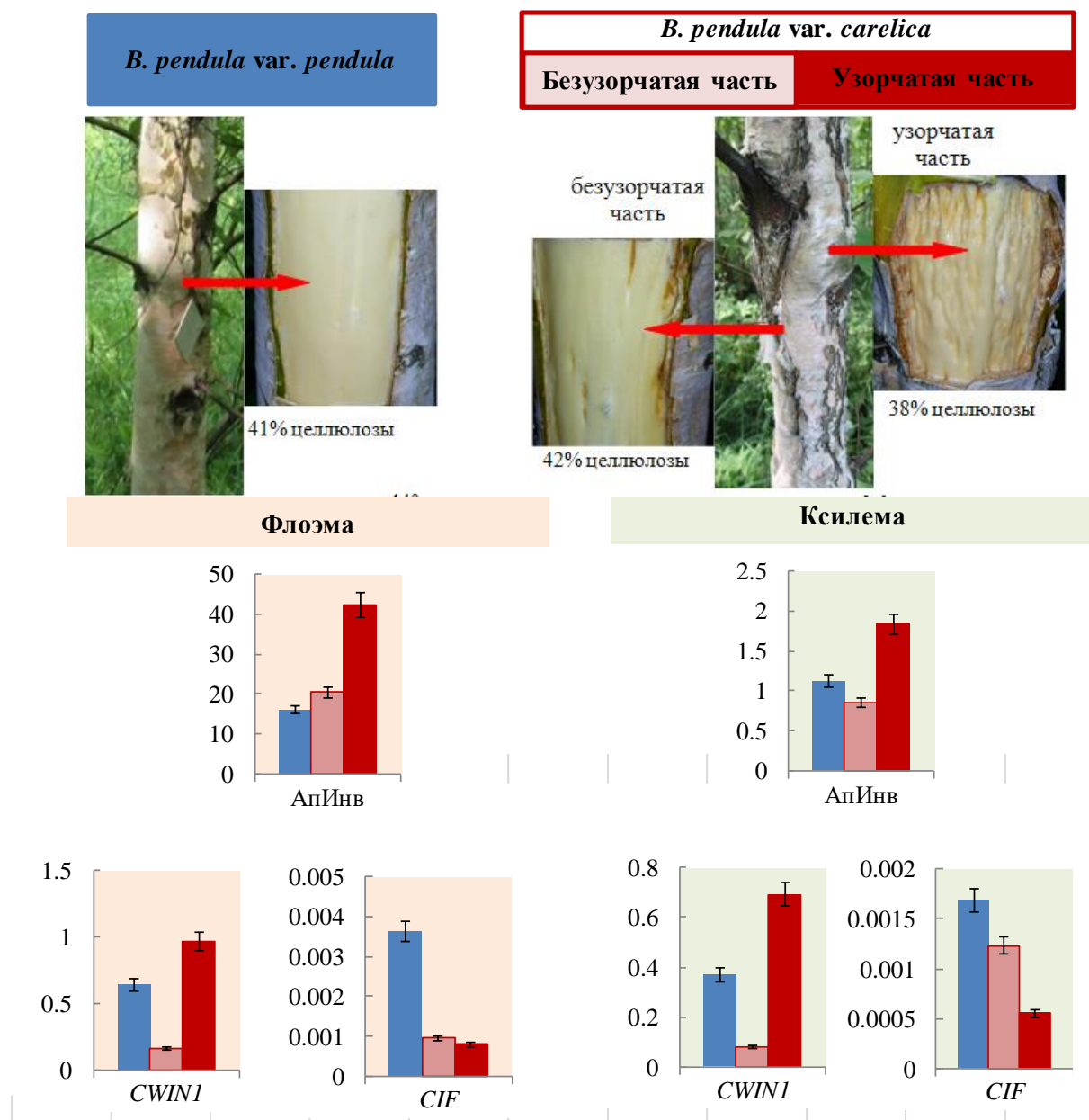


Рисунок 39. Активность апопластной инвертазы (АпИInv) (мкмоль сахарозы/г сырой ткани), относительный уровень экспрессии гена, кодирующего АпИInv (*CWIN*), и гена, кодирующего белковый ингибитор АпИInv (*CIF*) в тканях ствола 11-летних растений обычной березы, безузорчатой и узорчатой частях ствола карельской березы. Представлены средние значения и их стандартные ошибки.

Активность АпИInv 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 АпИнв наблюдалась на фоне большей экспрессии кодирующих ее генов (*CWIN1*) (в 1.5 и 1.7 раз во флоэме и ксилеме соответственно). При этом содержание транскриптов мРНК гена, кодирующего белковый ингибитор АпИнв (*CIF*), было в 4.5 и 3 раза меньше во флоэме и ксилеме соответственно (рис. 39).

В тканях безузорчатой части ствола карельской березы активность АпИнв 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 раз меньше, по сравнению с обычной березой, во флоэме и ксилеме соответственно (рис. 39).

На основании полученных данных можно предположить, что регуляция активности АпИнв в безузорчатой части ствола узорчатых растений карельской березы (рис. 39), как и у безузорчатых растений карельской березы (рис. 38), происходит на уровне экспрессии генов *CWIN*. В нормальной по строению древесине обычной березы в период камбиального роста уровень экспрессии генов, кодирующих АпИнв, существенно не отличается от такового у карельской березы, а регуляция активности фермента происходит в основном на посттрансляционном уровне через белковые ингибиторы (*CIF*) (рис. 39). Это позволяет предположить, что у обычной березы в тканях флоэмы 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. Косвенным подтверждением этого может служить высокий уровень экспрессии генов, кодирующих переносчики сахарозы (рис. 35).

4.5. Экспериментальное изменение активности апопластной инвертазы у обычной березы повислой

4.5.1. Торможение камбиального роста у сеянцев березы повислой сопровождается возрастанием метаболизации сахарозы в камбиальной зоне по апопластному пути

Исследование проводили на 4-летних сеянцах обычной и карельской березы, выращенных в одинаковых условиях на Агробиологической станции КарНЦ РАН. Зависимость между содержанием растворимых сахаров и активностью исследуемых ферментов изучали:

- в начале вегетации (15 мая). Этот этап предшествовал фазе разворачивания листьев, основным аттрагирующим центром являлись распускающиеся почки;
- в конце июля, когда основной отток ассимилятов из листьев обычно направлен интенсивно растущий ствол и тратится на процессы дифференциации ксилемы и утолщение вторичной клеточной стенки. В нашем эксперименте отбирали растения, у которых рост ксилемы был заторможен (рис. 42) благодаря весенней пересадке сеянцев;
- в конце октября. Период подготовки растений к состоянию покоя.

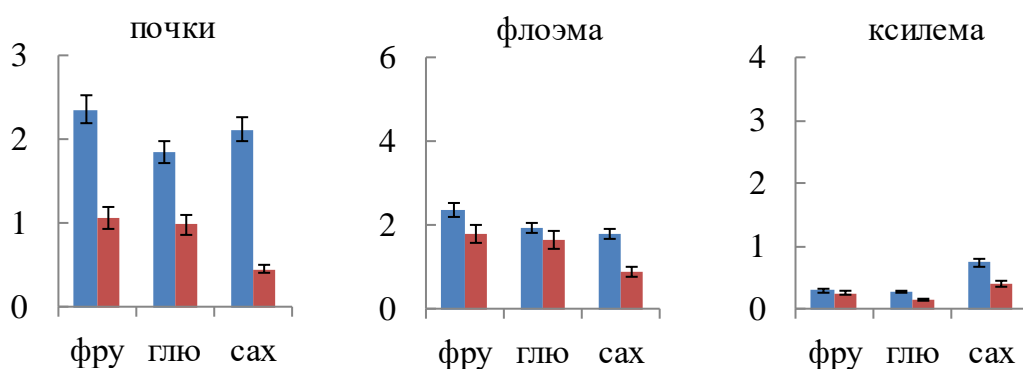
Содержание сахаров и активность ферментов их метаболизации у сеянцев березы повислой в начале вегетации

В мае у обеих форм березы повислой содержание сахарозы по сравнению с гексозами было выше как в тканях ствола (флоэма, ксилема), так и в почках. При этом во флоэме сахарозы было больше, чем в ксилеме. Все ткани карельской березы были более богаты сахарами, чем ткани обычной березы (рис. 40). Эти данные согласуются с гипотезой о том, что нарушение дифференциации камбиальных производных может возникать в местах с избыточным содержанием сахаров, в частности сахарозы (Новицкая, 1997, 1999, 2000; Novitskaya, Kushnir, 2006).

В период завершения ростовых процессов (ноябрь, 2008) соотношение сахаров у растений было иным (рис. 40): основная масса растворимых углеводов представлена в виде моносахаров – фруктозы и глюкозы. Так же как и в мае, содержание сахаров было выше у карельской березы.

■ - *B. pendula* var. *pendula* ■ - *B. pendula* var. *carelica*

ноябрь, 2008 - период покоя



май, 2009 - начало вегетации

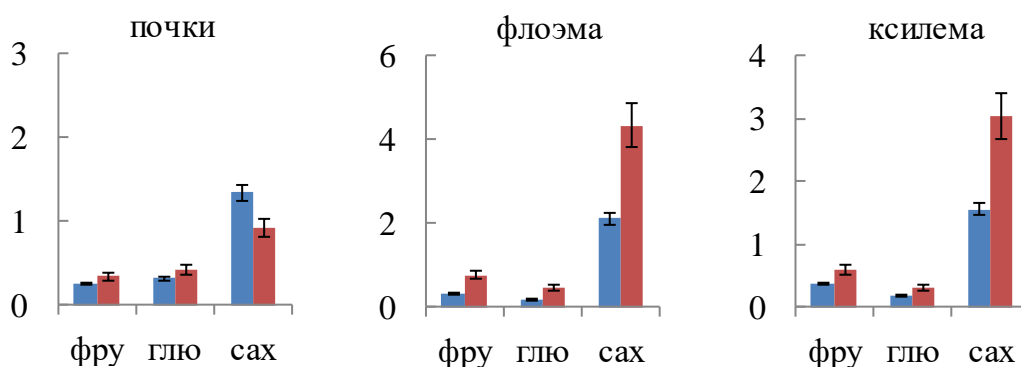


Рисунок 40. Содержание фруктозы (фру), глюкозы (глю), сахарозы (сах) (мг/г ткани) в почках и в тканях ствола (флоэма, ксилема) у 4-летних деревьев двух форм березы повислой в период покоя и в начале вегетации. Представлены средние значения и их стандартные ошибки.

Для обеих форм березы было характерно превышение содержания фруктозы над глюкозой (рис. 40). Это могло быть следствием нескольких причин: а) содержание гексоз определяется не только активностью инвертаз, но и СС, которая расщепляет сахарозу на фруктозу и УДФ-глюкозу, б) транспортной формой сахаров служит не только сахароза, но и олигосахариды, в) глюкоза и фруктоза с разной интенсивностью поглощаются и метаболизируются клетками.

Как и у взрослых растений, у 4-летних деревьев березы повислой самой высокой была активность АпИнв, значения ее превышали активность других форм инвертазы в 10 и более раз (рис. 41).

Как и у взрослых растений, активность АпИInv у карельской березы, по сравнению с обычной березой, в тканях флоэмы и ксилемы была выше (рис. 41). При этом у карельской березы было более высоким и содержание сахарозы (рис. 40).

Активность ВаКИInv во флоэме и ксилеме обычной березы была невысока, ее значения были примерно такие же, как у ЦитИInv. Другая ситуация наблюдалась у карельской березы, активность ВаКИInv у нее была в 2.5 и 2 раза выше, по сравнению с обычной березой, во флоэме и в ксилеме соответственно (рис. 41).

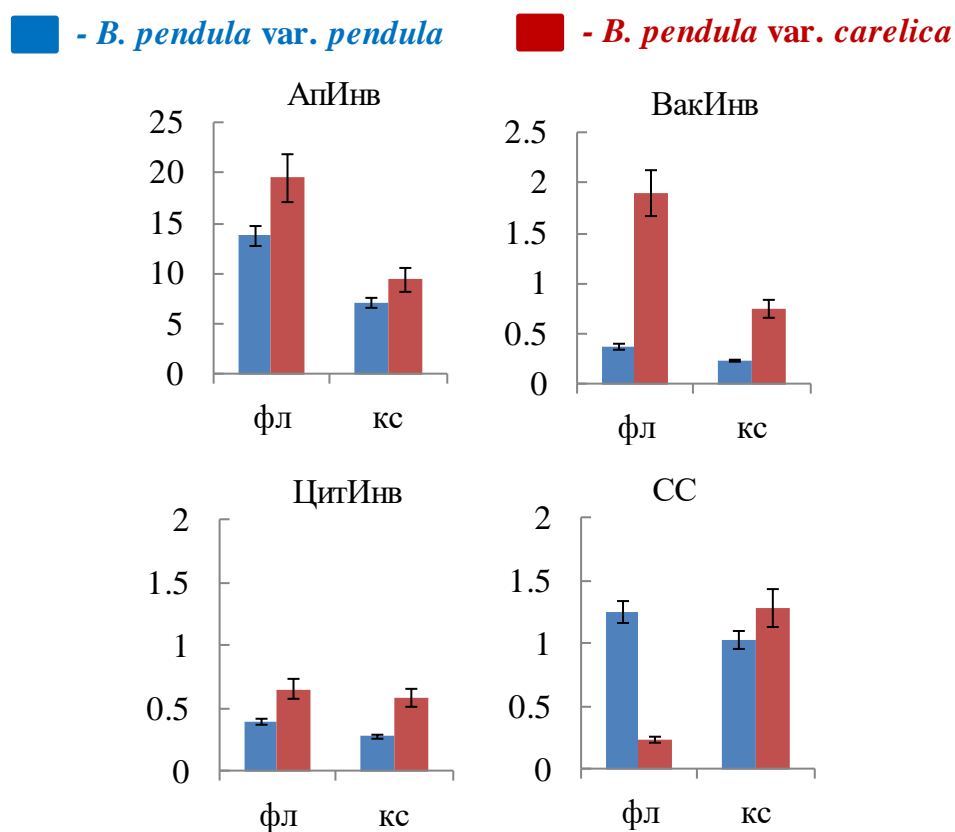


Рисунок 41. Активность апопластной инвертазы (АпИInv), вакуолярной инвертазы (ВаКИInv), цитоплазматической инвертазы (ЦитИInv) и сахарозосинтазы (СС) (мкмоль сахарозы / г сырой ткани) во флоэме (фл) и ксилеме (кс) 4-летних растений обычной (*B. pendula var. pendula*) и карельской (*B. pendula var. carelica*) березы. Дата отбора 15.05.09. Представлены средние значения и их стандартные ошибки.

Сравнение активности разных форм инвертазы у исследуемых форм березы на фоне более высокого (в два раза) уровня сахарозы в камбиальной зоне карельской

березы дает основание предположить, что у карельской березы имеет место более интенсивный выход сахарозы в апопласт и ее более активное расщепление.

Активность СС была сравнима с активностью ЦитИнв. Поэтому возможно, что цитоплазматическая сахароза расщепляется обоими ферментами в равной степени. Во флоэме карельской березы активность СС была ниже, по сравнению с обычной березой (рис. 41).

Таким образом, перед началом интенсивного роста в тканях карельской березы накапливается больше всех форм сахаров, чем в тканях обычной березы. Причиной накопления гексоз может быть более высокая активность инвертаз у карельской березы. Повышение при этом содержания сахарозы может быть связано с поступлением ее из запасующих тканей ствола в процессе гидролиза запасных полисахаридов, которых, вероятно, у карельской березы больше, чем у обычной березы. Полученные данные свидетельствуют о том, что у 4-летних растений обычной и карельской березы, еще не имеющих видимых морфологических отличий, проявляется такая же, как и у взрослых растений, разница в соотношении активности ферментов метаболизации сахарозы.

Содержание сахаров и активность ферментов их метаболизации у сеянцев березы повислой в условиях торможения камбиальной активности

В условиях торможения роста, вызванного весенней пересадкой растений, прирост древесины и коры текущего года у карельской березы был значительно меньше обычно наблюдаемого в этот период, а у обычной березы составил всего несколько слоев клеток. В результате на срезе стебля обычной березы прирост текущего года трудно выделить (рис. 42). Общая толщина коры и древесины у карельской березы была значительно больше, чем у обычной березы (рис. 42).

Торможение роста привело к повышению во флоэме количества сахарозы у обеих форм березы (рис. 43). Так, в июле ее содержание составило ~ 7 мг/г сырой ткани, а к октябрю возросло до 12.9 и 20.6 мг/г у карельской и обычной березы соответственно. Увеличение содержания сахарозы могло быть причиной роста уровня моносахаров, притом их соотношение было близко к единице. Во флоэме обычной березы в июле содержание фруктозы и глюкозы было выше, чем у карельской березы, а в период подготовки деревьев к покою накапливалось больше сахарозы.

В ксилеме наоборот, хотя количество сахарозы также существенно повышалось к октябрю, но моносахаров больше накапливалось у карельской березы. Подобные отличия могут быть обусловлены большими тратами метаболитов на приросты текущего года у растений карельской березы (рис. 43).

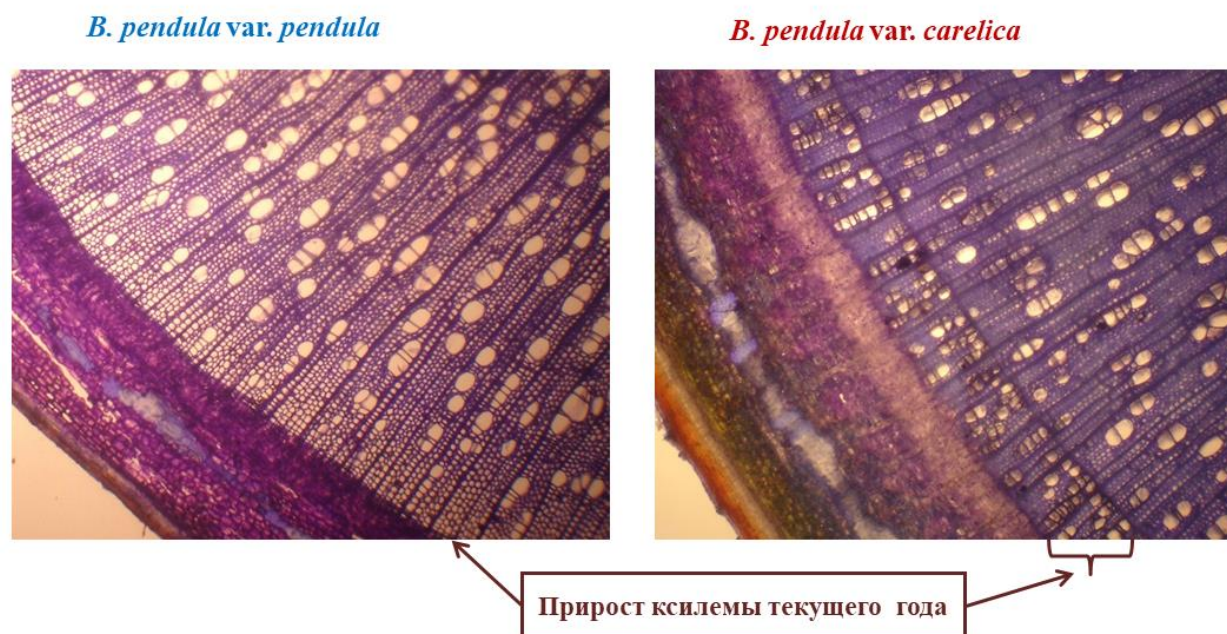


Рисунок 42. Поперечные срезы ствола обычной (*B. pendula var. pendula*) и карельской (*B. pendula var. carelica*) березы, демонстрирующие снижение (у карельской березы) и практически полное прекращение (у обычной березы) образования ксилемы текущего года, вызванное весенней пересадкой растений. Окраска крезилловым фиолетовым. Дата отбора 21.07.2009.

В нормальных условиях формирования приростов (без торможения ростовых процессов) у растений во флоэме не происходило увеличение содержания сахарозы (рис. 43), напротив, ее количество в течение вегетации уменьшалось, а содержание моносахаров увеличивалось. Это может быть связано с работой ферментов метаболизма сахарозы и активным использованием сахаров на рост тканей ствола. Таким образом, уменьшение приростов ксилемы и флоэмы, вызванное торможением ростовых процессов в результате весенней пересадки растений, привело к существенному увеличению в тканях ствола уровня сахарозы.

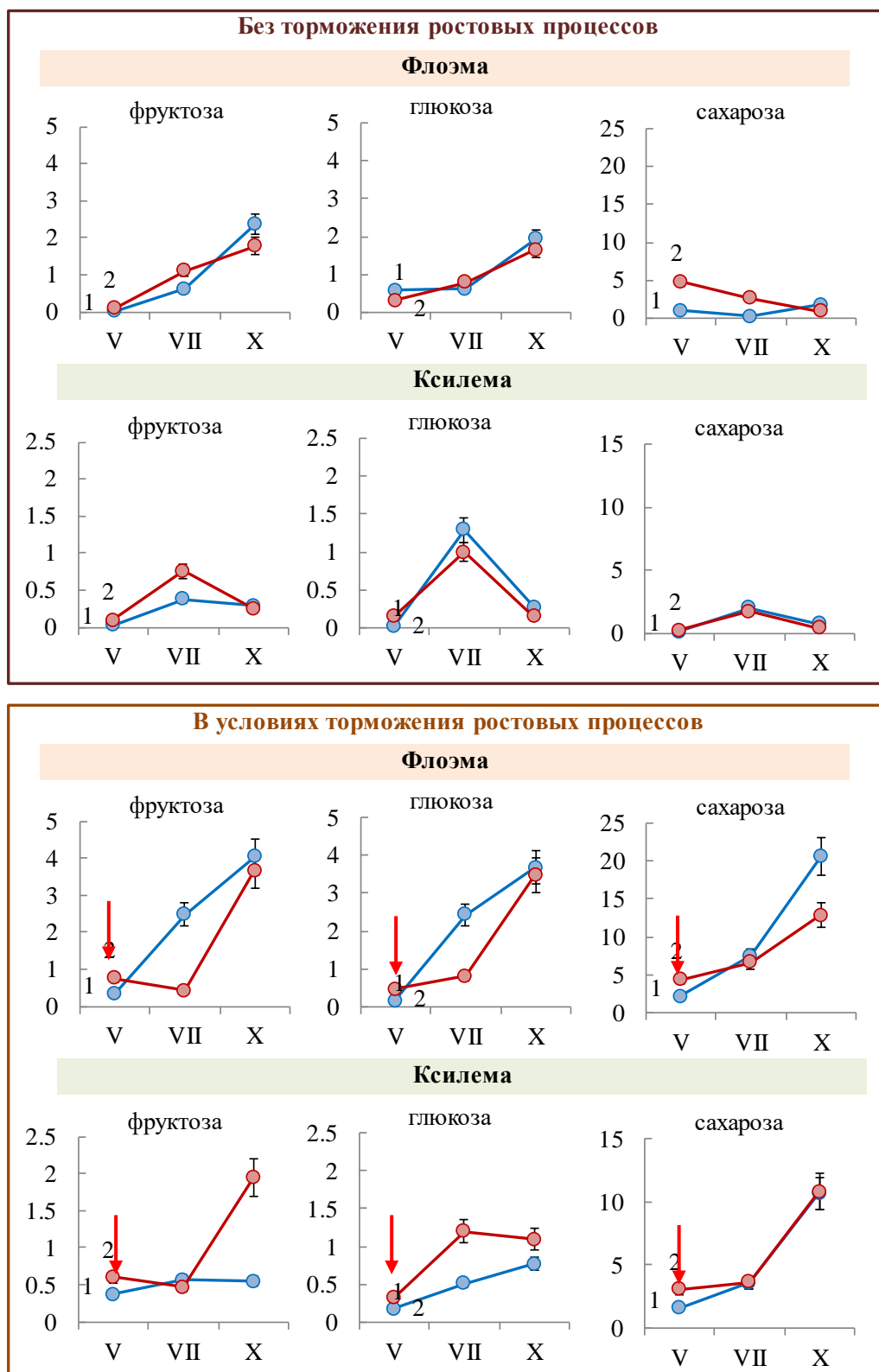


Рисунок 43. Содержание сахаров (мг/г) во флоэме и ксилеме 4-летних деревьев обычной (1) и карельской (2) березы при нормальных ростовых процессах и в условиях торможения роста (стрелками показано время пересадок). Представлены средние значения и их стандартные ошибки.

Повышение содержания сахарозы во флоэме в условиях торможения роста привело к повышению активности ферментов ее метаболизации, особенно у обычной березы (рис. 44). По сравнению с маем, в июле во флоэме обычной березы активность АпИINV, ВакИINV, ЦитИINV возросла в 3, 50, 30 раз соответственно и значительно превышала таковую у карельской березы. Во флоэме карельской березы на фоне увеличения содержания сахарозы повышалась активность только ВакИINV и ЦитИINV (в 7 и 2 раза соответственно), тогда как активность АпИINV снижалась примерно в 2 раза. Снижение активности АпИINV во флоэме (рис. 10) при повышении активности СС в ксилеме (рис. 11) в период камбиального роста наблюдали у взрослых растений карельской березы. В условиях формирования нормальных приростов древесины (как было показано ранее) активность инвертаз у карельской березы была всегда выше, чем у обычной березы. При торможении роста более активная инвертаза во флоэме обычной березы не приводила к снижению содержания сахарозы (рис. 43). Вероятно, в этом случае, так же как в начале вегетационного периода, не инвертаза определяла содержание сахарозы. Наоборот, накопление сахарозы во флоэме, связанное со снижением ее потребления в ксилеме при торможении роста, индуцировало повышение инвертазной активности. Так, в ряде работ было показано, что увеличение содержания глюкозы и сахарозы в среде инкубации суспензионной культуры клеток *Chenopodium rubrum* приводит к увеличению активности инвертазы клеточной стенки и уровня экспрессии кодирующих ее генов (Roitsch et al., 1995; Ehness et al., 1997). В эмбриональных тканях *Picea mariana* Mill. увеличение концентрации сахарозы коррелировало с увеличением активности и количества АпИINV (Iraqi et al., 2005).

К середине октября активность инвертазы во флоэме обычной березы снижалась, что сопровождалось увеличением концентрации сахарозы. В этот период, когда ростовые процессы уже завершены, существенных отличий между двумя формами березы повислой в активности инвертазы не выявлено.

Таким образом, снижение акцепторной функции ксилемы в период торможения роста (в нашем эксперименте это было вызвано пересадкой растений) привело к увеличению содержания сахарозы во флоэме и к усилению ее метаболизации инвертазами. Большее торможение роста в ксилеме у обычной березы отразилось и в большем увеличении метаболизации сахарозы во флоэме по апопластному пути.

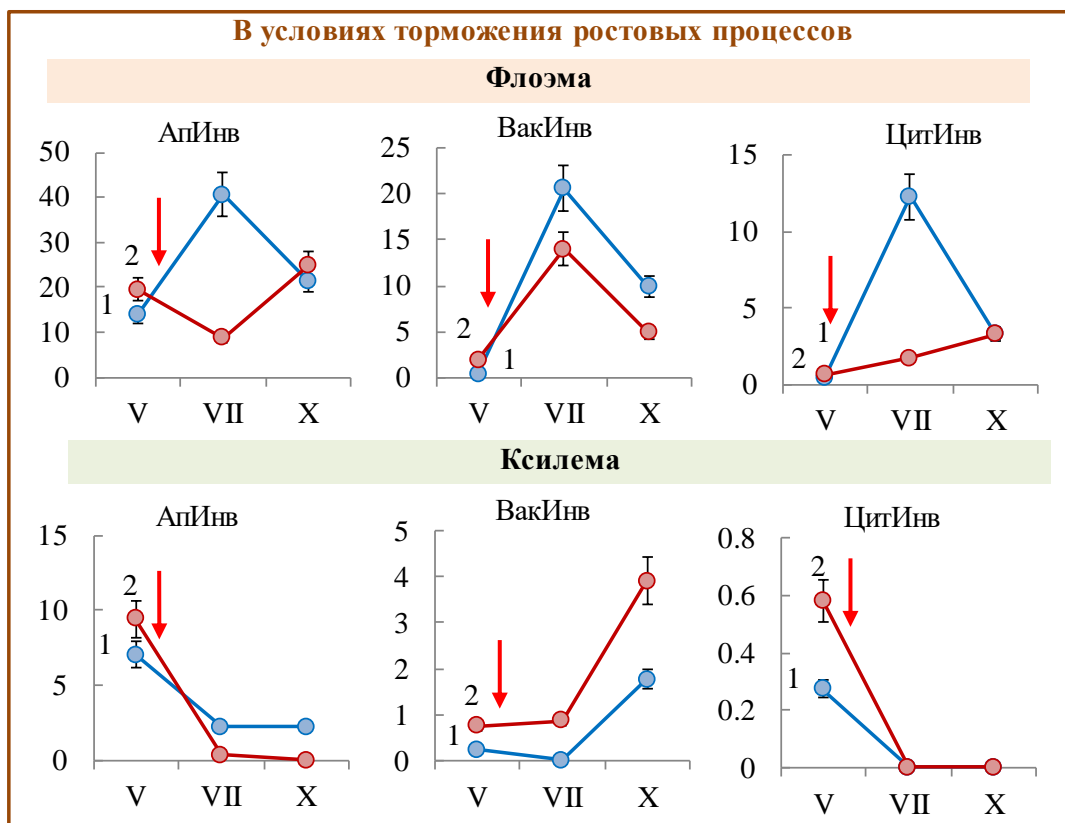


Рисунок 44. Активность апопластной инвертазы (АпИИИВ), вакуолярной инвертазы (ВакИИИВ) и цитоплазматической инвертазы (ЦитИИИВ) (мкмоль распавшейся сахарозы на г сырой ткани) во флоэме и ксилеме 4-летних деревьев обычной (1) и карельской (2) березы в условиях торможения ростовых процессов (стрелками показано время пересадок растений). Представлены средние значения и их стандартные ошибки.

4.5.2. Введение экзогенной сахарозы в ткани ствола обычной березы повислой в период камбиального роста приводит к возрастанию активности апопластной инвертазы

Для изучения влияния разных концентраций сахаров на развитие проводящих тканей был разработан метод введения экзогенных растворов сахаров в ткани ствола древесных растений (Новицкая, Кушнир, 2005; Novitskaya, Kushnir, 2006). Эксперимент с ведением растворов сахарозы проводили на Агробиологической станции на 25-летних растениях обычной березы. Начало эксперимента – 07.07.2009, окончание – 21.08.2009. В течение всего срока (45 дней) в ткани ствола опытных растений вводили растворы сахарозы разной концентрации (1%, 2.5% 5%, 10% и 20 %), а также раствор дистиллированной воды (0%). После окончания 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). Каждый вариант опыта был заложен в трех повторностях, после отбора образцов ткани объединяли в единую пробу.

Активность ферментов метаболизма сахарозы в контрольных образцах

Период отбора образцов приходился на конец августа, когда процесс активных делений в камбии уже закончился (Барильская, 1978). В это время отток ассимилятов из листьев направлен в ствольную часть дерева, где сахара расходуются на запасание в виде полимеров липидной, фенольной и углеводной природы (в основном в тканях флоэмы) и на продолжающиеся процессы дифференциации клеток (склерификация паренхимных клеток во флоэме, утолщение и лигнификация клеточных стенок волокон и сосудов в ксилеме). Следует отметить, что процессы вторичного утолщения и лигнификации клеточных стенок в конце августа протекают не так интенсивно, как в конце июня – начале июля (период интенсивного прироста древесины). Основная активность СС, фермента, играющего ключевую роль в формировании клеточных стенок в течение сезона, приходится на конец июня – начало июля, и существенно снижается уже к началу августа (рис. 45).

Изучение активности ферментов метаболизма сахарозы у контрольных деревьев показало (табл. 4), что во всех препарированных слоях тканей ствола наибольшая активность была у АпИнв. Особенно высокие ее значения наблюдали в камбиальной зоне (2-й слой) и в непроводящей флоэме (1-й слой). В этих слоях тканей довольно высокой была активность другой кислой инвертазы – ВакИнв, значения ее достигали ~ 3 мкмоль/г сырой ткани. Высокие значения активности кислых инвертаз в этих тканях могут свидетельствовать об интенсивном притоке по флоэме сахарозы из листьев и активной метаболизации ее как в апопласте, так и в вакуоли. Высвобождающиеся гексозы, вероятно, тратятся на синтез запасных метаболитов.

Активность цитоплазматических ферментов во флоэме была в 2-10 раз ниже, по сравнению с периодом интенсивного роста (рис. 11, раздел 3.1).

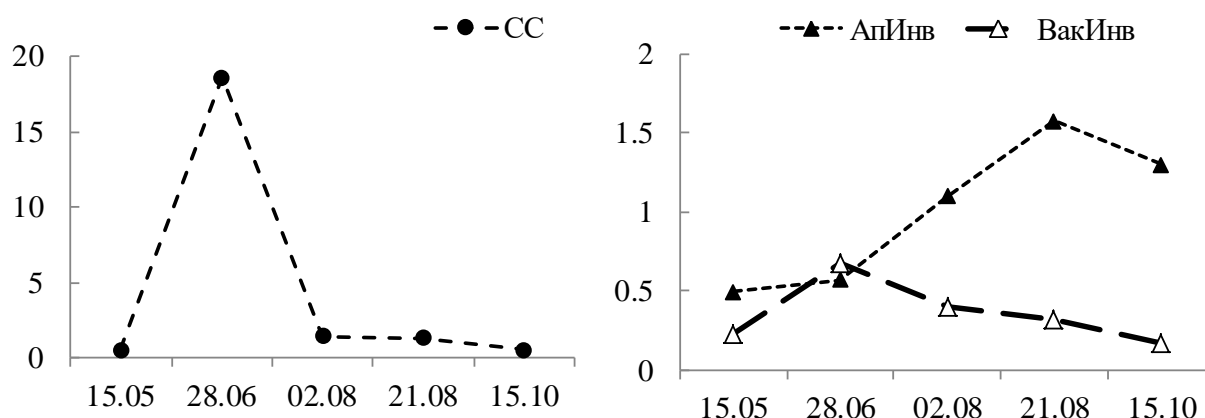


Рисунок 45. Динамика активности сахарозосинтазы (СС), апопластной инвертазы (АпИInv), вакуолярной инвертазы (ВакИInv) (мкмоль распавшейся сахарозы/г сырой ткани) в ксилеме 40-летних деревьев обычной березы. По оси абсцис – даты взятия образцов.

Таблица 4. Активность (мкмоль распавшейся сахарозы на г сырой ткани) ферментов метаболизма сахарозы в тканях ствола деревьев обычной березы повислой. Дата отбора 21.08.2009. АпИInv – апопластная инвертаза, ВакИInv – вакуолярная инвертаза, ЦитИInv – цитоплазматическая инвертаза, СС – сахарозосинтаза.

Слой тканей	АпИInv	ВакИInv	ЦитИInv	СС
1-й слой	17.6	2.9	0.60	0.01
2-й слой	21.4	2.5	0.03	0.02
3-й слой	1.6	0.3	0.25	0.09

В ксилеме текущего года (3-й слой) также более активны были кислые инвертазы (АпИInv и ВакИInv), хотя их активность была существенно ниже, чем во флоэме и камбиальной зоне (табл. 4).

При сравнении сезонной динамики активности кислых инвертаз (АпИInv, ВакИInv) и СС (рис. 45) видно, что в отличие от СС у АпИInv на конец августа приходилась наибольшая активность. Из этого можно заключить, что в норме в данный период в

тканях ствола березы повислой основная метаболизация притекающей по флоэме сахарозы идет по инвертазному пути. Незначительная активность СС в ксилеме, вероятно, отражает невысокую интенсивность процесса вторичного утолщения клеточных стенок.

Влияние экзогенных растворов сахарозы на активность ферментов метаболизации сахарозы

В качестве контрольных объектов использовали деревья, не участвующие в эксперименте. Из стволовой части препарировали 3 слоя тканей, как было указано выше. Камбиальная зона с проводящей флоэмой и ксилема текущего года у контрольных деревьев соответствовали 2-му и 3-му слоям из зоны экспериментального воздействия. Для тканей непроводящей флоэмы контрольных деревьев соответствие первому слою в эксперименте было не совсем полным, поскольку у опытных деревьев в 1-й слой, наряду с непроводящей флоэмой, входили также клетки раневой паренхимы, образовавшиеся на поверхности непроводящей флоэмы, которая была обнажена после удаления наружных слоев коры в процессе заложения "камер" для введения растворов. В качестве контрольных вариантов также предполагалось использовать камеры, заполненные дистиллированной водой, но проведенное исследование показало, что этот вариант существенно отличался от всех остальных и по причинам, которые будут обсуждаться ниже, не подходил на роль контроля.

Изучение содержания сахарозы во флоэмном экссудате у разных видов деревьев рода *Betula* показало, что ее концентрация в зависимости от вида колеблется в пределах 0.06 – 0.6М (60 – 646 мкмоль/г) (Zimmermann, Ziegler, 1975). В работе В.М. Колесниченко (1985) показано, что концентрация сахарозы во флоэмном экссудате обычной березы повислой в августе составляет 0.35М (365 мкмоль/г). Сравнивая данные литературы с концентрацией использованных нами опытных растворов (табл. 5) можно заключить, что по содержанию сахарозы все экспериментальные растворы были или близки к флоэмному экссудату или имели меньшую концентрацию.

Изучение содержания сахарозы в тканях ствола контрольных растений показало, что ее количество в норме было намного меньше (рис. 46), чем в экзогенных растворах, что должно было способствовать распределению сахарозы по градиенту в стволе.

Таблица 5. Концентрация экзогенных растворов сахарозы

Концентрация сахарозы	
(%)	(мкмоль/г)
1	29
2,5	73
5	146
10	292
20	584

Дополнительное внесение сахарозы в виде экзогенных растворов привело к увеличению в тканях ствола суммарной активности ферментов метаболизации сахарозы во всех вариантах опыта (рис. 47). Возрастание содержания сахарозы в экзогенном растворе не коррелировало с увеличением активности ферментов метаболизации сахарозы. При внесении 1% раствора суммарная активность ферментов составила 121 мкмоль сахарозы/г ткани, что в 2.6 раз превышает контрольные значения (к) (рис. 47). При введении 2.5 % раствора суммарная активность ферментов повысилась до 144 мкмоль сахарозы/г ткани и оставалась на этом уровне при действии 5% раствора сахарозы. Увеличение суммарной активности ферментов метаболизации сахарозы до 193 мкмоль сахарозы/г ткани произошло при действии 10% экзогенного раствора (рис. 47).

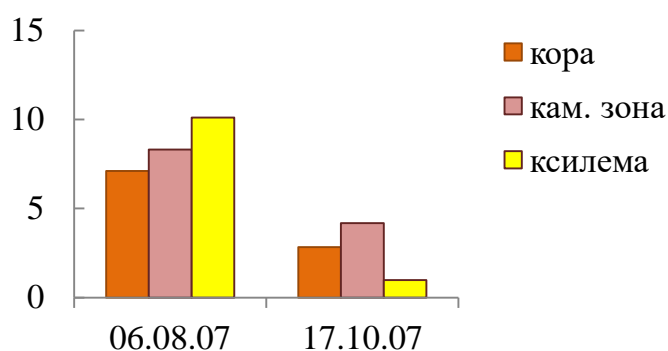


Рисунок 46. Содержание сахарозы в тканях коры (1-й слой), камбиальной зоны (2-й слой) и ксилемы (3-й слой) у контрольных деревьев березы повислой. По оси абсцисс – дата взятия образцов (месяц), по оси ординат – содержание сахарозы (мкмоль /г сырой ткани).

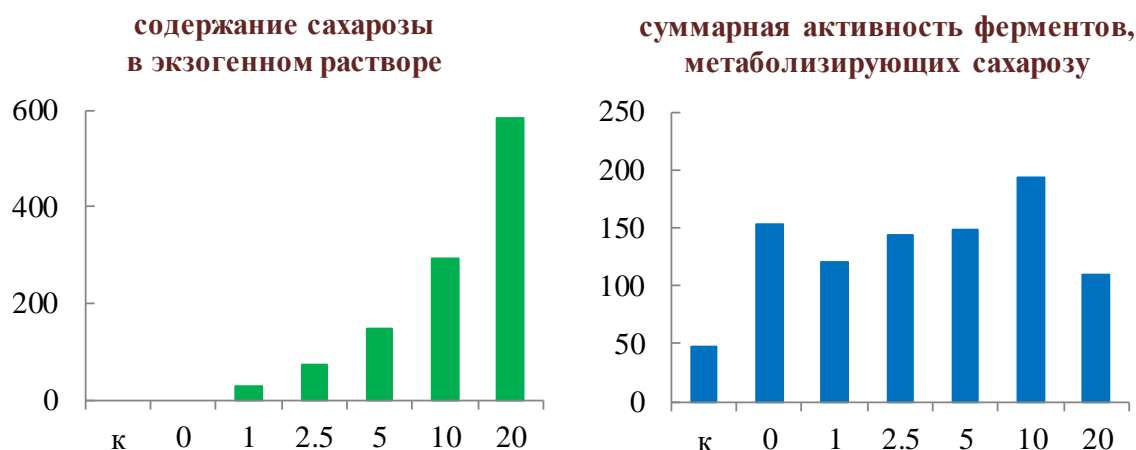


Рисунок 47. Содержание сахарозы (мкмоль/г) в экзогенных растворах и суммарная активность ферментов (мкмоль расправшейся сахарозы/г сырой ткани) метаболизации сахарозы в тканях ствола обычной березы повислой в эксперименте. По оси ординат – концентрация экзогенных растворов, к - контроль.

Следует отметить, что суммарная активность ферментов при 10% обработке была наиболее высокой и, вероятно, эти значения соответствовали пределу ферментативной активности, который может быть в тканях ствола (рис. 47).

Влияние растворов экзогенной сахарозы привело к возрастанию активности метаболизирующих ее ферментов, но интенсивность увеличения этого показателя в исследуемых тканях была различной (рис. 48). Так, в 1-м слое уже при концентрации сахарозы 1% суммарная активность ферментов возросла, по сравнению с контролем, в 3 раза и оставалась на таком уровне во всех вариантах опыта. Во 2-м слое суммарная активность ферментов линейно увеличивалась с возрастанием концентрации экзогенного раствора и достигла максимальных значений при 10%-й сахарозе. В 3-м слое выше всего была активность ферментов при концентрации сахарозы 2.5%, в вариантах 5% и 10% эти значения были несколько ниже. Таким образом, в каждом исследованном слое тканей максимумы активности ферментов, метаболизирующих сахарозу, различались.

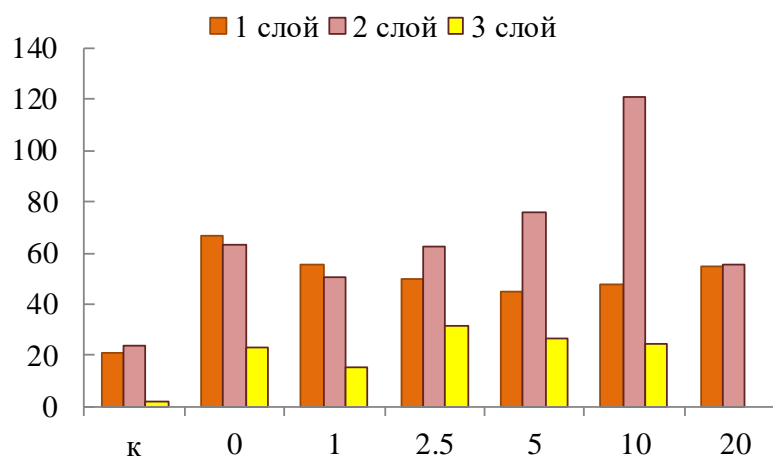


Рисунок 48. Суммарная активность ферментов, метаболизирующих сахарозу (мкмоль/г сырой ткани), в 1-м, 2-м и 3-м слоях тканей из зоны экспериментального воздействия на стволах обычной березы повислой. По оси ординат – концентрация экзогенного раствора сахарозы, к – контроль.

Рассмотрим подробнее изменение активности каждого фермента.

Введение растворов сахарозы привело к возрастанию активности АпИInv (рис. 49), причем изменения ее активности в зависимости от концентрации экзогенного раствора были схожи с изменениями суммарной активности ферментов (рис. 48), то есть большая часть сахарозы в ткани метаболизировалась при участии инвертазы клеточной стенки. Так, 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. Следует отметить, что в норме АпИInv не проявляет такую высокую активность в тканях ствола березы повислой в течение всего сезона вегетации (глава 3). 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 возрасти активность АпИInv. Так, в проводящей флоэме и камбиальной зоне (2-й слой) максимальная

активность АпИнв соизмерима с концентрацией сахарозы во флоэмном экссудате в августе (Колесниченко, 1985). Интересные результаты были получены на культурах клеток *Chenopodium rubrum* L. (Roitsch et al., 1995). Авторы наблюдали увеличение уровня экспрессии генов, кодирующих инвертазу клеточных стенок, (1) после 48 часов экспозиции в среде, содержащей 100 мМ глюкозу, фруктозу и сахарозу (но такого эффекта не было на 100 мМ маннитоле), (2) после 12 часов экспозиции в средах с разной концентрацией глюкозы – от 20 до 100 мМ (эффекта не было при 5-10 мМ глюкозе), (3) после 24 часов экспозиции в среде, содержащей 30 мМ глюкозу и 30 мМ 6-дезокиглюкозу (эффекта не было при 30 мМ маннитоле). При этом активность как нейтральных, так и кислых внутриклеточных инвертаз, не изменялась (Roitsch et al., 1995).

Активность другой кислой формы инвертазы – ВакИнв, линейно не увеличивалась при увеличении концентрации экзогенной сахарозы (рис. 49). В 1-м слое активность фермента увеличивалась только при концентрации 1%, а в вариантах 2.5-10% колебалась в пределах значений контроля. Во 2-м слое активность ВакИнв при всех вариантах опыта была значительно ниже, чем в контроле, с минимальным значением при 5%. В 3-м слое концентрации сахарозы 1% и 2.5 % приводили к повышению активности ВакИнв с максимумом при 2.5 % (как и у АпИнв), при 5%-ной сахарозе активность фермента снижалась и падала практически до нуля при 10%.

Активность цитоплазматических ферментов (ЦитИнв и СС) во всех слоях тканей была значительно ниже, чем активность кислых инвертаз. В 1-м слое активность ЦитИнв повышалась, по сравнению с контролем, только при концентрации сахарозы 20%, а активность СС появлялась только при 5%-й сахарозе. Во 2-м слое активность ЦитИнв почти во всех вариантах опыта была выше, чем в контроле, в то время как активность СС ниже. В 3-м слое, наоборот, увеличение концентрации сахарозы привело к снижению активности ЦитИнв и возрастанию активности СС. Так, в ксилеме активность СС возрастала постепенно с увеличением концентрации сахарозы и достигла максимального значения при концентрации 5%. Следует отметить, что хотя активность СС и увеличивались при введении экзогенных растворов, значение ее не было таким высоким, как у интактных деревьев в период камбиального роста (рис. 45). Вероятно,

активность СС имеет временную динамику и приурочена к периоду активного роста тканей ксилемы и формирования клеточных стенок.

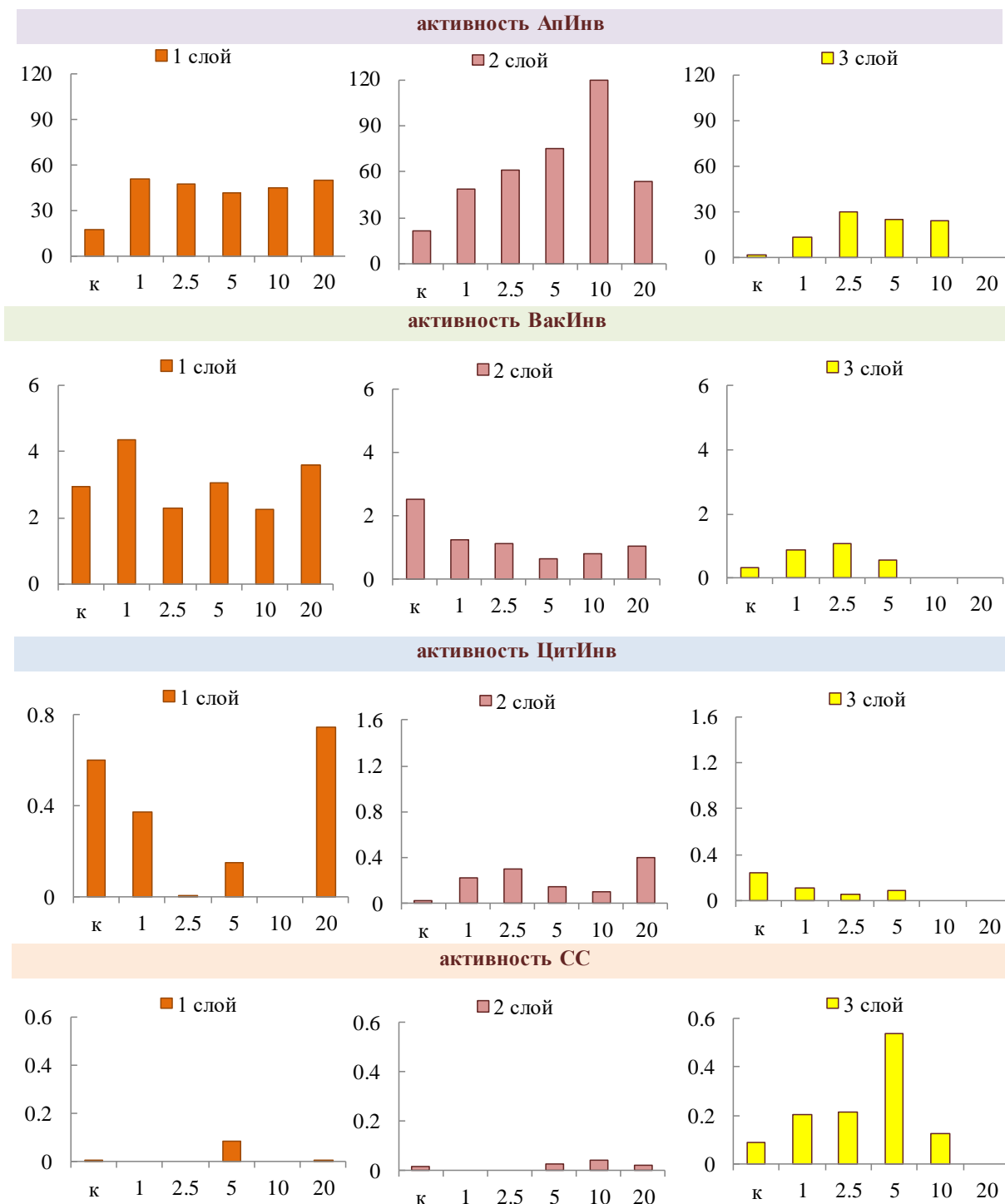


Рисунок 49. Активность апопластной (АпИнв), вакуолярной (ВакИнв), цитоплазматической (ЦитИнв) инвертазы и сахарозсинтазы (СС) в 1–3-м слоях тканей из зоны экспериментального воздействия на стволах обычной березы повислой. По оси абсцисс – концентрация раствора экзогенной сахарозы (%), к – контроль, по оси ординат – активность ферментов (мкмоль сахарозы / г сырой ткани).

Влияние экзогенной дистиллированной воды на активность ферментов метаболизации сахарозы

Активность ферментов метаболизации сахарозы при введении в ткани ствола березы дистиллированной воды (вариант 0%) была значительно выше, чем в контроле. Как было показано ранее, суммарная активность ферментов при 0% была такая же, как и при 5%-ной сахарозе (рис. 47), при этом активность СС в ксилеме при 0% увеличивалась до тех же значений (рис. 50), что и при 5%-м растворе экзогенной сахарозы (рис. 49). Можно предположить, что в варианте 0% из окружающих тканей ствола "натягивается" столько же сахарозы, сколько поступает при введении 5%-го экзогенного раствора, но механизм ее усвоения различен. Так, при 0%, когда высокие концентрации сахарозы "натягиваются" в клетки из других тканей естественным путем (по проводящей флоэме, т.е. по симпласту) происходит увеличение прироста ксилемы (табл. 6). При введении 5%-го раствора, когда высокие концентрации сахарозы в тканях ствола создаются искусственным путем (из экзогенных растворов сахароза поступает в клетки через апопласт), наблюдаются следующие анатомо-морфологические особенности: (1) уменьшение прироста ксилемы (табл. 6), (2) увеличение степени ее паренхиматизации (Новицкая, 2008), (3) увеличение прироста флоэмы (табл. 6), (4) образование склерид в проводящей флоэме (Новицкая, 2008). Возможность поступления сахарозы из среды культивирования в эмбриональные ткани сосны черной через апопласт обсуждалась в работе D. Işığı с соавторами (2005). Было показано, что увеличение сахарозы в среде до 6% приводило к возрастанию количества/активности АПИнв (Işığı et al., 2005).

Таблица 6. Влияние различных концентраций сахарозы на прирост ксилемы и флоэмы *B. pendula* var. *pendula* (по Новицкая, 2008 с. 58).

Концентрация сахарозы	Приросты ксилемы и флоэмы после начала эксперимента, мкм	
	ксилема	флоэма
контроль	328±8.8	101±5.7
0%	473±9.2	99±2.9
1%	296±23.0	105±2.8
2.5%	267±25.3	147±6.3
5%	68±9.7	169±5.2
10%	95±11.0	170±10.0

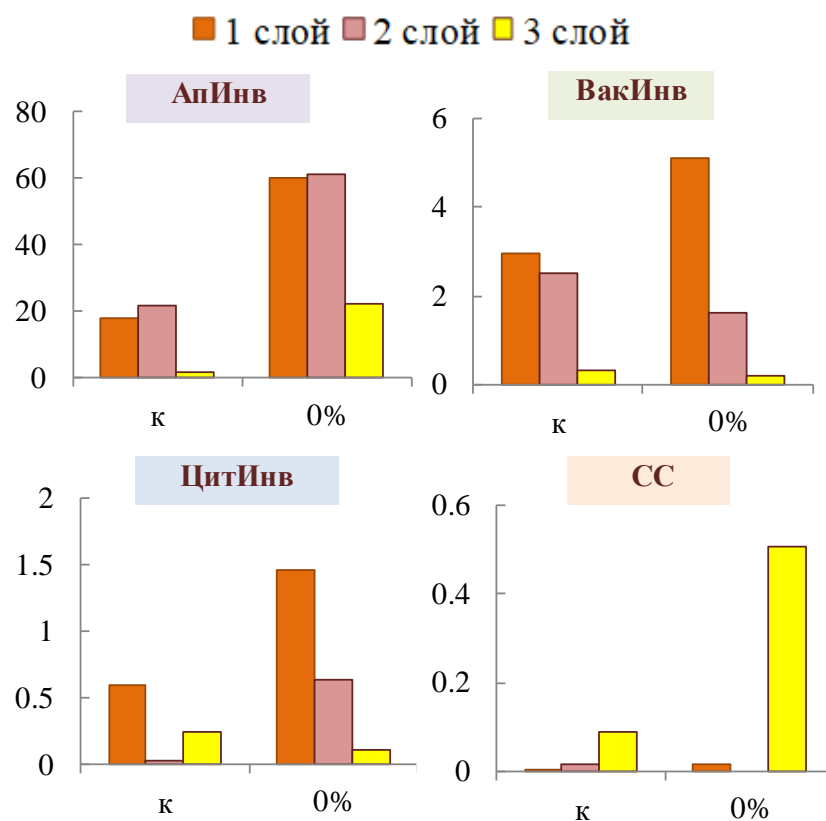


Рисунок 50. Активность апопластной (АпИINV), вакуолярной (ВакИINV), цитоплазматической (ЦитИINV) инвертазы и сахарозосинтазы (СС) в 1-м, 2-м и 3-м слоях тканей из зоны экспериментального воздействия на стволах обычной березы повислой. По оси абсцисс – варианты эксперимента: к – контроль, 0% - дистиллированная вода, по оси ординат – активность ферментов (нмоль распавшейся сахарозы/г сырой ткани).

Рассмотрим соотношение активности разных форм инвертазы (АпИINV:ВакИINV:ЦитИINV) в тканях ствола в вариантах опыта 0% и 5%. В варианте 0% оно составляет **41:4:1**, **96:3:1** и **200:2:1** для 1-3-го слоев соответственно. В варианте 5% – **278:20:1**, **504:4:1** и **291:6:1** для 1-3-го слоев соответственно. Как видно из представленных данных, основное отличие варианта 5% от 0% заключалось в более высокой активности АпИINV в 1-м и 2-м слоях, что могло быть связано с поступлением сахарозы из экзогенных растворов через апопласт и большей метаболизацией ее в клеточной стенке. В результате гидролиза 1 молекулы сахарозы с участием АпИINV образуется 2 молекулы гексоз, которые с участием переносчиков гексоз поступают в клетку, где фосфорилируются гексокиназами. И переносчики гексоз, и гексокиназы могут вызывать индукцию широкого ряда генов, вовлекающихся в фотосинтез, дыхание,

углеводный метаболизм и т.д. (Koch, 1996; Rolland et al., 2002; Roitch et al., 1995; Smeekens, Rook, 1997 и т.д.)

Участие ферментов метаболизации сахарозы в усвоении экзогенной сахарозы в системе апопласт/клетка

Сравнение активности ферментов метаболизации сахарозы со строением тканей, позволяет лучше понять, какую функцию они выполняют в разных условиях в тканях ствола березы и на кого из них приходится наибольшая нагрузка при избытке метаболитов.

В вариантах 0% и 1% сахарозы основная масса склереид дифференцировалась вблизи края среза. При 2.5% и 5% сахарозы склерификация происходила в прикамбиальной зоне флоэмы, причем в варианте 2.5% склереиды образовали почти сплошной слой в непосредственной близости от камбия. При 10%-й сахарозе образование склереид не происходило (Новицкая, 2008, с. 58). Поскольку активность СС в 1-м и 2-м слоях тканей определялась только в варианте 5%, можно заключить, что образование склереид не связано с работой СС.

При введении 1%-го раствора сахарозы наблюдалась высокая активность клеточных делений в камбиальной зоне (рис. 3.11А из Новицкая, 2008 с. 56), при введении 2.5%-го раствора деления тормозились, при 5%, 10% и 20% сахарозе деления клеток в камбиальной зоне прекращались (Новицкая, 2008).

При введении 5% раствора начинает формироваться паренхима в ксилеме (Новицкая, 2008).

В варианте с 10%-м раствором экзогенной сахарозы прекращались деления клеток в камбиальной зоне, происходило торможение прироста ксилемы, усиление паренхиматизации флоэмы за счет расширения флоэмных лучей (увеличение размеров и числа составляющих их клеток), а также увеличение количества клеток паренхимы в ксилеме (Новицкая, 2008). Снижение активности вакуолярной инвертазы в ксилеме коррелировало с началом паренхиматизации тканей ксилемы.

Исходя из предположения, что большое значение имеет соотношение активности ферментов и распределение сахарозы между тканями, которое будет определять донорно-акцепторные отношения между ними, рассмотрим, как добавление экзогенной

сахарозы изменяет соотношение между активностью внеклеточных (АпИInv) и внутриклеточных (ВаКИн, ЦитИInv, СС) ферментов (рис. 51).

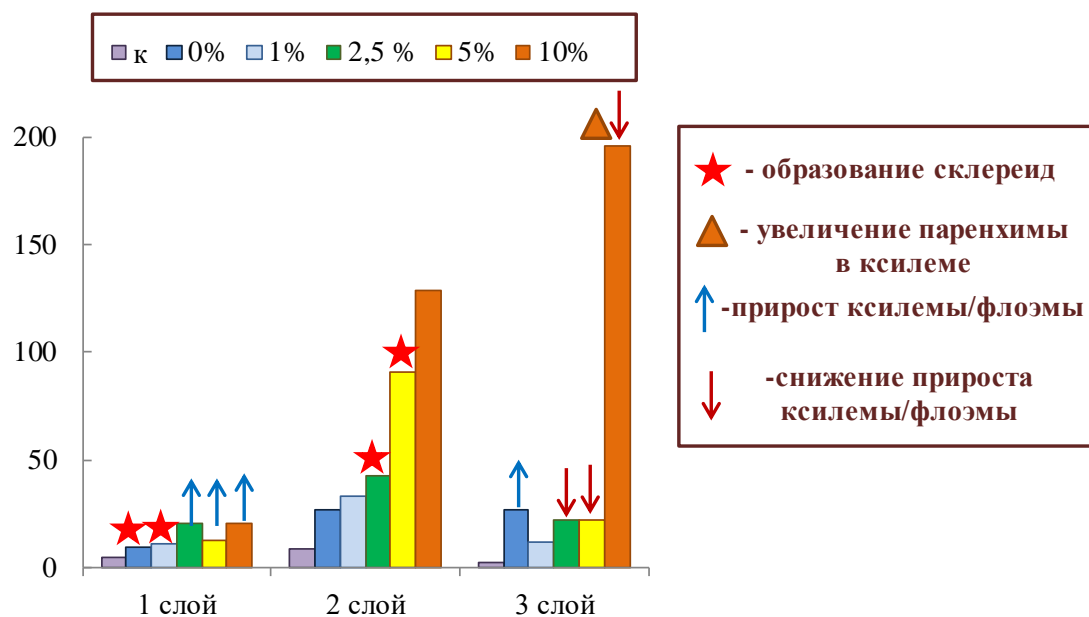


Рисунок 51. Соотношение активности внеклеточной инвертазы (АпИInv) к активности внутриклеточных ферментов метаболизма сахарозы (ВаКИн, ЦитИInv, СС) в 1-м, 2-м и 3-м слоях тканей из зоны экспериментального воздействия на стволах обычной березы повислой. Условными обозначениями показаны анатомические изменения, происходящие в исследуемых тканях (по Новицкая, 2008, с. 58, пояснение в тексте).

к – контроль, 0-10% – концентрация экзогенных растворов сахарозы.

По сравнению с контролем, введение экзогенной сахарозой привело к возрастанию отношения "активность АпИInv/активность внутриклеточных ферментов".

Вероятно, избыток сахарозы в апопласте (в результате поступления экзогенной сахарозы в ткани через апопласт) метаболизируется АпИInv с образованием гексоз, которые поступают в клетку с помощью переносчиков гексоз. Углеводный сигналинг, как через гексозные транспортеры, так и через гексокиназы и свободные гексозы, может увеличивать уровень экспрессии генов, кодирующих АпИInv, повышая ее активность (ссылки). Важно, что это повышение, вероятно, имеет свои пределы. В реакции, катализируемой УДФ-пирофосфорилазой, из глюкозо-6-фосфата в присутствии УДФ образуется УДФ-глюкоза. УДФ-глюкоза может расходоваться на синтез оболочек

склереид (в 1-м слое это наблюдается в вариантах 0% и 1% сахарозы). Отношение "активность АпИндв/активность внутриклеточных ферментов" в 1-м слое не превышает определенных значений, что, вероятно, связано с интенсивным оттоком из этого слоя избытка сахарозы.

Из УДФ-глюкозы и фруктозы (или фруктозо-6-фосфата) в реакции, катализируемой СС (или сахарозофосфатсинтетазой и фосфатазой) образуется сахароза, которая по симпласту может оттекать в камбиальную зону, что, вероятно, и происходит при более высоких концентрациях сахарозы в экзогенных растворах. Так, в вариантах с 2.5% и 5% растворами сахарозы процесс склерификации начинается в камбиальной зоне. Дальнейшее повышение концентрации сахарозы в апопласте приводит к ее интенсивному оттоку в ксилему. Накопление сахаров в ксилеме выше определенного уровня может снижать приросты ксилемы (наблюдается при 2.5% – 10%), увеличивая степень паренхиматизации ткани (10%).

4.5.3. Метаболические изменения в камбиальной зоне обычной березы повислой при нарушении нисходящего транспорта сахарозы и создании зон ее избыточного содержания

Нисходящий транспорт сахарозы нарушали путем кольцевания ствола деревьев обычной березы повислой. Указанный методический прием широко используется для изучения камбиального роста в условиях различной обеспеченности тканей ассимилятами. Для исследования использовали 22-летние деревья обычной березы, произрастающие на участке площадью 0.26 га, расположенном на Биологической станции КарНЦ РАН. Были выбраны деревья, близкие по высоте ($10 \pm 0,5$ м) и диаметру ствола на высоте 1.3 м от земли (10 ± 0.2 см). Все деревья имели хорошо развитую крону и гладкий ровный ствол без видимых повреждений. На стволах опытных деревьев в период активных делений в камбиальной зоне (19.06.2017) было выполнено двойное кольцевание по методике Daudet et al. (2005): острым ножом удаляли два кольца коры вплоть до зоны формирующейся ксилемы. Нижние границы колец располагались на высоте 110 см и 125 см от земли, ширина колец составляла 5 см (рис. 52). Для предотвращения образования каллуса и восстановления транспорта ассимилятов поверхность древесины в зоне колец дополнительно зачищали ножом. Отбор тканей

ствола проводили с 7 зон, 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 удаляли проводящую флоэму, мы предположили, что в этой части ствола будет накапливаться сахароза с максимумом в зоне непосредственно над верхним кольцом (1 зона) и с последующим снижением ее содержания на расстоянии 5, 10, 15 и 35 см выше границы верхнего кольца (2-5 зоны соответственно) (рис. 52). Участок ствола, расположенный между 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) (рис. 52). Часть деревьев были оставлены без каких-либо воздействий и служили в качестве контрольных. На них образцы отбирали с мест, соответствующих по высоте 1-7 зонам у окольцованных деревьев. В указанных участках ствола препарировали слои тканей, соответствующие зонам роста и дифференциации флоэмы и ксилемы (в дальнейшем обозначены как флоэма и ксилема). Образцы отбирали с 5 окольцованных и 3 контрольных деревьев на 10-й день после начала эксперимента (29 июня 2017).

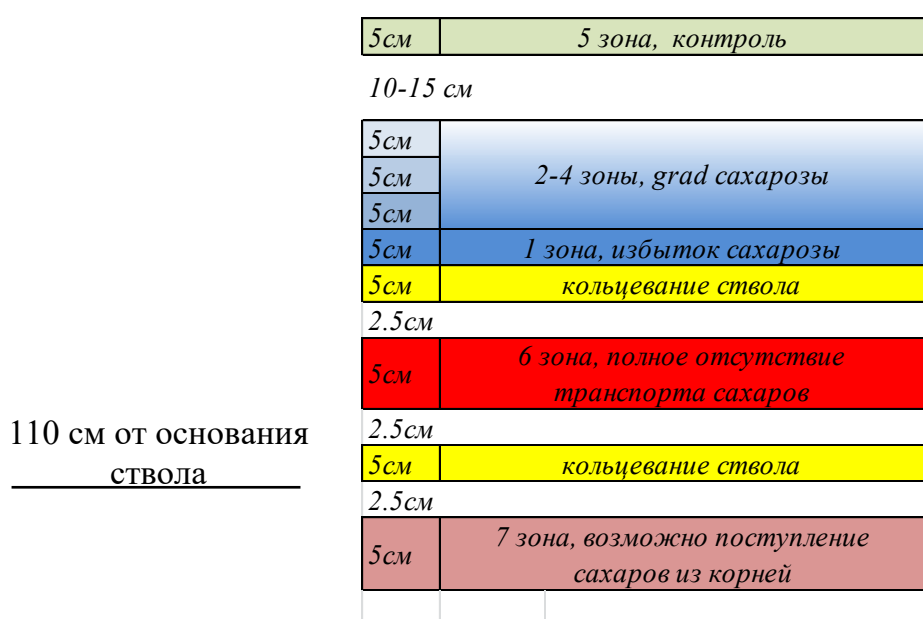


Рисунок 52. Схематическое изображение двойного кольцевания ствола и названия исследуемых зон.

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 *CWIN1* увеличилось, по сравнению с контролем, в 2.7, 2.0, 1.9 и 1.8 раз в 1, 2, 3 и 4 зонах соответственно (рис. 53). Полученные данные подтверждают наше предположение, что из-за нарушения нисходящего транспорта в этих местах мог образоваться избыток сахарозы, для расщепления которой и потребовалось увеличение активности АпИInv. 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, не отличалось от такового у контрольных растений (рис. 53). Полученный результат подтверждает предположение о возможности поступления в этот участок сахаров, запасенных в нижележащей части ствола и в корнях. В ксилеме мы не наблюдали градиента в распределении транскриптов мРНК гена *CWIN1* в зависимости от зоны, их количество было выше в 1.4-1.7 раз по сравнению с контролем (рис. 53), Регуляция активности АпИInv по всей видимости происходила не только на уровне экспрессии кодирующих ее генов, но и на посттрансляционном уровне. Содержание транскриптов мРНК гена, кодирующего белковый ингибитор АпИInv, возросло у опытных растений, по сравнению с контрольными, в 1.6 и 2.6 раз во флоэме и ксилеме соответственно (рис. 53), что свидетельствует об увеличении содержания сахарозы в апопласте. Изменение уровня экспрессии генов *CWIN1.1* и *CWIN4* было подобно тому, что наблюдали для гена *CWIN1*, как во флоэме, так и в ксилеме.

Уровень экспрессии гена, кодирующего СС (*Sus1*), во флоэме опытных растений, по сравнению с контрольными растениями, увеличился в 10.7, 4.1, 2.4 и 2.3 раза в 1, 2, 3 и 4 зонах соответственно. В ксилеме количество транскриптов мРНК гена *Sus1* у опытных растений было близко к таковым значениям у контрольных растений (рис. 53). Изменение уровня экспрессии гена *Sus2*, кодирующего изоформу *Sus2*, у опытных растений было подобно изменениям, наблюдаемым для гена *Sus1*.

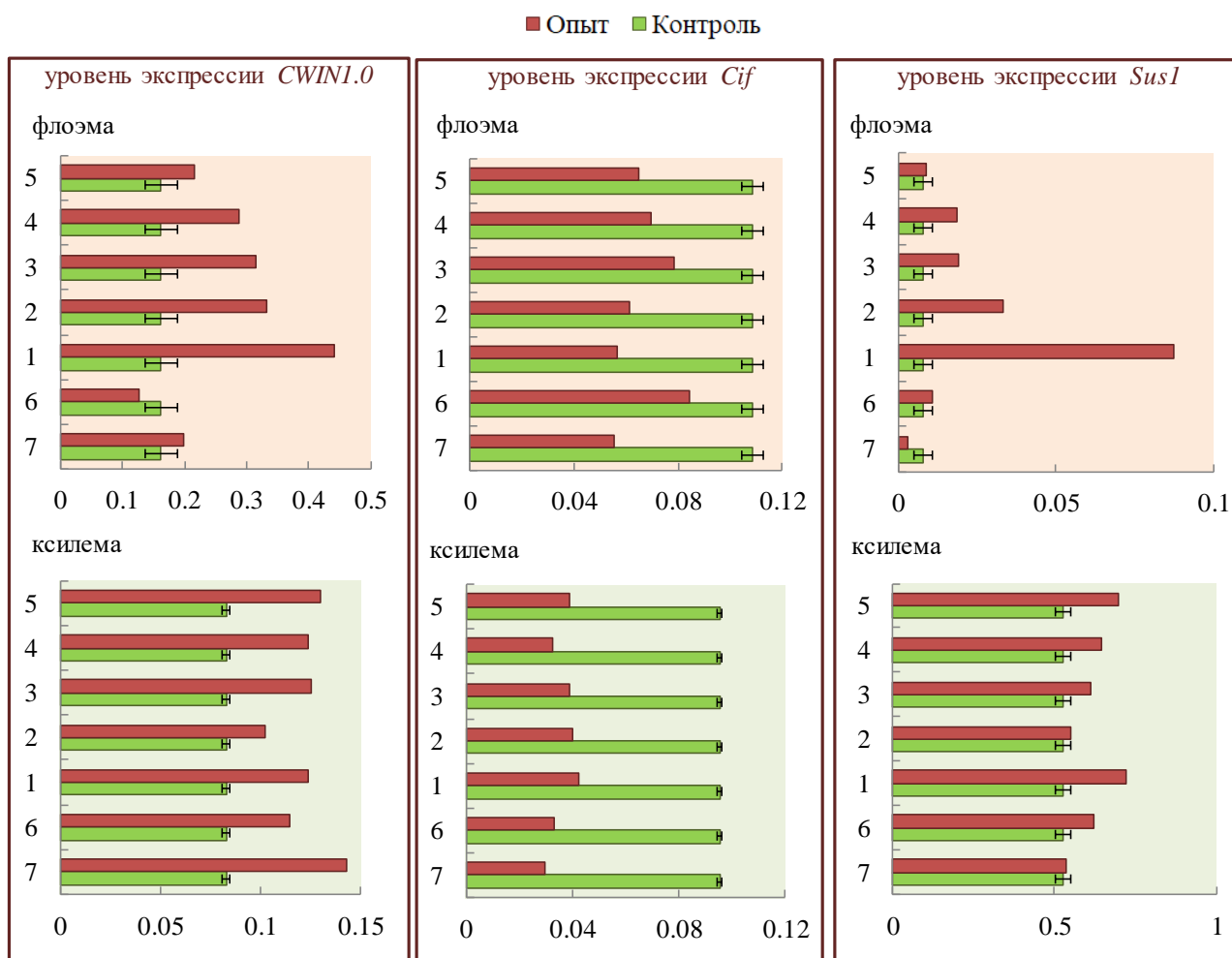


Рисунок 53. Уровень экспрессии (отн. ед.) генов, кодирующих АпИнв (*CWI1.0*), белковый ингибитор АпИнв (*Cif*) и СС (*SusI*) в исследуемых зонах деревьев, подвергшихся кольцеванию (опыт) и контрольных деревьев.

В ходе ксилогенеза изоформы СС регулируют количество УДФ-глюкозы, идущей на синтез микрофибрилл целлюлозы, а также участвуют в биосинтезе крахмала (Echt, Chourey, 1985; Pozueta-Romero et al., 1999; Tauberger et al., 2000; Tiessen et al., 2002; Baroja-Fernández et al., 2003; Kladnik et al., 2005; Baroja-Fernandez et al., 2012). В тканях ствола в период камбиального роста у древесных растений основная функция СС – участие в синтезе компонентов клеточных стенок ксилемы, при этом запасание крахмала происходит слабо. Уровень экспрессии гена *Ces8*, кодирующего изоформу целлюлозосинтазы, которая принимает участие в биосинтезе вторичной клеточной стенки, снижался ~ в 2 раза у опытных растений, по сравнению с контрольными (рис. 54). При этом относительный уровень экспрессии гена *Ces8* у окольцованных и

контрольных растений (рис. 54) был соизмерим с таковым соответственно у узорчатых и безузорчатых 25-летних растений карельской березы (рис. 31). Неожиданный результат был получен по экспрессии еще двух генов, кодирующих целлюлозосинтазу, – *Ces3* и *Ces7*. Так, у окольцованных растений, по сравнению с контрольными растениями, количество транскриптов мРНК гена *Ces3* увеличилось в 3.5 раза, а гена *Ces7* – в 5.6 раз (рис. 54). При этом, как и в случае с геном *Ces8*, количество транскриптов мРНК генов *Ces3* и *Ces7* у контрольных растений (рис. 54) было соизмеримо с таковым у безузорчатых 25-летних растений карельской березы (рис. 31). У узорчатых растений карельской березы, по сравнению с безузорчатыми растениями, количество транскриптов мРНК генов *Ces3* и *Ces7* было в 4 и 2 раза меньше (рис. 31). Ген *Ces3* кодирует изоформу целлюлозосинтазы, участвующую в биосинтезе первичных клеточных стенок, а также может быть связан с синтезом гомогалактуронанов, входящих в состав пектиновых веществ. Мутанты *CESA3 Arabidopsis* имеют дефект целлюлозы в первичной клеточной стенке, в ксилеме этих растений тормозится клеточное растяжение и повышается лигнификация. Ген *Ces7* кодирует специфическую целлюлозосинтазу ксилемы и в основном участвует в биосинтезе вторичной клеточной стенки (Liu et al., 2012; Salojärvi et al., 2017).

Таким образом, в эксперименте с кольцеванием ствола березы повислой нарушение транспорта фотоассимилятов приводит к увеличению содержания сахарозы в апопласте флоэмы (падает уровень экспрессии генов *Cif*) в зонах над кольцом (1-5 зона) и под кольцом (7 зона), что сопровождается возрастанием ее метаболизации по апопластному пути (возрастает уровень экспрессии генов *CWIN*) и в меньшей степени по сахарозосинтазному пути (возрастает уровень экспрессии генов *Sus*) (рис. 53). В ксилеме, в отличие от флоэмы, не обнаружено градиента в распределении уровня экспрессии генов *CWIN*, *Cif*, *Sus* (рис. 53), а также генов, кодирующих целлюлозосинтазу, по зонам (рис. 54). В ксилеме опытных растений увеличение содержания сахарозы в апопласте сопровождается возрастанием ее метаболизации по апопластному пути, снижением использования сахарозы на синтез компонентов вторичных клеточных стенок (снижается уровень экспрессии гена *Ces8*) и увеличением ее использования на синтез первичных клеточных стенок (возрастает уровень экспрессии гена *Ces3*). При этом повышается количество транскриптов мРНК гена *Ces7*,

кодирующего специфическую целлюлозосинтазу ксилемы (Liu et al., 2012; Salojärvi et al., 2017), который в обычных условиях почти не обнаруживается (рис. 31).

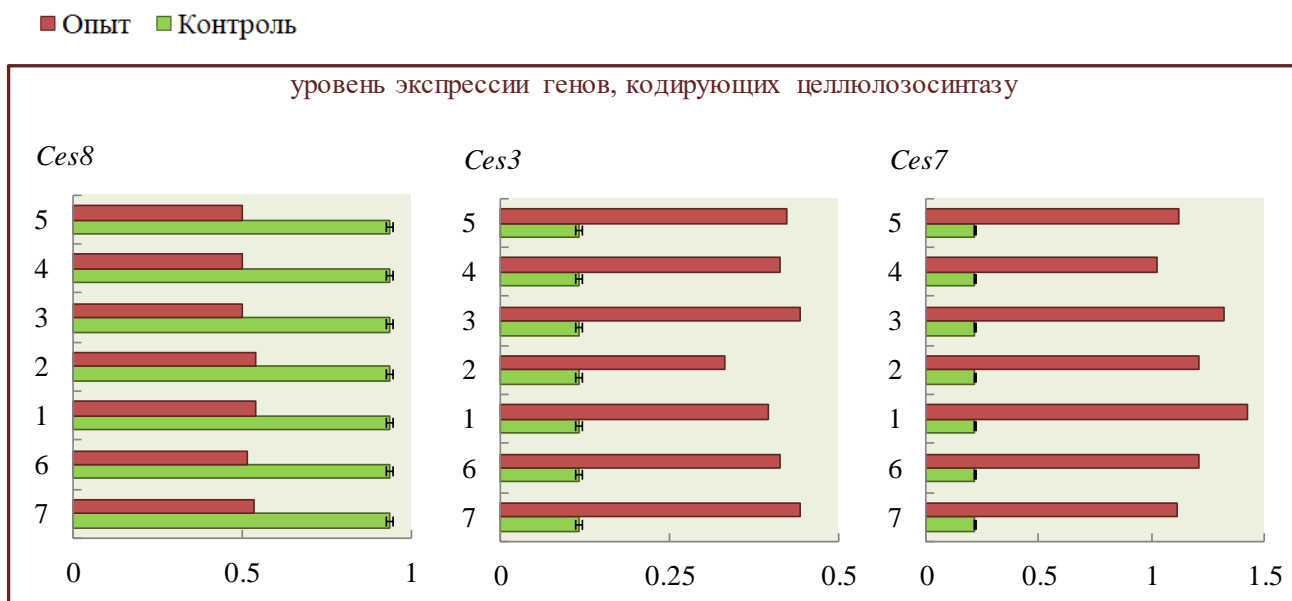


Рисунок 54. Уровень экспрессии (отн. ед.) генов, кодирующих изоформы целлюлозосинтазы (*Ces8*, *Ces3*, *Ces7*), в ксилеме исследуемых зон деревьев, подвергшихся кольцеванию (опыт), и контрольных деревьев.

Возникает вопрос, как в условиях различной обеспеченности тканей ассимилятами будет идти транспорт сахаров в камбиальной зоне. Нами получены интересные результаты по уровню экспрессии генов, кодирующих транспортеры гексоз. Количество транскриптов мРНК генов *Hex1* и *Hex2* возрастало у опытных растений во флоэме во всех исследуемых зонах в 1.3-2 раза (рис. 55). В ксилеме опытных растений увеличение количества транскриптов мРНК генов *Hex1* и *Hex2* в 1.5 раз происходило в 1 зоне, где предположительно наблюдается самая высокая концентрация сахарозы (рис. 55). Таким образом, избыток сахарозы, образовавшийся при кольцевании растений, приводящий к увеличению содержания сахарозы в апопласте и возрастанию уровня экспрессии генов, кодирующих АпИнв (рис. 53), не сопровождался существенным увеличением гексозных транспортеров. Это важное отличие от аномальных узорчатых тканей карельской березы, у которых на фоне высокой апопластной утилизации сахарозы наблюдается высокий уровень экспрессии генов, кодирующих транспортеры гексоз (рис. 35).

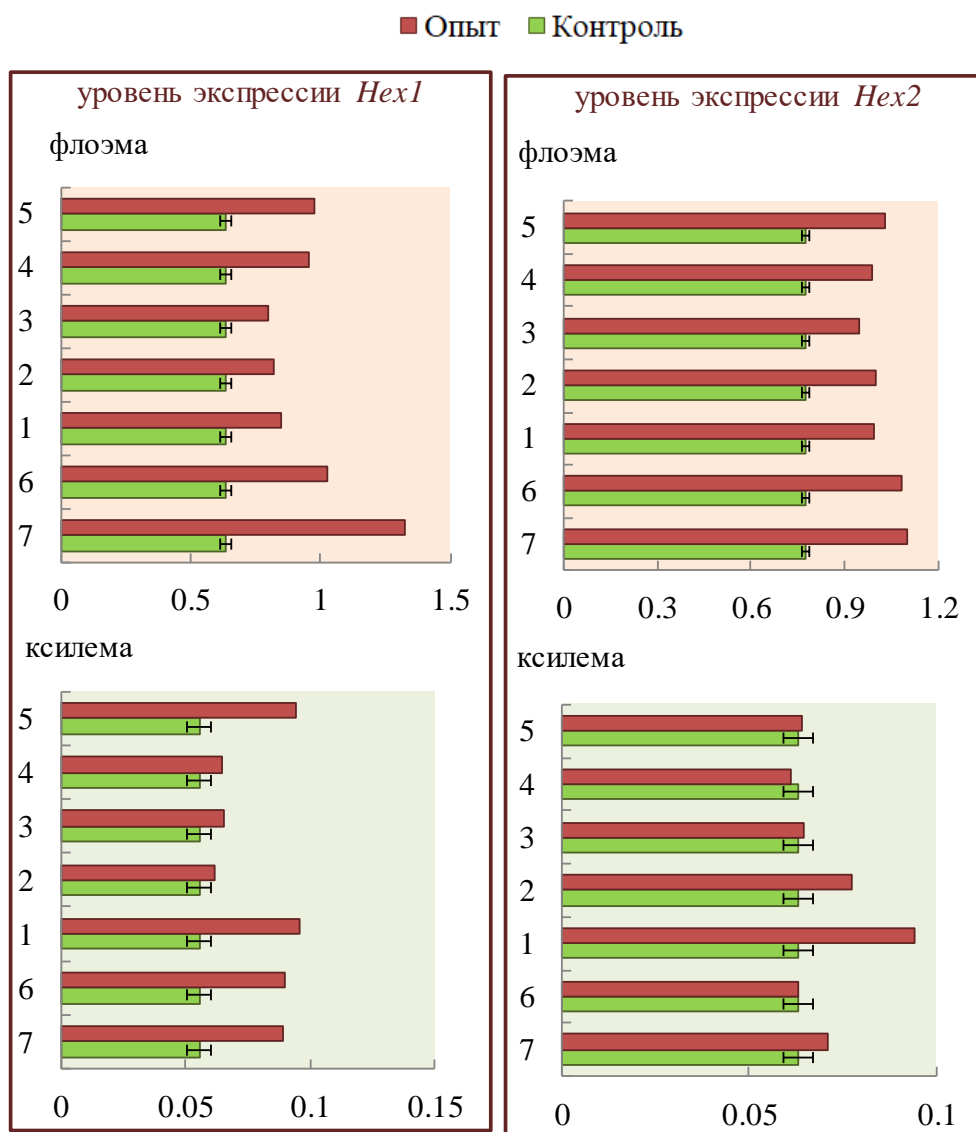


Рисунок 55. Уровень экспрессии (отн. ед.) генов, кодирующих транспортеры гексоз (*Hex1* и *Hex2*) в исследуемых зонах деревьев, подвергшихся кольцеванию (опыт), и контрольных деревьев.

Локальное повышение уровня дисахарида у опытных растений приводило к возрастанию транскриптов мРНК генов, кодирующих изоформы СС, которые участвуют в синтезе компонентов клеточных стенок (*Sus1* и *Sus2*) (рис. 53), а также генов, кодирующих изоформы целлюлозосинтазы (рис. 54), участвующие в синтезе первичной (*Ces3*) и вторичной (*Ces7*) клеточной стенок. Второе отличие от аномальных узорчатых тканей карельской березы – вероятное наличие процессов новообразования клеток.

В результате проведенного исследования на примере двух форм березы повислой рассмотрены молекулярно-генетические механизмы 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* (рис. 24, 26) и сопровождается активным синтезом структурных компонентов клеточных стенок. У березы, как и у других древесных растений, при интенсивной дифференцировке ксилемных производных камбия СС является основным ферментом, создающим акцепторную силу растущих тканей ствола. Мембраносвязанная форма СС входит в состав целлюлозосинтазного комплекса, где УДФ-глюкоза сразу вовлекается в синтез целлюлозы, благодаря чему сахара необратимо выводятся из обмена веществ. В нормальных по строению тканях наблюдали высокий уровень экспрессии генов *Ces8*, *Ces3*, *Ces7*, кодирующих целлюлозосинтазу (рис. 31). 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* (рис. 24, 26) и сопровождается уменьшением содержания целлюлозы на единицу массы ксилемы (рис. 30, 31). Уровень экспрессии генов *Ces8*, *Ces3*, *Ces7*, кодирующих целлюлозосинтазу, в аномальных участках ствола снижен (рис. 31). В этом случае высокая акцепторная сила тканей поддерживается за счет метаболизации притекающей сахарозы с участием инвертазы.

Апопластная инвертаза – это ключевой фермент, метаболизирующий транспортную сахарозу. В камбиальной зоне в транспорте ассимилятов между флоэмой и прозенхимными элементами ксилемы апопласту принадлежит основная роль. При поступлении сахарозы в апопласт в количестве, превосходящем производительность переносчиков, она дольше находится в контакте с АпИInv, в связи с чем большее ее количество метаболизируется. Полученные данные свидетельствуют о том, что при разных сценариях ксилогенеза прозенхимные ксилемные производные камбия получают ассимилянты в разной форме. При формировании нормальной по строению ксилемы, в которой преобладают сосуды и волокна, сахара поступают в клетки в основном в виде сахарозы (рис. 35). При формировании аномальных тканей, в которых преобладают паренхимные клетки, сахароза в апопласте активно метаболизируется АпИInv (рис. 38,

39), и в клетку в основном поступают образующиеся гексозы (рис. 35), которые в свою очередь запасаются в виде крахмала (рис. 30, 31, 35). Последовательная ко-экспрессия генов, кодирующих АПИИВ и транспортеры гексоз, наблюдается во многих системах (Roitsch, Gonzalez, 2004), включая образование фруктов (Hayes et al., 2007) и семян (Weber et al., 2005). Апопластная глюкоза может быть распознана RGS1 (Regulator of G-protein signaling), который передает внеклеточный сигнал сахара в клетку через G-белки (Wang, Ruan, 2013). АПИИВ обычно экспрессируется для гидролиза избытка внеклеточной сахарозы.

СС относится к ферментам, деятельность которых жестко обусловлена статусом углеводного обмена растения, в частности, метаболизма сахарозы. Метаболизация сахарозы по сахарозосинтазному пути происходит только в условиях высоких концентраций дисахарида, так K_m для сахарозы составляет 63.5 мМ, в то время, как для УДФ, УДФ-глю и фруктозы – 0.45, 5.0 и 2.0 мМ соответственно (Курсанов и др., 1989). При меньшей концентрации сахарозы СС в клетке начинает работать в направлении синтеза дисахарида. Возрастание активности АПИИВ и, как следствие, снижение поступления сахарозы в клетку может стать причиной снижения активности СС.

Регуляция активности АПИИВ осуществляется как на уровне экспрессии кодирующих ее генов, так и на посттрансляционном уровне. Критическое снижение концентрации сахарозы в апопласте активирует белковые ингибиторы АПИИВ, что приводит к инактивации фермента. Высокий уровень сахарозы в апопласте инактивирует белковые ингибиторы инвертазы, стимулируя активность АПИИВ (Rausch, Greiner, 2004; Roitsch, Gonzalez, 2004; Ruan et al., 2010; French et al., 2014; Ruan, 2014; Tang et al., 2017). Мы показали, что у обычной березы в период камбиальной деятельности уровень экспрессии генов, кодирующих АПИИВ, близок к таковому у карельской березы (рис. 39). То есть в период активного оттока ассимилятов в ствол растение потенциально готово повысить активность АПИИВ в случае увеличения содержания сахарозы в апопласте. Показано, что введение экзогенной сахарозы (эксперимент с введением в ткани ствола растворов сахарозы) или увеличение уровня эндогенной сахарозы (эксперимент с пересадкой растений и эксперимент с кольцеванием ствола) приводят к увеличению у обычной березы активности АПИИВ (рис. 44, 49) и уровня экспрессии кодирующих ее генов (рис. 53).

Интересные результаты получены на сеянцах двух форм березы повислой. Уже на начальных этапах онтогенеза мы наблюдали отличия в уровне экспрессии генов, кодирующих СС, подобные тем, которые характерны для взрослых растений (рис. 28). Таким образом, на стадии развития растений, когда видимые различия между двумя формами березы еще отсутствуют, были обнаружены метаболические изменения путей утилизации сахарозы, которые во взрослом состоянии являются индикатором нарушений в деятельности камбия.

Развитие сосудистой системы растений требует сложной координации между двумя процессами: пролиферацией клеток камбиальной зоны и их последующей дифференцировкой. Существенное влияние на скорость деления клеток, ориентацию клеточных делений и дифференциацию клеток оказывает пара лиганд-рецептор CLE41/42 - PXY (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). Результаты изучения данного вопроса представлены в следующей главе.

ГЛАВА 5. ОСНОВНЫЕ РЕГУЛЯТОРЫ РАЗВИТИЯ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЛАТЕРАЛЬНЫХ МЕРИСТЕМ

Ксилогенез у древесных растений проходит в несколько этапов: деление в периклинальном направлении ксилемных производных камбия, их рост и последующая дифференциация, которая включает отложение многослойной вторичной клеточной стенки, ее одревеснение и запрограммированную клеточную смерть (Du, Groover, 2010; Ye, Zhong, 2015). При формировании узорчатой древесины карельской березы нарушение ксилогенеза происходит уже на стадии деления инициалей камбия. Изменяется направление деления лучевых инициалей – вместо упорядоченных периклинальных делений, имеющих место в камбии обычной березы повислой, они претерпевают антиклинальные и поперечные деления, что приводит к увеличению в камбиальном слое числа лучевых инициалей и изменению соотношения веретеновидные/лучевые инициали. Следствием этого становится рост числа радиальных лучей и количества составляющих их паренхимных клеток (Барильская, 1978). К механизмам, определяющим направление дифференцировки клеток камбия, относится синтез CLE-пептидов группы В (CLE-41, CLE-42, CLE-44), которые являются звеном CLAVATA-подобной системы TDIF (TRIFERY ELEMENT DIFFERENTIATION INHIBITORY FACTOR) – TDR (TDIF RECEPTOR) (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). В норме эти CLE-пептиды синтезируются в клетках флоэмы, транспортируются в камбиальную зону и воспринимаются там рецептором TDR. Пептидный сигнал подавляет дифференциацию ксилемных производных и активирует экспрессию генов, кодирующих гомеодоменсодержащие транскрипционные факторы *WOX4* и *WOX14*, которые в свою очередь стимулируют пролиферацию клеток камбия. Пептид TDIF эндогенно кодируется у *Arabidopsis* генами *CLE41* и *CLE44*, а также близким гомологом с аналогичной активностью *CLE42* (Ito et al., 2006). TDIF-рецептор – мембранная рецепторная протеинкиназа семейства LRR-RLK (Leucine Repeat Receptor-Like Kinases) кодируется геном *TDR/PXY* (Hirakawa et al., 2008). Как правило, экспрессия *CLE41/44* не перекрывается с экспрессией *TDR/PXY*, которая является специфичной для прокамбия. Таким образом, пептидный сигнал, полученный

из флоэмы, действует как позиционный сигнал для ориентации периклинальных делений клеток. На трансгенных растениях осины показано, что сверхэкспрессия *CLE41* во флоэме увеличивает количество проводящих элементов при сохранении их нормального строения, и, напротив, эктопическая сверхэкспрессия *CLE41* и его гомолога *CLE42* нарушает периклинальные деления в гипокотилиях и приводит к увеличению числа паренхимных клеток (Etchells, Turner, 2010, Etchells et al., 2015). В связи с этим, в дальнейших исследованиях мы предприняли попытку выяснить, сопровождается ли нарушение деления камбиальных инициалей у карельской березы изменением транскрипционной активности генов *CLE41* и *PXY*.

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

Исследование проводили на 46-летних деревьях обычной березы с типичной для вида прямослойной древесиной и карельской березы с высокой степенью узорчатости древесины ствола (рис. 57). Все опытные растения произрастали в одинаковых почвенно-климатических условиях на Агробиологической станции Карельского научного центра РАН. Отбор образцов проводили в период камбиального роста 2016 г:

15.06 – активное формирование ранней тонкостенной древесины;

07.07 – активизация утолщения клеточной стенки;

25.07 – продолжение формирования вторичной клеточной стенки.

Изучение уровня экспрессии генов проводили в тканях флоэмы и ксилемы. В ткани ксилемы входили материнские клетки ксилемы и наружные слои прироста ксилемы текущего года. Ткани флоэмы включали камбиальную зону, проводящую флоэму и самые внутренние слои непроводящей флоэмы. Отбор тканей ствола контролировали под световым микроскопом. На рисунке 56 представлена динамика ширины флоэмы, камбиальной зоны и зон формирования ксилемы в разные даты отбора.

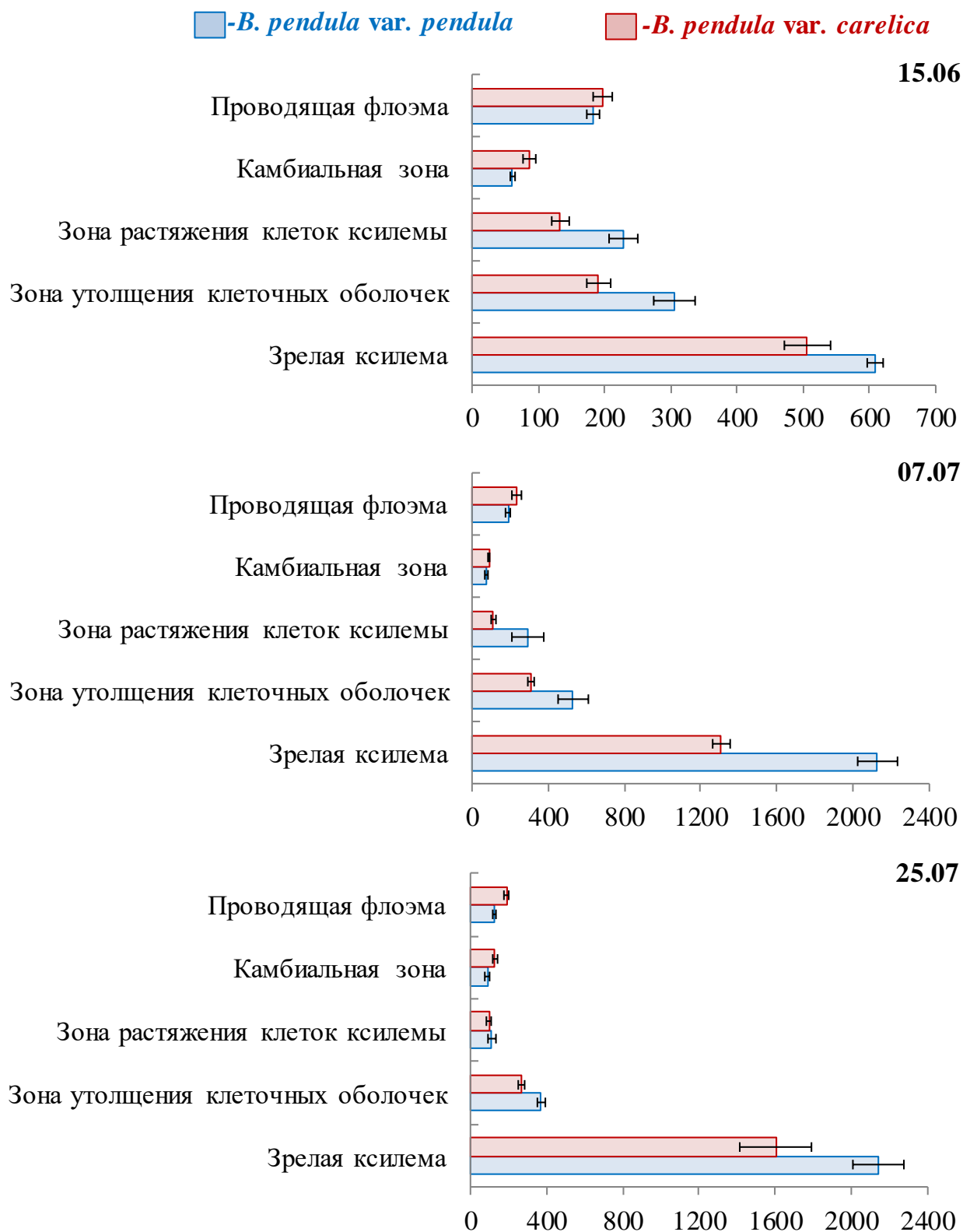


Рисунок 56. Ширина (мкм) проводящей флоэмы, камбиальной зоны и зон формирования ксилемы у 40-летних деревьев обычной и карельской березы в течение сезона. Даты отбора образцов: 15.06.2016, 07.07.2016 и 25.07.2016.

В период активного формирования ранней тонкостенной древесины (15.06.2016) ширина проводящей флоэмы не отличалась у двух форм березы и составляла около 190 мкм. Камбиальная зона у карельской березы была в 1.4 раза шире, по сравнению с обычной березой. При этом зоны формирования ксилемы, напротив, были шире у обычной березы: зоны растяжения клеток и утолщения оболочек в 1.7 раз, а зрелая ксилема в 1.4 раза (рис. 56).

В период активного утолщения клеточной стенки (07.07.2016) увеличился размер зоны зрелой ксилемы в 2.5 и 3.5 раза у карельской и обычной березы соответственно. Также в 1.6 раза увеличилась зона утолщения клеточных оболочек ксилемы, ее ширина достигала 309 и 530 мкм у карельской и обычной березы. Зона растяжения клеток ксилемы немного возросла только у обычной березы и превысила таковую у карельской березы в 2.6 раза. При этом размер камбиальной зоны и зоны проводящей флоэмы был в 1.2 раза больше у карельской березы, по сравнению с обычной березой (рис. 56).

К 25 июля 2016 г., т.е. в период продолжения формирования вторичной клеточной стенки, еще больше увеличилась зона зрелой ксилемы, ширина ее составила 1604 и 2145 мкм у карельской и обычной березы соответственно. При этом размеры зон растяжения клеток и утолщения оболочек снизились у обеих форм березы. В этот период наиболее ярко выражены отличия по ширине зоны проводящей флоэмы и камбиальной зоны, ее размеры были в 1.5 раза больше у карельской березы, по сравнению с обычной березой (рис. 56).

Относительный уровень экспрессии гена, кодирующего CLE-пептиды (*CLE41*), у обычной березы во флоэме в период активного формирования ранней тонкостенной древесины (15.06.2016) составил 0.04 усл. ед., повысился к началу июля в 3 раза и оставался на этом уровне до конца июля. В тканях ксилемы обычной березы ген *CLE41* практически не экспрессировался (рис. 57). Эти данные согласуются с представлением о том, что для поддержания правильно ориентированных клеточных делений необходима локализованная экспрессия *CLE41* во флоэме (Etchells, Turner, 2010).

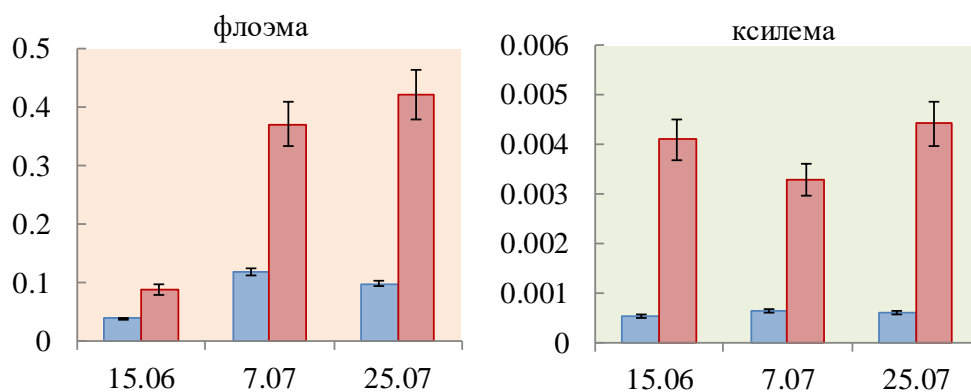
Количество транскриптов мРНК гена *PXY*, кодирующего рецептор для CLE-41, со стороны флоэмы в период активного формирования ранней тонкостенной древесины (15.06.2016) составило 0.04 усл. ед. и повысилось к 07.07.2016 г. в 2 раза.

■ *B. pendula* var. *pendula*

■ *B. pendula* var. *carelica*



Относительный уровень экспрессии гена *CLE41*



Относительный уровень экспрессии гена *PXY*

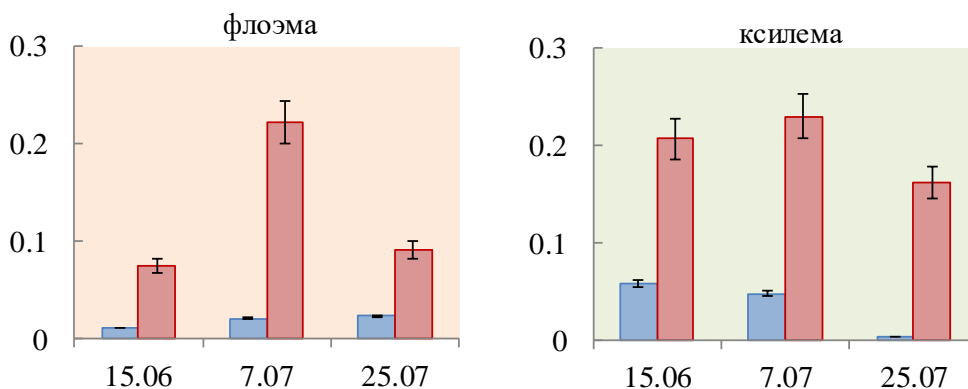


Рисунок 57. На фотографиях – окоренная поверхность древесины 40-летних растений обычной (*B. pendula* var. *pendula*) и карельской (*B. pendula* var. *carelica*) березы. На диаграммах – сезонная динамика транскриптов мРНК (отн.ед.) генов *CLE41* во флоэме и *PXY* в камбиальной зоне у двух форм березы. По оси абсцисс – дата взятия образцов. Представлены средние значения и их стандартные ошибки.

В тканях 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). Поскольку в период камбиального роста при снятии коры с древесины разрыв тканей происходит по зоне активного деления, которая в это время приходится на слой роста и дифференциации клеток ксилемы, то структурные элементы ксилемы оказываются как со стороны препарированной нами "флоэмы", так и со стороны "ксилемы", что объясняет наличие в них транскриптов мРНК гена *PXY*.

У карельской березы мы обнаружили ряд существенных отличий от обычной березы. Во-первых, во флоэме у нее был в 3 раза выше уровень экспрессии гена, кодирующего пептид CLE-41. 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 (рис. 57). Таким образом, в период камбиального роста в местах формирования аномальной древесины у карельской березы на фоне большей экспрессии генов *CLE41* и *PXY* шире зона проводящей флоэмы и камбиальная зона, и меньше размер зон формирования ксилемы, по сравнению с нормальной древесиной обычной березы. Полученные нами данные согласуются с известными функциями лиганд-рецепторной системы CLE41/*PXY*, а именно, ее участием в подавлении развития ксилемы, а также 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., 2016; 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 (рис. 57). Это явилось еще одной особенностью карельской березы. Для обсуждения полученного результата мы привлекли данные по изменению уровня экспрессии гена *CLE41*, полученные на модельном растении *Arabidopsis* (Fisher and Turner, 2007; Etchells, Turner, 2010). В этих работах авторы получали увеличение экспрессии *CLE41* с использованием (1) промотора *SUC2*, специфичного для флоэмы (Truernit and Sauer, 1995), (конструкция *SUC2::CLE41*), (2) *35S*-промотора (конструкция *35S::CLE41*), вызывающего повсеместную экспрессию *CLE41*, и (3) *IRX3*-промотора

(конструкция *IRX3::CLE41*), специфичного для ксилемы (Gardiner et al., 2003; Mitsuda et al., 2007). Во всех использованных конструкциях наблюдалось значительное возрастание числа клеток по сравнению с диким типом, что согласуется с данными других исследователей сообщениями (Hirakawa et al., 2008).

При увеличении экспрессии *CLE41* во флоэме (*SUC2::CLE41*) клеточные деления были упорядочены, как у растений дикого типа, у которых все клетки ксилемы имеют нормальную ориентацию и располагаются параллельно на продольных и тангентальных срезах, или под прямым углом на поперечных срезах. Напротив, в линиях *35S::CLE41* и *IRX3::CLE41* присутствуют сосуды ксилемы с резко отличающейся ориентацией: сосуды, имеющие нормальную ориентацию, расположены рядом с сосудами с перпендикулярной ориентацией. Было высказано предположение, что ориентация деления клеток зависит от локализации пептида *CLE41*: на начальном этапе развития сосудистой оболочки требуется градиент концентрации TDIF, экспрессия его гена *CLE41* должна быть ограничена флоэмой и прилегающими к ней клетками камбия (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 (рис. 58).

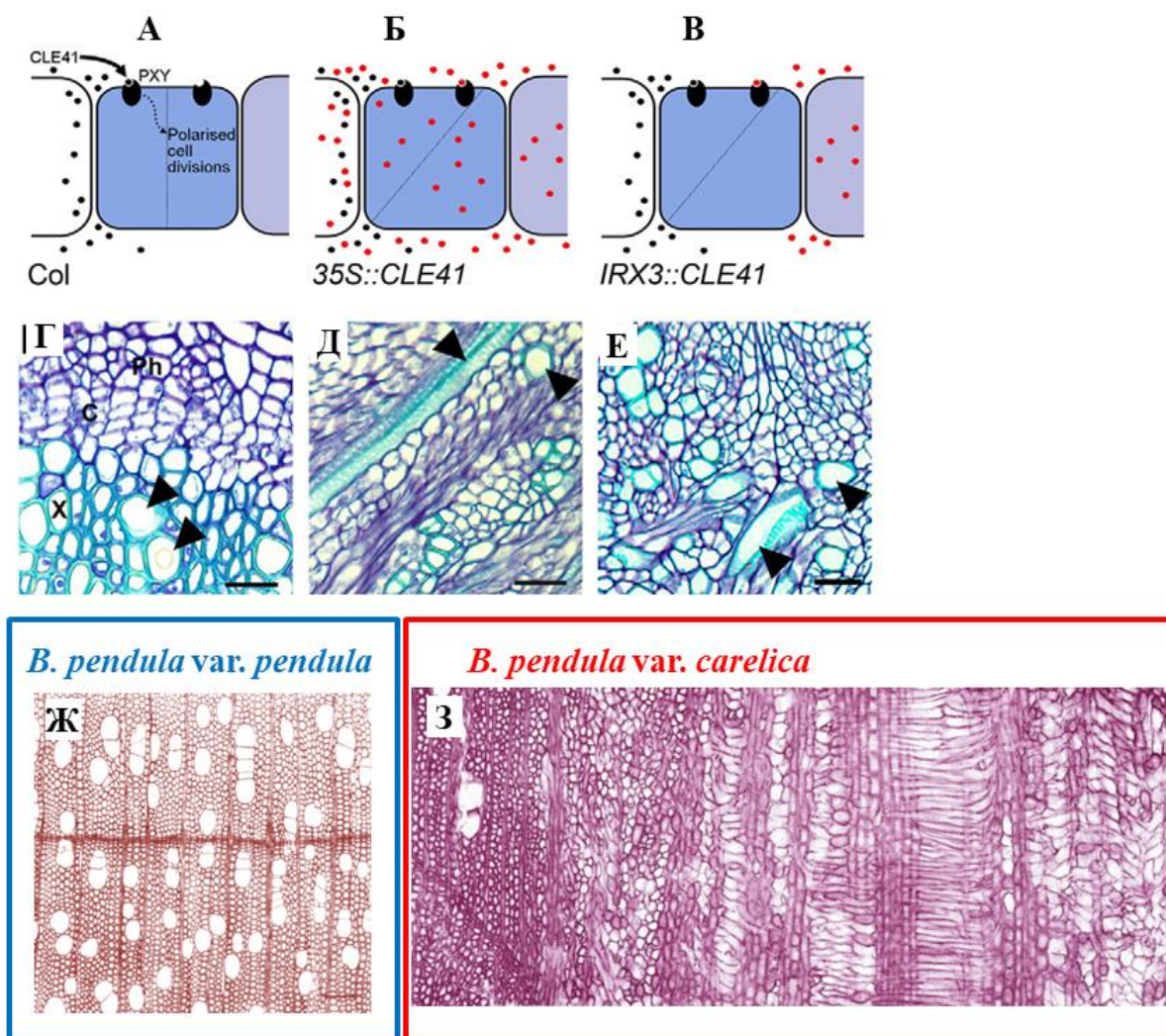


Рисунок 58. Схематическое расположение локализации экспрессии *CLE41* и *PXY* (А-В). Поперечные срезы проводящих тканей растений *Arabidopsis* (Г-Е) (X – ксилема, С – камбий, Ph- флоэма, стрелками отмечены сосуды ксилемы). У контрольных растений (А) благодаря локализации генов, кодирующих пептид *CLE41* во флоэме и его рецептора *PXY* в камбиальной зоне, образующиеся структурные элементы проводящих тканей имеют нормальную ориентацию. Сверхэкспрессия *CLE41* (Б, В) под 35S-промотором (конструкция *35S::CLE41*, повсеместная экспрессию *CLE41*) (Б), и *IRX3*-промотором, специфичным для ксилемы (конструкция *IRX3::CLE41*), (В) приводит к увеличению числа делений в камбиальной зоне и изменению ориентации образующихся сосудов ксилемы (Д, Е). Поперечные срезы ксилемы *B. pendula* var. *pendula* (Ж) (нормальная ориентация сосудов) и *B. pendula* var. *carelica* (З), на которых видно нарушение ориентации проводящих элементов в местах аномалий березы. А-Е по Etchells, Turner, 2010 с изменениями.

Изучение сезонной динамики транскриптов мРНК генов *CLE41* и *PXY* у двух форм березы повислой показало, что повышение во флоэме экспрессии генов, кодирующих лиганд CLE-41, приводит к снижению в камбиальной зоне экспрессии генов, кодирующих его рецептор *PXY* (рис. 59). Так, уровень экспрессии гена *CLE41* во флоэме при переходе от периода активного формирования ранней тонкостенной древесины (15.06.2016) к периоду активного утолщения клеточной стенки (07.07.2016) повысился в 3 раза у обычной березы (с 0.04 до 0.12 усл. ед.) и в 4 раза у карельской березы (с 0.09 до 0.37 усл. ед.). При этом количество транскриптов мРНК гена *PXY* в камбиальной зоне обычной березы не изменялось (0.07 усл. ед.), а у карельской березы возросло в 1.6 раза (с 0.28 до 0.45 усл. ед.). Дальнейшее увеличение и/или сохранение на том же уровне экспрессии гена *CLE41* во флоэме сопровождалось снижением количества транскриптов мРНК гена *PXY* в камбиальной зоне у обычной березы в 2.3 (до 0.03 усл. ед.), а у карельской березы в 1.8 раза (до 0.25 усл. ед.) (рис. 59).

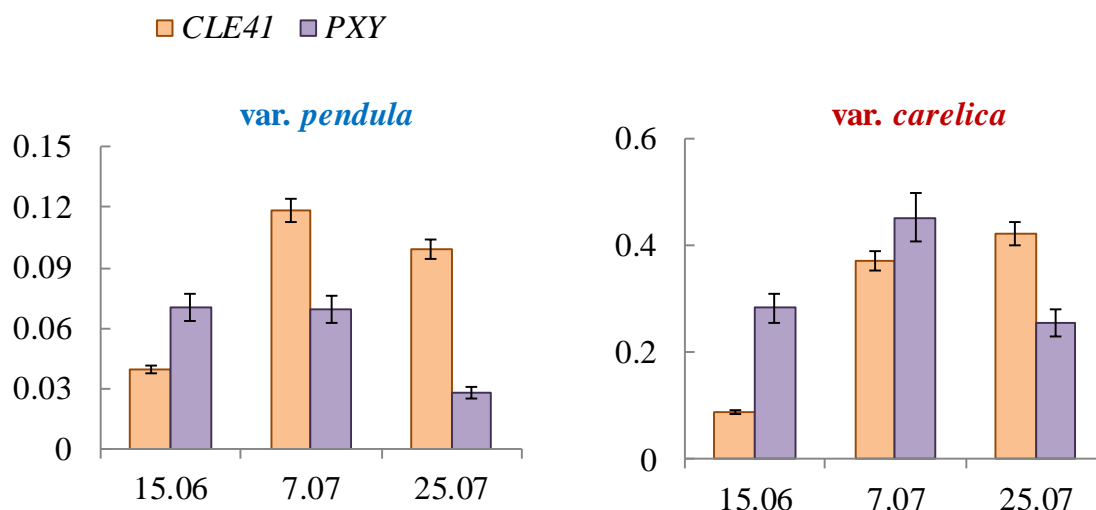


Рисунок 59. Сезонная динамика транскриптов мРНК (отн. ед.) генов *CLE41* во флоэме и *PXY* в камбиальной зоне у обычной березы повислой (*var. pendula*) и карельской березы (*var. carelica*). По оси абсцисс – дата взятия образцов. Представлены средние значения и их стандартные ошибки.

Полученные нами данные согласуются с изложенным в литературе механизмом регуляции уровня экспрессии *PXY* по типу отрицательной обратной связи, а именно, сигнализация *PXY* в ответ на повышение уровня экспрессии *CLE41*, подавляет

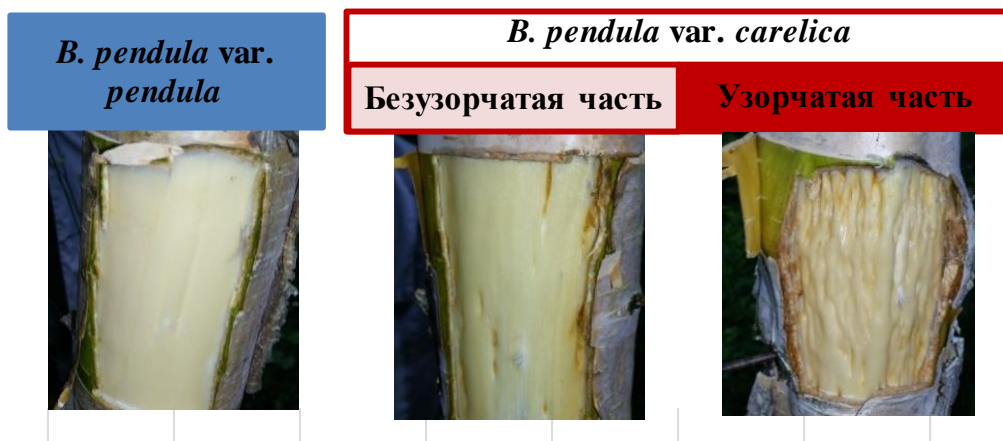
экспрессию гена *PXY*. Так, у растений *35S::CLE41* (повсеместное увеличение экспрессии *CLE41*) происходило снижение экспрессии гена *PXY* в стебле и гипокотиле (Fisher and Turner, 2007; Etchells, Turner, 2010).

Представленные результаты вместе с данными других исследователей (Ito et al., 2006; Hirakawa et al., 2008; 2010a, b; Whitford et al., 2008; Etchells, Turner, 2010; Ye, Zhong, 2015; Etchells et al., 2015; Nieminen et al., 2015) показывают, 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.

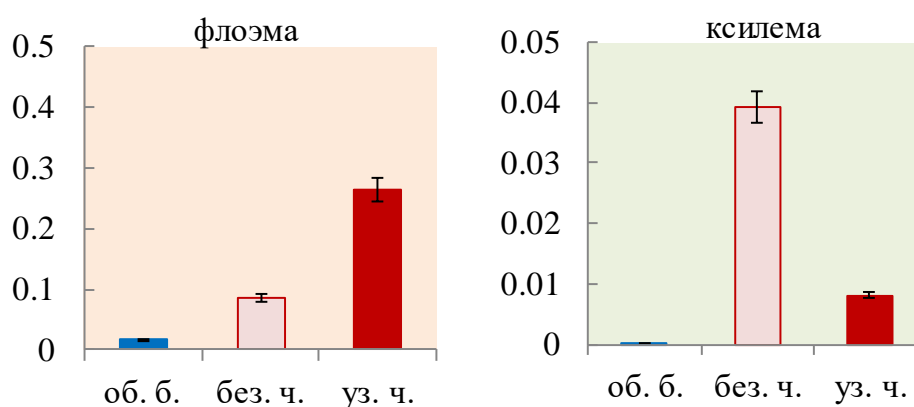
В связи с вышеизложенным представляет интерес рассмотрение экспрессии генов, кодирующих пептид *CLE-41* и его рецептор *PXY*, в нормальных по строению тканях ствола обычной березы и в тканях ствола карельской березы с разной степенью их аномальности (узорчатая и безузорчатая части ствола) (рис. 60). Возраст исследуемых растений 11 лет. Отбор и фиксация растительного материала проведены в период активного формирования вторичной клеточной стенки (начало июля 2016 года).

У 11-летних растений обычной березы уровень экспрессии гена *CLE41* во флоэме (0.017 усл. ед.) был в 15 раз ниже, а уровень экспрессии гена *PXY* в камбиальной зоне в 7.8 раза ниже по сравнению с узорчатой частью ствола карельской березы (рис. 60). Если в ксилеме обычной березы ген *CLE41* практически не экспрессировался, то в ксилеме узорчатой части ствола карельской березы обнаруживаются транскрипты мРНК гена *CLE41* (рис. 60). То есть, распределение экспрессии генов *CLE41* и *PXY* в камбиальной зоне у 11-летних растений было схоже с таковым у 46-летних растений (рис. 58).

Интересный результат был получен для безузорчатой части ствола узорчатых растений карельской березы. Если уровень экспрессии гена *CLE41* во флоэме (0.085 усл. ед.) занимал промежуточное положение между обычной березой (0.017 усл. ед.) и узорчатой частью ствола карельской березы (0.264 усл. ед.), то в ксилеме его значение было в 5 раз выше, по сравнению с узорчатым участком (рис. 60). 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. 60).



Относительный уровень экспрессии гена *CLE41*



Относительный уровень экспрессии гена *PXY*

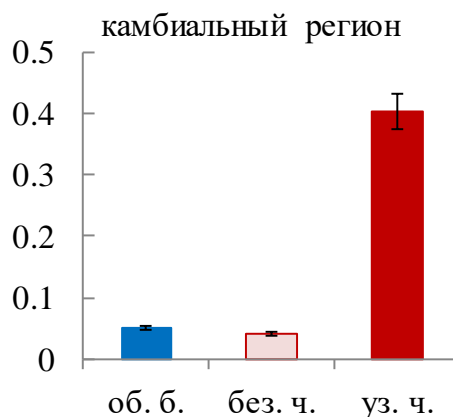


Рисунок 60. На photographs – окоренная поверхность древесины 11-летних растений обычной березы (*B. pendula* var. *pendula*) (об.б.) и безузорчатой (без.ч.) и узорчатой (уз.ч.) частей ствола карельской березы (*B. pendula* var. *carelica*). На диаграммах – относительный уровень экспрессии (отн.ед.) генов *CLE41* во флоэме и *PXY* в камбиальной зоне у двух форм березы. Дата отбора – 07.07.2016. Представлены средние значения и их стандартные ошибки.

Таким образом, разные сценарии ксилогенеза у карельской и обычной березы отличаются по распределению уровня экспрессии генов, кодирующих TDIF-пептид CLE-41 и его рецептор TDR, которые играют центральную роль в судьбе стволовых 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. В безузорчатых участках ствола узорчатых растений карельской березы, где формирование нормальной по строению древесины происходит на фоне высокого содержания сахаров в тканях (раздел 4.2.1), 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 (рис. 60).

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

Какова же дальнейшая судьба клеток камбиальной зоны, у которых изменяется распределение экспрессии генов, кодирующих CLE-пептиды и их рецепторы? Для ответа на этот вопрос мы изучили уровни экспрессии генов, кодирующих транскрипционные факторы, которые осуществляют непосредственный контроль над дифференцировкой элементов ксилемы и флоэмы. Это транскрипционные факторы VND6 и 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), который играет роль в развитии флоэмы.

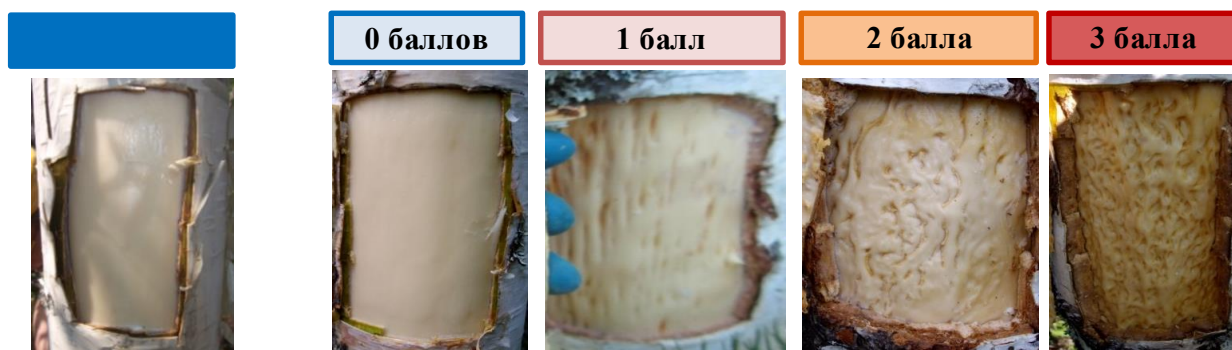
Исследование проводили на 25-летних деревьях карельской березы, произрастающих на лесосеменной плантации (Медвежьегорский район, Республика Карелия). Характеристика территории и объектов исследования приведены в разделе 3.4.2. Всем растениям был присвоен балл от 0 до 3 в зависимости от степени проявления узорчатости древесины (рис. 61). Для контроля использовали растения обычной березы того же возраста. Отбор образцов проводили в период активного формирования ранней тонкостенной древесины (начало июля 2017 г.). Для анализа отбирали ткани ксилемы, куда входили материнские клетки ксилемы и наружные слои прироста ксилемы текущего года.

У растений карельской березы эктопическая экспрессия в ксилеме гена, кодирующего пептид CLE-41, возрастала с увеличением степени узорчатости древесины и была выше, по сравнению с обычной березой. Интересно отметить, что самый высокий уровень экспрессии гена *CLE41* был у безузорчатых растений карельской березы (рис. 61). При этом количество транскриптов мРНК гена *PXY*, кодирующего рецептор для CLE-лиганда, у безузорчатых растений было соизмеримо с таковым у обычной березы и возрастало с увеличением степени узорчатости тканей ствола (рис. 61). Картина распределения экспрессии генов, кодирующих систему TDIF-TDR, у безузорчатых растений, а именно, – высокий уровень эктопической экспрессии *CLE41* в ксилеме при пониженной экспрессии *PXY*, схожа с таковой в безузорчатых участках ствола узорчатых растений карельской березы (рис. 60). Из этого можно предположить

наличие общего механизма регуляции развития стволовых клеток у узорчатых и безузорчатых растений карельской березы.

B. pendula var.
pendula

B. pendula var. *carelica*



Относительный уровень экспрессии генов

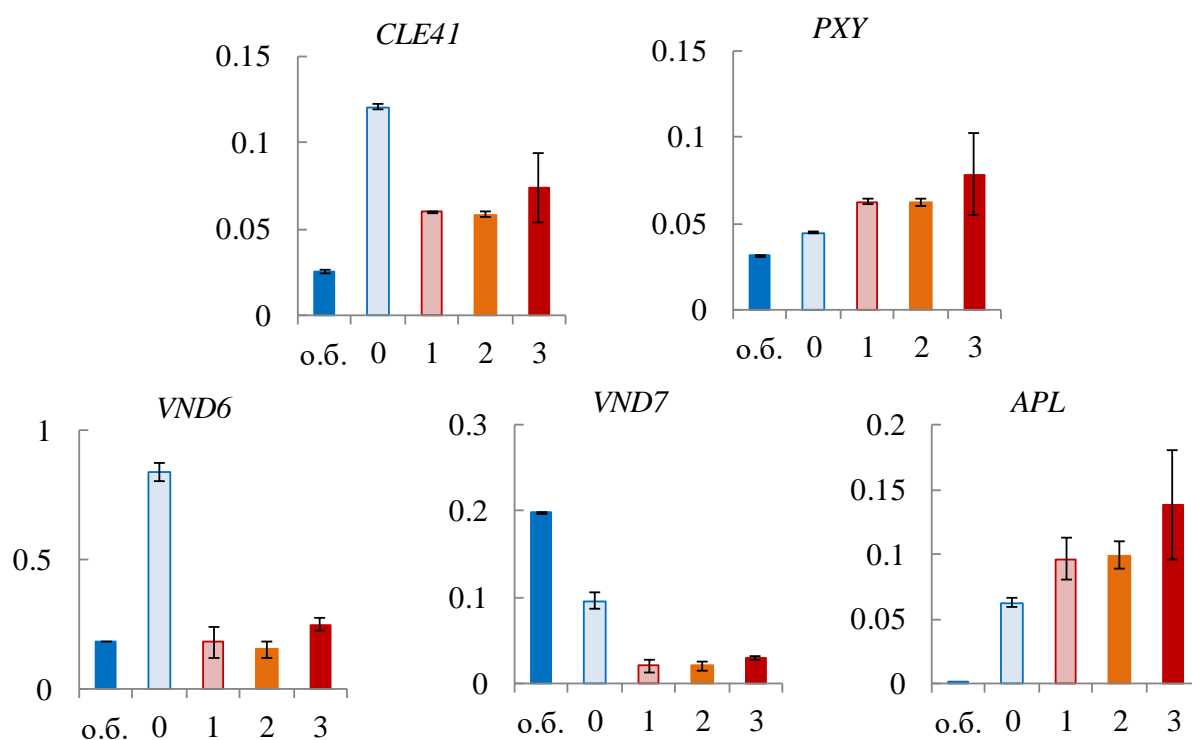


Рисунок 61. На фотографиях – окоренная поверхность древесины 25-летних растений обычной березы (*B. pendula* var. *pendula*) (о.б.) и карельской березы (*B. pendula* var. *carelica*) с разной степенью узорчатости древесины (0-3 балла). На диаграммах – относительный уровень экспрессии (отн.ед.) генов *CLE41*, *PXY*, *VND6*, *VND7* и *APL* в ксилемной части камбиальной зоны. Дата отбора – 03.07.2017. Представлены средние значения и их стандартные ошибки.

VND6 и VND7 – факторы транскрипции, участвующие в дифференцировке клеток ксилемы, формировании клеточной стенки, регуляции запрограммированной клеточной смерти (Kubo et al. 2005; Demura, Fukuda 2007; Zhong, Ye 2007; Du, Groover, 2010; Nystedt et al., 2013; Zhang et al., 2014; Kondo et al., 2015). При образовании нормальной по строению древесины уровень экспрессии генов *VND6* и *VND7* в ксилеме был выше, по сравнению с узорчатыми растениями карельской березы (рис. 61). Мы обнаружили отличия между обычной березой и безузорчатыми растениями карельской березы. Так, 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. Следует отметить, что растения карельской березы с разной степенью узорчатости древесины (1-3 балла) не отличались между собой по уровню экспрессии генов *VND6* и *VND7* (рис. 61). Обычно функции транскрипционных факторов *VND6* и *VND7* характеризуют применительно к развитию первичной ксилемы (Kubo et al. 2005; Demura, Fukuda 2007; Zhong, Ye 2007; Du, Groover, 2010; Kondo et al., 2015). Так, сверхэкспрессия генов *VND6* и *VND7* индуцирует трансдифференцировку мезофилла и других типов клеток у *Arabidopsis* и у *Populus*, в трахеальные элементы с вторичными клеточными стенками, подобные сосудам метаксилемы и протоксилемы соответственно (Kubo et al. 2005; Demura, Fukuda 2007; Zhong, Ye 2007; Du, Groover, 2010; Kondo et al., 2015). Сведений о том, отличаются ли между собой процессы, которые регулируют *VND6* и *VND7* при формировании вторичной ксилемы, в известной нам литературе мы не встретили. Вероятно, оказывают влияние на состав клеточных стенок, регулируя экспрессию генов, кодирующих ферменты синтеза .

Фактор транскрипции *APL* участвует в развитии флоэмы и экспрессируется уже на ранних стадиях развития ткани (эмбриональная стадия) (Bonke et al., 2003; Truernit et al., 2008; Truernit, 2014; Neo et al., 2014; Rodriguez-Villalon et al., 2014; 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. 61). 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 экспрессии которого был самым высоким при формировании ксилемы у обычной березы (рис. 61). Известно, что *APL* требуется не только для дифференциации флоэмы, но также для ингибирования дифференциации ксилемы на месте флоэмы (Bonke et al., 2003; Truernit et al., 2008; Truernit, 2014; Neo et al., 2014). У растений *Arabidopsis* со сверхэкспрессией *APL* по всей сосудистой ткани под промотором *WOL* (конструкция *WOLpro::APL*) клетки в положении протоксилемы оставались недифференцированными по всему корню. Тот факт, что недифференцированные клетки в месте типичного расположения протоксилемы содержали ядро, указывает на то, что *APL* сам по себе недостаточен для инициирования развития флоэмы в эктопическом положении. Было выдвинуто предположение, 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; Truernit et al., 2008; Truernit, 2014; Rodriguez-Villalon et al., 2014; 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 стволовых клеток. При этом существенно меняется уровень экспрессии генов факторов транскрипции, регулирующих дифференцировку клеток камбия. Безузорчатые растения карельской березы, несмотря на отсутствие визуальных признаков структурных аномалий, отличаются от обычной березы по характеру распределения экспрессии генов, контролирующих развитие камбиальных производных.

5.3. Изменение уровня экспрессии генов *CLE41* и *PXY* у семян обычной березы повислой и карельской березы на начальных этапах онтогенеза

Мы попытались определить этап онтогенеза, на котором начинают проявляться различия по распределению экспрессии генов, кодирующих систему TDIF-TDR. Исследование проводили на 2-, 5-, 6-, 7-, 8-, 10-недельных сеянцах обычной и карельской березы.

У 2-недельных растений обычной березы уровень экспрессии гена *CLE41* составил 1.3 отн. ед, возрастал в 2.7 раза к 5-ти неделям и оставался примерно на этом уровне до 10-недельного возраста. У 2-недельных растений карельской березы количество транскриптов мРНК гена *CLE41* было в 2.6 раза меньше, по сравнению с обычной березой. У 5-недельных сеянцев карельской березы экспрессия гена *CLE41* возросла в 10 раз, превысила таковую у обычной березы в 1.3 раза и оставалась на этом уровне до 10-недельного возраста (рис. 62).

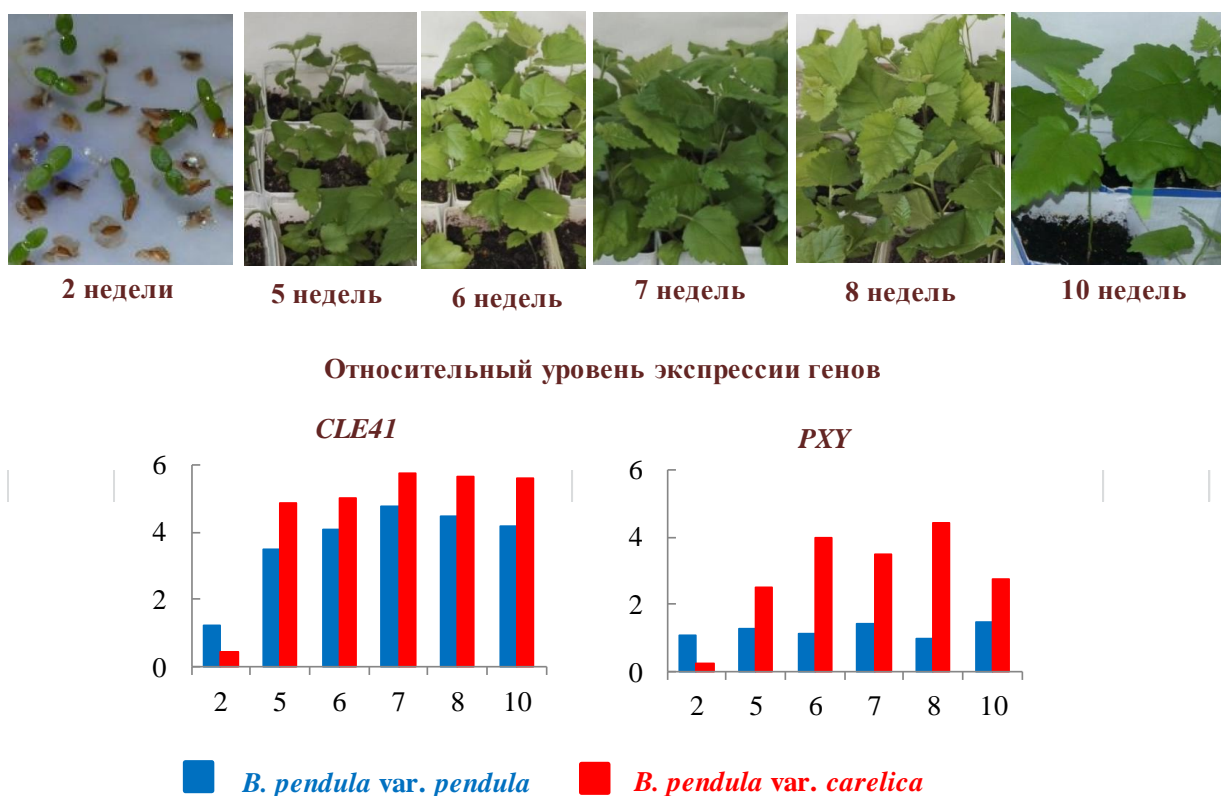


Рисунок 62. На фотографиях – внешний вид сеянцев березы повислой разного возраста (2, 5, 6, 7, 8, 10 недель). На диаграммах – относительный уровень экспрессии (отн.ед.) генов *CLE41* и *PXY* в стебле сеянцев обычной (*B. pendula* var. *pendula*) и карельской (*B. pendula* var. *carelica*) березы. По оси абсцисс – возраст растений (недели).

Уровень экспрессии генов рецептора TDR у 2-недельных семян обычной березы был 3.7 раза выше, по сравнению с 2-недельными сеянцами карельской березы. Притом, если у обычной березы с возрастом количество транскриптов мРНК гена *PXY* не изменялось (1.2-1.5 отн. ед), то у карельской березы увеличилось к 5 неделям в 8 раз (до 2.5 отн.ед.), продолжало возрастать у 6-недельных растений в 1.6 раза (до 4 отн.ед), оставалось на этом уровне до 8 недель и снижалось у 10-недельных сеянцев в 1.6 раза (до 2.8 отн. ед) (рис. 62).

У сеянцев карельской березы, как и у 46-летних растений (рис. 59), повышение экспрессии гена, кодирующего лиганд *CLE41*, сопровождается снижением к 10 неделям экспрессии гена, кодирующего его рецептор *PXY* (рис. 62).

Таким образом, 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 сеянцев 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 (рис. 56) и сохраняется у взрослых растений (рис. 59-61).

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

Хорошо известно, что экспрессия генов, регулирующих развитие растения, контролируется рядом внутренних и внешних факторов (Гамалей, 2004). К внутренним факторам, влияющим на их активность, наряду с гормонами, относится и сахароза (Медведев, Шарова, 2010). В связи с этим мы исследовали влияние избытка эндогенной сахарозы на уровень экспрессии генов, кодирующих систему TDIF-TDR, а также транскрипционные факторы, контролирующие дифференцировку элементов ксилемы и флоэмы (*VND6*, *VND7*, *APL*).

Нисходящий транспорт сахарозы нарушали путем кольцевания ствола деревьев обычной березы повислой, как описано в разделе 4.5.3. Указанный методический прием широко используется для изучения камбиального роста в условиях различной обеспеченности тканей ассимилятами. Для исследования использовали 22-летние растения обычной березы, произрастающие на Биологической станции КарНЦ РАН. Часть деревьев были помечены как контрольные и оставлены без каких-либо воздействий. 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 с 7 зон, различающихся по обеспеченности сахарами (рис. 52).

У растений березы при нарушении кольцеванием транспорта фотоассимилятов происходит увеличение содержания сахарозы в апопласте (падает уровень экспрессии генов *Cif*), которое сопровождается возрастанием ее метаболизации по апопластному пути (возрастает уровень экспрессии генов *CWIN*) (рис. 53). При этом у опытных растений возрастает уровень экспрессии генов *CLE41* во флоэме в 2 раза и *PXY* в камбиальной зоне в 1.3 раза (рис. 63). Интересно отметить, что при этом возрастает в 2 раза и эктопическая экспрессия *CLE41* в ксилеме (рис. 63), значение ее соизмеримо с таковым для растений карельской березы с 1-2 баллами узорчатости древесины (рис. 61). Экспрессия генов факторов транскрипции, контролирующих дифференцировку флоэмы и ксилемы, также изменяется. Так, количество транскриптов мРНК гена *APL* во флоэме возрастает у опытных растений в 2.6 раза, а гена *VND6* в ксилеме в 1.6 раза, при

этом уровень экспрессии гена *VND7* остается практически без изменения (рис. 63). Следует отметить, что у безузрчатых 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. 61).

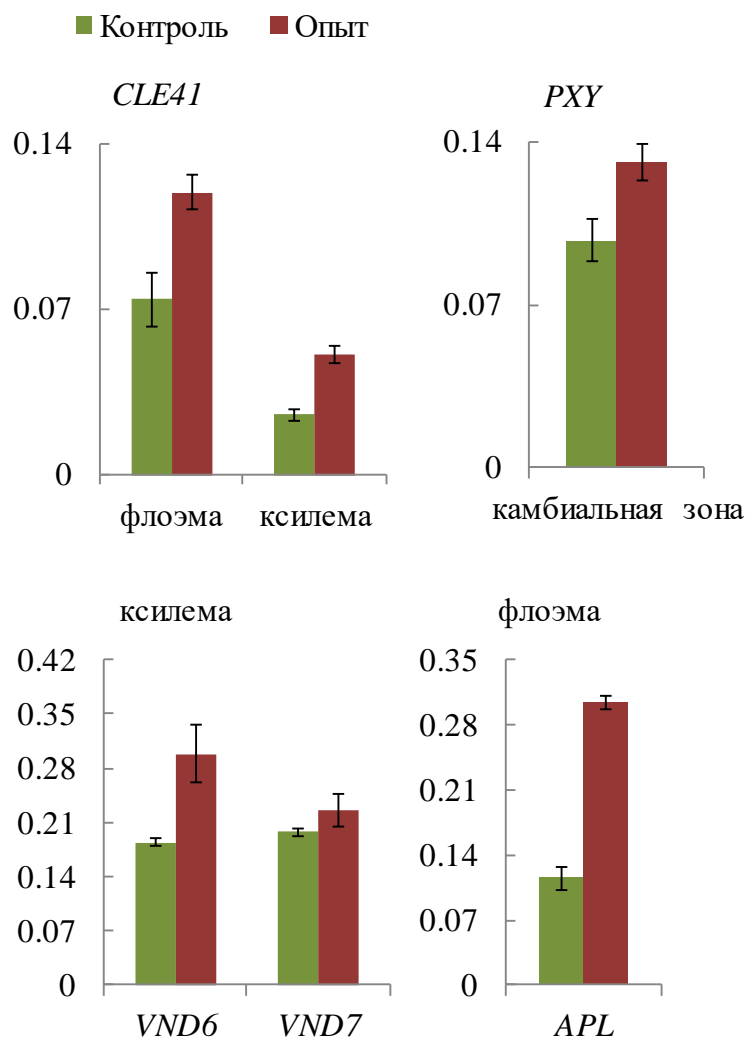


Рисунок 63. Относительный уровень экспрессии (отн.ед.) генов *CLE41*, *PXY*, *VND6*, *VND7* и *APL* в ксилеме, флоэме и камбиальной зоне контрольных и опытных (после кольцевания) растений обычной березы повислой. Дата отбора – 29.06.2017. Представлены средние значения и их стандартные ошибки.

Таким образом, на растениях обычной березы мы показали, что эндогенное повышение содержания сахаров в тканях ствола 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 камбиальных производных.

Механизмы, объясняющие нарушение работы CLAVATA-подобной системы TDIF–TDR остаются до сих пор неизученными. Эксперименты по кольцеванию обычной березы, описанные в работе, позволяют предположить, что эндогенное повышение 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*, что в свою очередь может быть причиной нарушения плоскости деления камбиальных производных. Можно предположить, что наличие избытка сахаров в камбиальной зоне изменяет пути развития производных камбия.

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, возможно, позволит получить дополнительную информацию о механизмах аномального ксилогенеза у древесных растений.

ГЛАВА 6. ВЛИЯНИЕ УРОВНЯ ПЛОДОРОДИЯ ПОЧВЫ НА РЕАЛИЗАЦИЮ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ПРОГРАММЫ У КАРЕЛЬСКОЙ БЕРЕЗЫ

Несмотря на то, что предрасположенность к нарушению обмена веществ у карельской березы – наследуемый признак, проявление его при плюсовой селекции происходит не у всех особей потомства (Любавская, 1978; Ермаков, 1986; Машкина и др., 2000; Ветчинникова, 2005; и др.). Важно отметить, что даже у деревьев с узорчатой древесиной, составляющих в среднем 50-70% от общего числа потомков, широко варьирует степень развития узора, а, следовательно, и хозяйственная ценность растений.

В пределах естественного (первичного) ареала карельская береза не образует чистых по составу древостоев, а встречается одиночно или группами в смешанных насаждениях с другими лиственными и, иногда, хвойными породами (Соколов, 1950; Евдокимов, 1989). Диапазон экологических условий, в которых произрастает карельская береза, довольно узок. Важными факторами, определяющими формирование узорчатой древесины, являются хорошее освещение, среднесуточная температура не ниже 15°C и умеренная влажность почвы (Новицкая, 2008), что в комплексе способствует синтезу и интенсивному оттоку сахарозы из листьев в формирующиеся ткани ствола. Анализ характеристик почв вокруг ареала карельской березы показал, что она не распространяется как в области очень бедных (примитивных и горно-тундровых), так и относительно богатых почв (буроземов темноцветных). 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).

К настоящему времени накоплено достаточно много данных о влиянии азотного питания на углеводный обмен растений (Gordon et al., 1999, 2002; Coruzzi, Bush, 2001; Chikov et al., 2003; Chikov and Bakirova, 2004; Баташева, 2006; Люленова, 2007; Брускова и др., 2009; Никитин и др., 2010; Никитин, Измайлов, 2016 и др.). Растения адсорбируют нитраты из почвы в основном в виде катиона аммония (NH_4^+) и нитрат аниона (NO_3^-). 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 описывается в литературе (Crawford, 1995; Lam et al., 1996; Campbell, 1999; Stitt, 1999). Метаболические процессы,

стимулирующиеся нитратом, включают: поступление и восстановление нитрата, ассимиляцию аммония, синтез органических кислот, восстановление ферредоксина и окисление глюкозофосфата в пентозофосфатном пути. Нитрат также подавляет синтез крахмала, помогая мобилизовать углерод в органические кислоты (Wang et al., 2000). Учитывая вышесказанное, мы поставили эксперимент с целью исследовать влияние экзогенного нитрата на метаболизацию сахарозы в стволе обычной и карельской березы в период камбиального роста.

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

Объектами исследования были 6-летние деревья обычной березы с нормальным строением тканей ствола и карельской березы с проявившимися признаками структурных аномалий. Все растения произрастали в одинаковых почвенно-климатических условиях на Биологической станции Карельского научного центра РАН. В эксперименте использовали растения карельской березы с высокой степенью узорчатости древесины.

Эксперимент проводили в период активного камбиального роста (2-4 июля 2012 года). Растения разделили на две группы: (1) опытные, подвергшиеся обработке нитратом калия (KNO_3), и (2) контрольные, без внесения нитратов. Под опытные растения вносили по 20 л 50 мМ раствора KNO_3 , под контрольные деревья по 20 л воды. Концентрация KNO_3 в эксперименте была взята на основании данных литературы. Так, под травянистые растения вносили растворы нитрата калия в концентрации 10 мМ (Gordon et al., 2002) и 50 мМ (Batasheva et al., 2007), под виноград – 36 мМ (Barbier et al., 2005), под шестинедельные сеянцы березы – 10 мМ (Friemann, 1992); влияние нитратов на ген нитратредуктазы, выделенный из березы повислой, изучали при воздействии 50 мМ KNO_3 (Nachtel, Strater, 2000).

Схема эксперимента:

-2 июля – внесение раствора KNO_3 под опытные растения и воды под контрольные растения;

-3 июля – отбор образцов тканей контрольных растений;

-4 июля – отбор образцов тканей опытных растений.

Из ствола березы препарировали ткани флоэмы и ксилемы. В ткани, обозначенные как "флоэма", входили камбиальная зона и проводящая флоэма, в ткани, обозначенные как "ксилема" – зоны деления, роста и дифференцировки клеток ксилемы. Отбор образцов контролировали под световым микроскопом. Ткани для анализа отбирали с пяти растений каждой формы березы.

В июле фотосинтезирующие листья являются донорами ассимилятов (сахарозы), основным местом их потребления служат камбиальная зона и дифференцирующаяся ксилема. Транспорт сахарозы контролируется способностью акцепторов к ее расщеплению, что поддерживает градиент дисахарида. В повышении акцепторной силы органа важную роль играют апопластная инвертаза (Koch, 2004; Iraqi et al., 2005; Godt, Roitsch, 2006; Canam et al., 2008; Barratt et al., 2009 и др.) и сахарозосинтаза (Godt, Roitsh, 2006; Coleman et al., 2008; Nilsson et al., 2010 и др.). В зависимости от пути вовлечения сахарозы в метаболизм направленность обменных процессов может быть смещена (1) в сторону формирования клеточных оболочек («сахарозосинтазный путь»), что наблюдается при образовании нормальной по строению древесины, или (2) в сторону синтеза запасных метаболитов («инвертазный путь») и, как следствие, усиленной паренхиматизации ткани, что происходит при формировании узорчатой древесины.

В ксилеме контрольных растений обычной березы в период камбиального роста отмечена высокая активность СС (9 мкмоль/г сырой ткани), в то время как активность АпИнв здесь не превышала 1 мкмоль/г сырой ткани (рис. 64). Во флоэме, наоборот, основным ферментом, расщепляющим сахарозу, была инвертаза клеточной стенки, активность которой достигала ~ 24 мкмоль/г сырой ткани. При этом активность СС была в 100 раз меньше (около 0.2 мкмоль/г сырой ткани) (рис. 64).

У контрольных растений карельской березы активность СС в ксилеме была ниже, по сравнению с обычной березой, и составила 6.5 мкмоль/г сырой ткани. При этом наблюдалась высокая активность АпИнв, значения которой (12 мкмоль/г сырой ткани) превосходили таковые у обычной березы ~ в 12 раз (рис. 64). Еще одна особенность карельской березы – активность АпИнв в ксилеме была ~ в 2 раза выше, чем активность СС. Во флоэме контрольных растений карельской березы, по сравнению с обычной

березой, наблюдалась высокая активность как СС (0.7 мкмоль/г сырой ткани), так и АПИИв (54 мкмоль/г сырой ткани) (рис. 64).

У обычной березы имеет место интенсивный отток сахарозы из флоэмы в ксилему, где она расходуется на формирование клеточных оболочек структурных элементов древесины, а у карельской березы поток сахарозы из флоэмы сильно замедлен, и ее использование в значительной степени происходит во флоэме. Данный вывод находится в соответствии с величиной градиента концентрации сахарозы между флоэмой и ксилемой у двух форм березы. У обычной березы этот показатель ($113.6 \text{ мг/г} - 36.3 \text{ мг/г} = 67.3 \text{ мг/г}$) существенно больше, чем у карельской березы ($48.6 \text{ мг/г} - 47.8 \text{ мг/г} = 1.2 \text{ мг/г}$) (рис. 65).

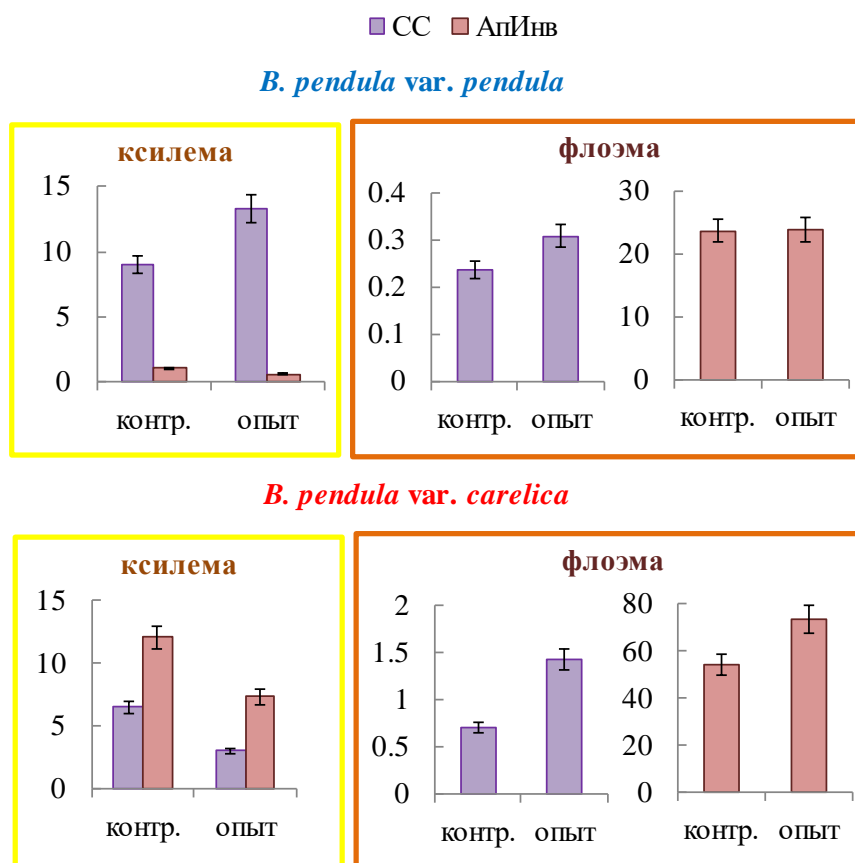


Рисунок 64. Активность сахарозосинтазы (СС) и апопластной инвертазы (АПИИв) (мкмоль расщепившейся сахарозы / г сырой ткани) в ксилеме и флоэме контрольных (контр.) и опытных (опыт) растений обычной (*B. pendula var. pendula*) и карельской (*B. pendula var. carelica*) березы. Числа на диаграммах – средние значения из 5 биологических повторностей. Бары – стандартное отклонение.

Увеличение нитратного азота в почве примерно в 100 раз (рис. 66) приводило к возрастанию его содержания в корнях опытных растений в 8 – 9 раз, по сравнению с контрольными деревьями (рис. 66), что свидетельствует об активном поступлении нитратов из почвы в корни.

У обычной березы внесение нитратов в почву оказало стимулирующее влияние на активность СС в ксилеме и во флоэме (рис. 64). Так, активность СС в ксилеме увеличилась в 1.5 раза (рис. 1). Во флоэме также происходило возрастание активности СС (рис. 64). Активность апопластного фермента у опытных и контрольных растений обычной березы была практически одинаковой (рис. 64).

Многими авторами установлено, что ассимиляция нитратов растением связана с высокой активностью СС (Люленова, 2007; Брускова и др., 2009; Никитин и др., 2010; Gordon et al., 1999, 2002 и др.). Добавление в питательную среду нитрата калия приводило к увеличению активности СС в корнях гороха, что, объясняют стимулирующим действием нитратов на синтез белка СС *de novo* (Брускова и др., 2009; Никитин и др., 2010). В растениях арабидопсиса обнаружено около 40 генов, индуцируемых нитратом, среди них гены, кодирующие ферменты углеводного обмена (Wang et al., 2000; 2003; 2010). Согласно нашим данным, в ксилеме обычной березы увеличение метаболизации сахарозы по сахарозосинтазному пути сопровождается снижением содержания сахарозы во флоэме (до 102.3 мг/г) и ксилеме (до 26.3 мг/г) (рис. 65), при сохранении градиента ее концентрации между тканями на высоком уровне ($102.2 \text{ мг/г} - 26.3 \text{ мг/г} = 75.9 \text{ мг/г}$). Перечисленные изменения показывают, что действие нитратов у обычной березы стимулировало включение сахарозы в сахарозосинтазный путь метаболизации, направленный на формирование клеточных оболочек. Таким образом, у обычной березы нитраты вызвали усиление пути усвоения сахарозы в ксилеме, который у нее преобладал в отсутствие экспериментального воздействия.

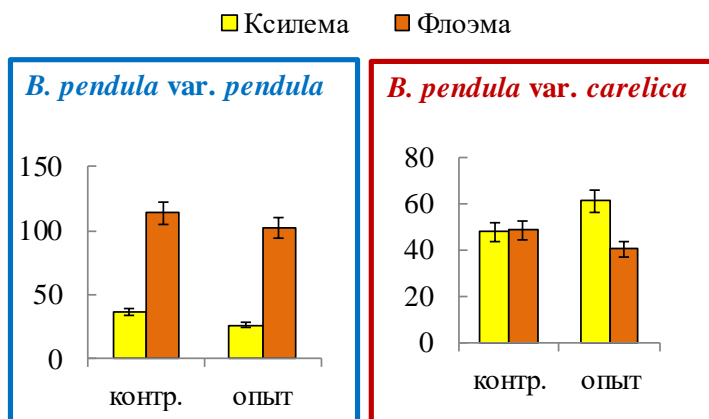


Рисунок 65. Содержание сахарозы (мг на г сухой ткани) в ксилеме и флоэме в контрольных (контр.) и опытных (опыт) растениях обычной (*B. pendula var. pendula*) и карельской (*B. pendula var. carelica*) березы. Числа на диаграммах – средние значения из 5 биологических повторностей. Бары – стандартное отклонение.

У карельской березы при воздействии нитратов наблюдали увеличение активности СС и АпИндв во флоэме (рис. 64) на фоне снижения активности этих ферментов в ксилеме (рис. 64). Внесение в почву нитратного азота не привело к возрастанию активности СС в ксилеме карельской березы, более того активность фермента снизилась, по сравнению с контролем, в 2.2 раза. При этом происходило снижение в 1.7 раза активности АпИндв (рис. 64). Во флоэме, наоборот, обработка экзогенным нитратом привела к увеличению активности СС и АпИндв в 2 и 1.4 раза, соответственно (рис. 64).

У контрольных растений карельской березы количество сахарозы в ксилеме и флоэме было примерно одинаковым (47-48 мг/г), а внесение в почву экзогенного нитрата привело к возрастанию содержания сахарозы в ксилеме (до 61.4 мг/г) и снижению во флоэме (до 40.5 мг/г) (рис. 65). То есть, градиент концентрации сахарозы между флоэмой и ксилемой приобрел отрицательное значение ($40.5 \text{ мг/г} - 61.4 \text{ мг/г} = -20.9 \text{ мг/г}$). Таким образом, метаболизация сахарозы под действием нитратов у карельской березы, как и у обычной березы, усилилась в тех тканях (в данном случае флоэма), где ростовые процессы преобладали до их внесения.

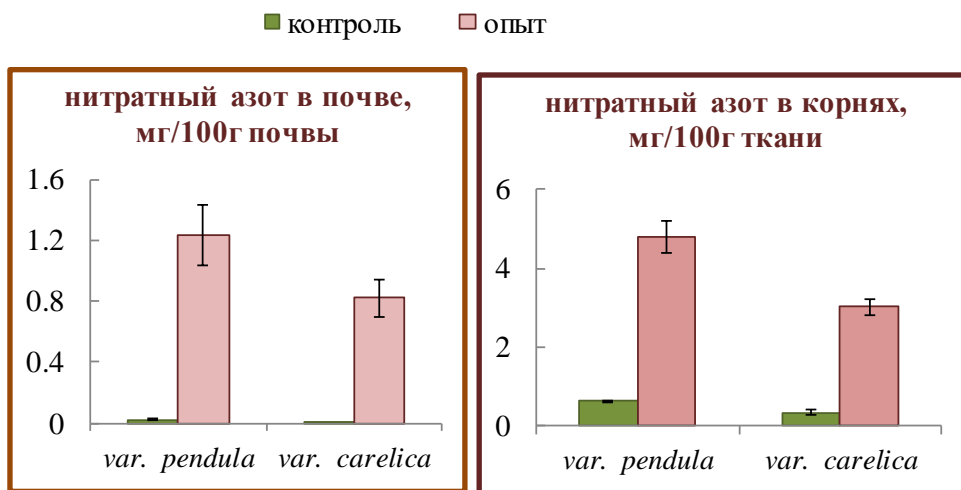


Рисунок 66. Содержание нитратного азота в почве (мг нитратного азота на 100 г почвы) и корнях (мг нитратного азота на 100 г ткани) в контроле и опыте у растений обычной (*var. pendula*) и карельской (*var. carelica*) березы. Числа на диаграммах – средние значения из 5 биологических повторностей. Бары – стандартное отклонение.

Воздействие нитратов у карельской березы приводит к снижению в ксилеме метаболизации сахарозы по инвертазному пути, вызывая уменьшение в ней количества паренхимы, следствием чего становится нормализация строения ткани. Низкий уровень использования сахарозы в ксилеме наблюдался на фоне увеличения ее расщепления во флоэме с помощью АПИИВ, значения которой достигали 73 мкмоль/г сырой ткани (рис. 64), что свидетельствует о существенном выходе сахарозы в апопласт флоэмы. Гексозы, образующиеся в результате расщепления сахарозы в апопласте, не возвращаются назад в ситовидные элементы, а включаются в метаболизм в паренхимных клетках флоэмы. Подобный эффект наблюдали на растениях льна долгунца при повышенной подкормке растений нитратами (Баташева, 2006; Chikov et al., 2003; Chikov, Bakirova, 2004). Авторы предполагают, что продукты неполного восстановления нитрата при участии NO сигнальной системы стимулируют синтез каллозы в ситовидных элементах листа (Баташева и др., 2010; Хамидуллина и др., 2011), что снижает загрузку сахарозы во флоэму и приводит к ее выходу в апопласт, активируя тем самым апопластную инвертазу.

Причина снижения у узорчатых растений карельской березы метаболизации сахарозы в ксилеме под влиянием нитратов не ясна. Наши данные по тканям обычной

березы и по флоэме карельской березы, как и данные литературы (Люленова, 2007; Брускова и др., 2009; Никитин и др., 2010; Gordon et al., 1999, 2002 и др.), показывают, что нитраты стимулируют активность СС. В связи с этим есть основание считать, что снижение активности СС в ксилеме узорчатых растений под влиянием нитратов обусловлено не подавлением экспрессии генов, кодирующих СС, а уменьшением потока сахарозы в ксилему. Последнее может быть вызвано, например, закупоркой каллозой боковых поровых полей в ситовидных элементах и, соответственно, ограничением симпластного потока сахарозы из флоэмы в ксилему. Следствием этого становится разгрузка флоэмы через апопласт и повышение здесь активности АПИИв.

Транспорт и включение в метаболические пути нитратов может регулироваться через гормональные сигнальные пути (Krouk et al., 2011). Цитокинины играют важную роль в реакции растений на нитраты (Werner, Schmölling, 2009; Ruffel et al., 2011), они могут регулировать размер листьев и развитие боковых корней (Rahayu et al., 2005; Walch-Liu et al., 2000; Müller et al. 2015). Цитокинины приводят к увеличению активности нитратредуктазы (Lu et al., 1992; Suty et al., 1993; Vuylsteker et al., 1997a, b; Brenner et al., 2005) – первого фермента, вовлекающего нитрат-анион в метаболизм. Совсем недавно появилась работа, в которой на апикальной меристеме *Arabidopsis* было показано, что растение в течение нескольких дней может адаптировать свой уровень органогенеза к изменениям в почве доступного нитрата (Landrein et al., 2018). Важную роль в реакции растений на нитрат играют цитокинины, в частности, они способствуют развитию бокового корня в местах, богатых NO_3^- , если общая доступность NO_3^- для растения низкая. Растение адаптируется к содержанию нитратов в почве благодаря передаче сигналов дальнего действия с помощью прекурсоров цитокинина, которые проходят через растение, превращаются в активные гормоны в меристеме побегов и модулируют экспрессию *WUSCHEL* – ключевого регулятора гомеостаза ствольных клеток (Landrein et al., 2018).

Результаты проведенного исследования могут быть использованы для объяснения, почему ареал карельской березы не распространяется на 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. отсутствию узорчатой текстуры древесины. 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 предыдущем разделе были представлены данные, показывающие на примере 6-летних растений карельской и обычной березы возможность экспериментальной регуляции нитратом активности СС и АпИнв в период камбиального роста. В естественных условиях произрастания растений карельской березы исследование влияния почвенного плодородия на ферменты метаболизации сахарозы ранее не проводилось. В связи с этим мы поставили перед собой цель выявить почвенные условия, в которых нарушение обмена веществ, проявляющееся в изменении соотношения активности СС и АпИнв, а, следовательно, и проявление узорчатости древесины будет выражено в большей степени.

В почвах доступный растениям азот представлен главным образом в форме NH_4^+ и NO_3^- . Катионы аммония хорошо адсорбируются отрицательно заряженными частицами почвы, меньше вымываются осадками, и поэтому в почвенном растворе их концентрация значительно выше, чем нитратов. 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. Микробные сообщества почв березовых лесов развиваются в условиях постоянного притока доступных ресурсов из листовного опада (Казимиров и др., 1978), что делает интенсивной минерализацию и трансформацию органического вещества. 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. Они плохо фиксируются в почве и легко вымываются почвенными водами в более глубокие слои. Поглощенные нитраты могут включаться в метаболизм растений 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. 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., 1996a; 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, мы изучили активность НР – ключевого фермента ассимиляции нитратов.

Исследование проводили на растениях карельской березы, произрастающих на лесосеменных плантациях в Республике Карелия. Было выделено четыре участка, различающихся по почвенным условиям.

Первый участок занимает 2.6 га, характеризуется нормальными условиями увлажнения. Напочвенный покров представлен *Vaccinium myrtillus*, *Rubus saxatilis*, *Geranium sylvaticum*, *Trientalis europaea*, *Poaceae* spp, *Solidago virgaurea*, *Convallaria majalis*, *Polypodiophyta*, *Anthriscus sylvestris*. Возраст деревьев составил 23 года (рис. 67А).

Второй участок занимает 2 га. Он располагается в низинной части плантации и характеризуется повышенным увлажнением. Напочвенный покров в основном представлен мхом *Polytrichum commune*, а также *Vaccinium vitis-idaea* (rare), *Epilobium angustifolium*. Возраст исследуемых растений 25 лет (рис. 67Б).

Третий участок занимает 0.8 га. Участок имеет всхолмленный сложный рельеф, располагается в низинной части плантации. Имеется много листового опада. Напочвенный покров состоит из *Calluna vulgaris*, *Vaccinium vitis-idaea*, *Pleurozium schreberi*, *Cladonia*. Возраст растений 23 года (рис. 67В).

Четвертый участок занимает 1.2 га. Участок расположен на вершине холма. Органогенный горизонт представлен в основном опадом прошлого года. Напочвенный покров состоит из *Calluna vulgaris*, *Vaccinium vitis-idaea*, мхов (*Pleurozium*, *Polytrichum*) и лишайников (*Cladonia*). Возраст растений 23 года. Растения находились в состоянии угнетения, более 20 % деревьев ослаблены (рис. 67Г).

На каждом участке мы отбирали по 5 растений с узорчатой и безузорчатой структурой древесины. Узорчатые растения отличались между собой по степени проявления узора (рис.4. Д-З).

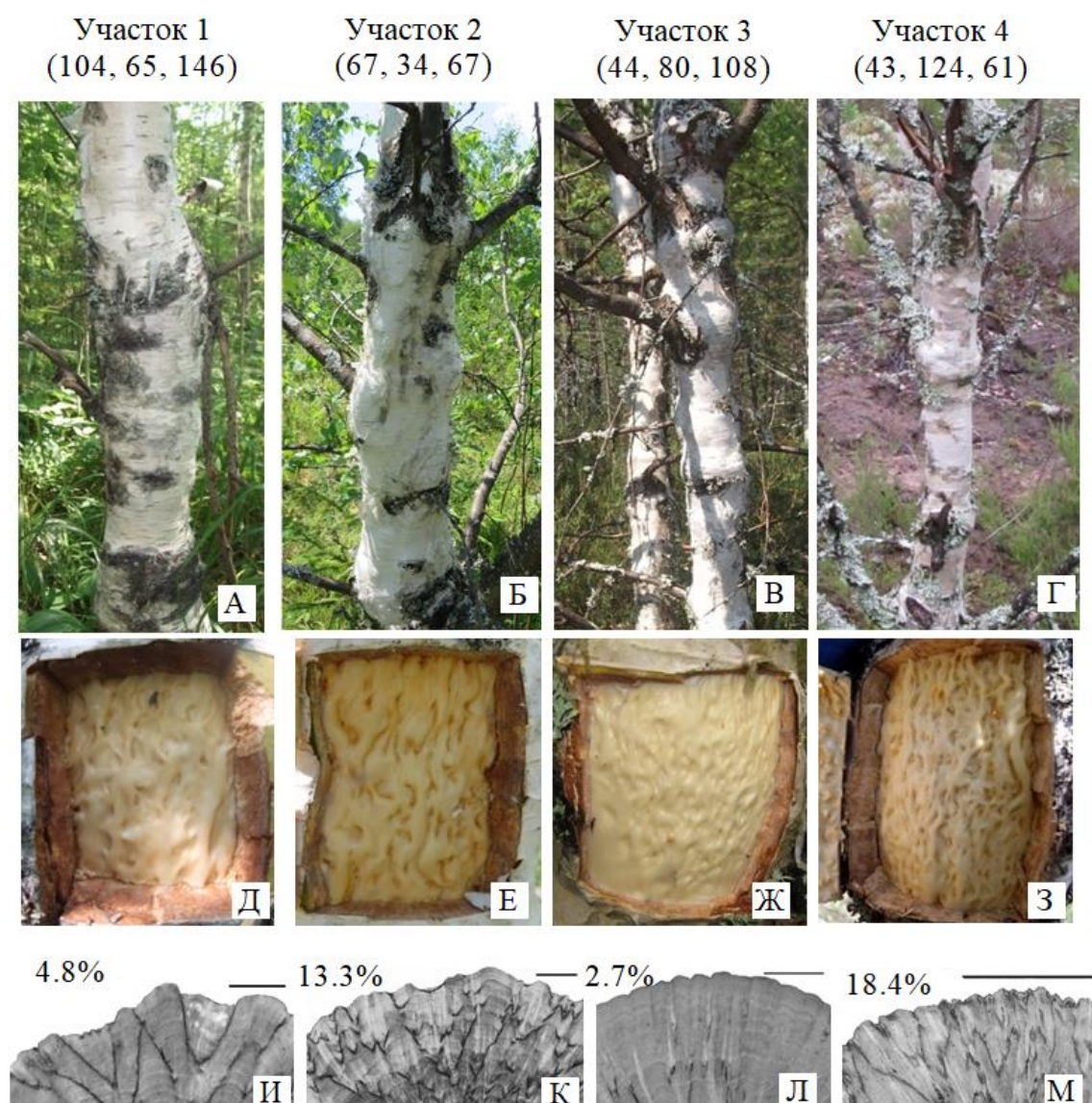


Рисунок 67. Внешний вид (А-Г), окоренная поверхность ствола (Д-З) и поперечные спилы ствола (И-М) деревьев карельской березы, произрастающих на участке 1 (А, Д, И), участке 2 (Б, Е, К), участке 3 (В, Ж, Л) и участке 4 (Г, З, М). В скобках для каждого участка представлены запасы основных элементов питания (N, P, K) в 25 сантиметровом слое почв, кг га⁻¹. Над спилами цифрами указана площадь паренхимных включений (%) в прямоугольнике 5 см² в периферической зоне поперечного спила. Bar – 1 см.

Насыщенность рисунка древесины контролировали на поперечных спилах ствола. Спил шлифовали и фотографировали. Со стороны последних годовичных колец древесины на спиле выбирали участок в виде прямоугольника 2х3 см. Насыщенность рисунка древесины оценивали по площади, которую занимали темные включения (паренхима) в этом прямоугольнике. Измерения проводили с помощью программы Морфология 5 (Видеотест, Россия). Площадь паренхимных включений представлена в процентах от площади выделенного прямоугольника (рис. 67. И-М). Эти данные мы рассматривали как показатель степени паренхиматизации древесины и использовали для оценки степени ее узорчатости. Каждой группе был присвоен балл от 0 до 3. К первой группе (0 баллов) относились безузорчатые растения, ко второй (1 балл) – узорчатые растения участка 3 (рис. 67 Ж, Л), к третьей (2 балла) – узорчатые растения участка 1 (рис. 67 Д, И) и к четвертой – узорчатые растения участка 2 (рис. 67 Е, К) и участка 4 (рис. 67 З, М).

Отбор образцов проводили в период активного камбиального роста 01-03.07.2016. На анализ отбирали ксилему, куда входили слои ксилемы текущего года, и флоэму, включающую камбиальную зону, проводящую флоэму и некоторую часть непроводящей флоэмы.

6.2.1. Характеристика почвенных условий и потребность березы в элементах минерального питания

Почвы района исследования были названы в соответствии с International classification system of the World Reference Base (IUSS Working Group WRB 2014). Почвенный покров исследованной территории представлен Entic Podzol и Gleyic Podzol. Исследованные участки различались по уровню естественного плодородия, о чем свидетельствуют различия запасов основных элементов питания в корнеобитаемом слое (табл. 7).

Потребность березы в элементах минерального питания зависит от возраста и производительности древостоя и лимитируется почвенными условиями. Наиболее активное потребление элементов минерального питания растениями березы из почвы наблюдается до 30 лет, затем оно резко сокращается. В 25-летнем березняке травном ежегодный вынос основных элементов минерального питания (N, P, K) составляет 74,

8.3, 25 кг га⁻¹ (Базилевич, Титлянова, 2008), а в березняке разнотравном I класса бонитета 120, 77, 12,6 кг га⁻¹ (Ремезов и др., 1959).

Таблица 7. Запасы основных элементов питания (доступных растениям) в 25-сантиметровом слое почв, кг га⁻¹

№ участка	N	P	K
1	104	65	146
2	67	34	67
3	44	80	108
4	43	124	61

Из представленных данных можно заключить что, участок 1 (почва дерново-средне-подзолистая, супесчаная, каменистая, Entic Podzol) относится к норме по запасам подвижных форм основных элементов питания; участок 2 (почва торфянисто-подзолисто-глееватая супесчаная, Gleyic Podzol) характеризуется пониженным уровнем доступного азота и снижением минерализации в условиях увлажнения; участок 3 и участок 4 (почва поверхностно-подзолистая песчаная, Entic Podzol) – дефицит азота на фоне повышенного фосфора, особенно участок 4.

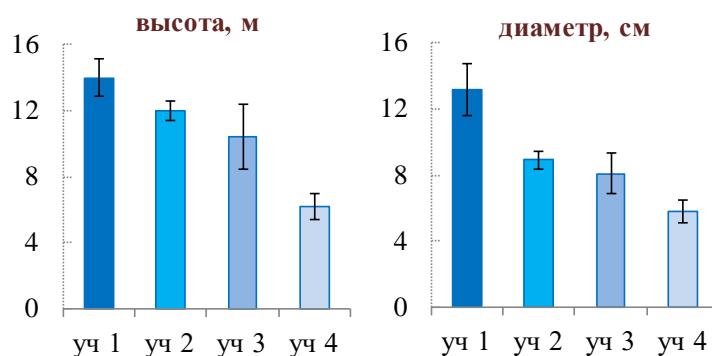
6.2.2. Морфологическая характеристика растений

Безузорчатые растения карельской березы на участке 1 имели самые большие диаметр и высоту. У растений на участке 2, по сравнению с участком 1, уменьшается высота в 1.2 раза ($p=0.007$) и диаметр ствола в 1.5 раза ($p=0.001$). Растения участка 3 по высоте и диаметру ствола достоверно не отличались от растений участка 2. Растения, произрастающие на участке 4, были в 1.7 раза ниже ($p=0.007$) и в 1.4 раза тоньше ($p=0.005$), по сравнению с растениями участка 3 (рис. 68).

Узорчатые растения участка 1 и участка 2 были в 1.4 раза толще растений участка 3 и участка 4 ($p=0.001$) (рис. 68). Растения участка 1 были выше растений участка 2 ($p=0.003$) (рис. 68). Насыщенность текстуры древесины карельской березы зависит от количества включений паренхимы, которые создают на спилах характерный узор. У растений участка 2 и участка 4 степень паренхиматизации (13.3% и 18.4% соответственно), а, следовательно, и степень узорчатости древесины, были выше, по сравнению с растениями участка 1 и участка 3 (рис. 67). Растения участка 4, по

сравнению с растениями участка 2, были ниже и имели меньший диаметр (рис. 68). У растений участка 3 узорчатость древесины была самая слабая (рис. 67 Ж, Л). Эти растения по высоте не отличались от растений участка 2, но были тоньше их (рис. 5). Таким образом, безузорчатые растения по высоте и/или диаметру были больше, чем узорчатые растения с того же участка. Снижение плодородия почвы коррелировало с уменьшением морфологических размеров растений.

Безузорчатые растения



Узорчатые растения

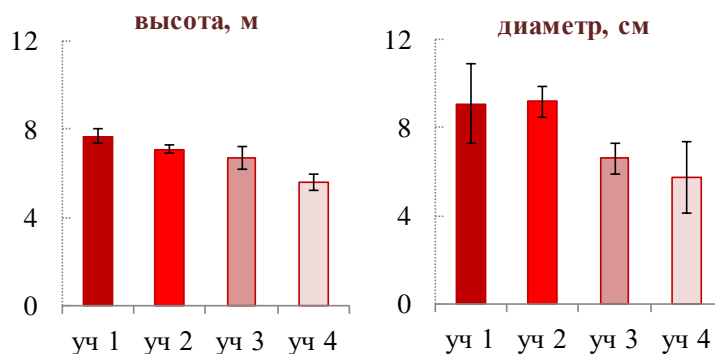


Рисунок 68. Морфологические характеристики (диаметр ствола на высоте 1.3 м, см и высота ствола, м) безузорчатых и узорчатых растений карельской березы, произрастающих на разных по уровню плодородия почвы участках (уч. 1-4).

6.2.3. Снижение плодородия почвы уменьшает метаболизацию сахарозы сахарозосинтазой при формировании нормальной по структуре древесины березы

У безузорчатых растений, не испытывающих недостатка в доступном азоте (участок 1), активность СС в зоне роста и дифференциации ксилемы была самая высокая и достигала 143 мкмоль/мг белка (рис. 69). Растения характеризовались самыми большими диаметром и высотой ствола (рис. 68). Это согласуется с полученными ранее

данными, которые демонстрируют ключевую роль СС в метаболизации сахарозы в камбиальной зоне березы при формировании ксилемы с нормальной структурой (глава 3). У растений, произрастающих на участке 1, активность НР в ксилеме составила 229 нмоль/мг белка и была намного выше, чем во флоэме (5 нмоль/мг белка) (рис. 70). Высокая активность НР свидетельствует о том, что безузорчатые растения на участке 1 не испытывали недостатка в доступном азоте.

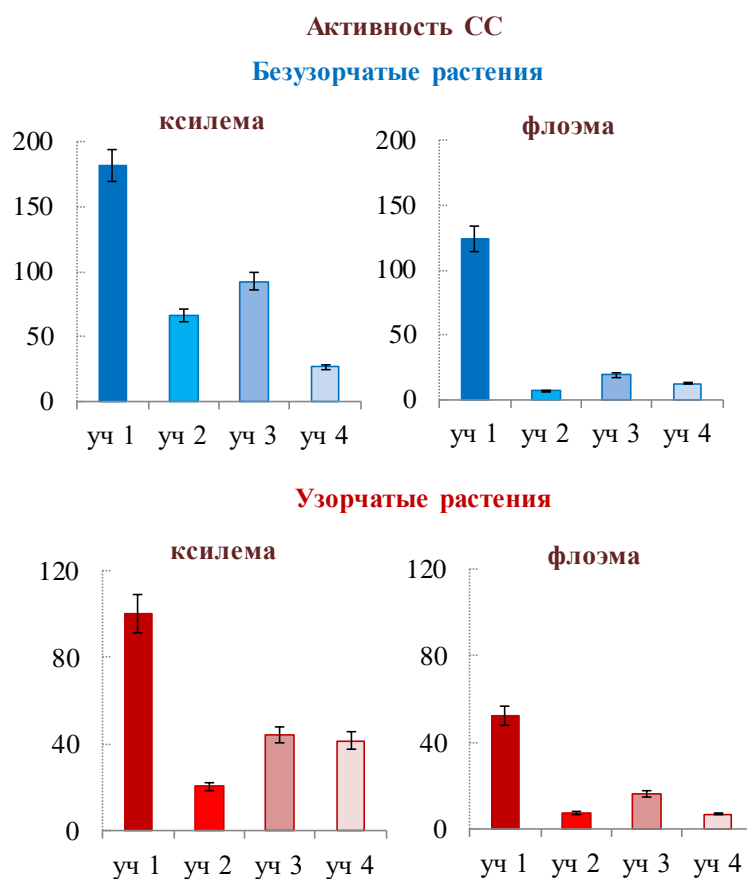


Рисунок 69. Активность сахарозосинтазы (СС) (нмоль образовавшейся сахарозы на мг белка) в ксилеме и флоэме безузорчатых и узорчатых растений карельской березы, произрастающих на разных по уровню плодородия почвы участках (уч. 1-4).

Снижение уровня азота в почве на участке 2 привело к снижению ассимиляции нитратов в ксилеме. Так, у безузорчатых растений активность НР в ксилеме снизилась до 30 нмоль/мг белка, во флоэме не изменилась (рис. 70). Известно, что доступность азота – общий лимитирующий фактор для роста и развития деревьев. Почвы на участке

2 полугидроморфные с периодическим избыточным увлажнением, в этих условиях затруднена минерализация азота (Razgulin, 2012, 2014; Devito et al., 1999) и NH_4^+ становится основным источником доступного азота. В условиях снижения подвижных форм азота в почве древесные растения активно участвуют в образовании микоризы, повышая тем самым поступление азота в форме аммония (Suarez et al., 2002; Castro-Rodriguez et al., 2017). Во многих работах было показано, что присутствие NH_4^+ в питательном растворе может ингибировать поступление NO_3^- (Forde, Clarkson 1999) и снижать активность НР (Geiger et al., 1999; Matt et al., 2001). Возможно, на участке 2 снижается поступление нитратного азота, что отражается в снижении ассимиляции нитратов в ксилеме. Снижение активности НР в ксилеме безузорчатых растений сопровождается снижением в 2.1 раза активности СС (67 мкмоль/мг белка) (рис. 69). При этом уменьшаются морфологические параметры растения (рис. 68).

6.2.4. Возрастание нитратредуктазной активности может увеличивать активность сахарозосинтазы

У безузорчатых растений, произрастающих при дефиците азота (участки 3 и 4), наблюдалась самая высокая активность НР в ксилеме (585 и 247 нмоль/мг белка) и во флоэме (26 и 60 нмоль/мг белка) (рис. 70). В связи с этим возникает вопрос: почему у растений, растущих на почвах с сильным дефицитом азота (участки 3, 4), активность НР в ксилеме возрастает? В почвах участков 3 и 4 увеличивается количество подвижного фосфора (табл. 7). Соотношение P/N в почве составило 4.8 и 6.6 для участков 3 и 4 соответственно. Известно, что влияние микоризообразования на активность НР зависит от фосфатного питания (Oliver et al., 1983). При высоких концентрациях P в почве образование микоризы, как правило, подавляется (Johansen et al., 1994). Установлен отрицательный эффект фосфора в условиях пониженной доступности азота на образование микоризы. Показано, что для оптимизации скорости микоризообразования необходимо поддерживать отношение P: N около 3 (Brun et al., 1995).

Повышение активности НР указывает на возрастание поступления нитратов, особенно у растений участка 3. Нитрат-анион, являясь сигнальной молекулой, может непосредственно влиять на экспрессию генов, связанных углеводным обменом (Kaiser, Huber, 2001). Нитраты могли привести к увеличению в ксилеме активности СС у

растений участка 3, по сравнению с участком 2 (рис. 69). В ксилеме растений с участка 3 активность СС была выше (90 мкмоль/мг белка), чем у растений с участка 2. Увеличение активности СС у растений, растущих на нитратном питании, не раз отмечалось в литературе (Raab, Terry, 1995; Никитин, Измайлов, 2016). Вероятно, поэтому безузорчатые растения участка 3 не отличались по морфологическим характеристикам от растений участка 2 (рис. 68).

Самая низкая активность СС (37 мкмоль/мг белка) наблюдалась у растений с участка 4 (рис. 69). При этом эти растения были существенно ниже и имели меньший диаметр (рис. 68). Активность СС во флоэме в период активного камбиального роста была в 3-10 раз меньше, чем в ксилеме (рис. 69).

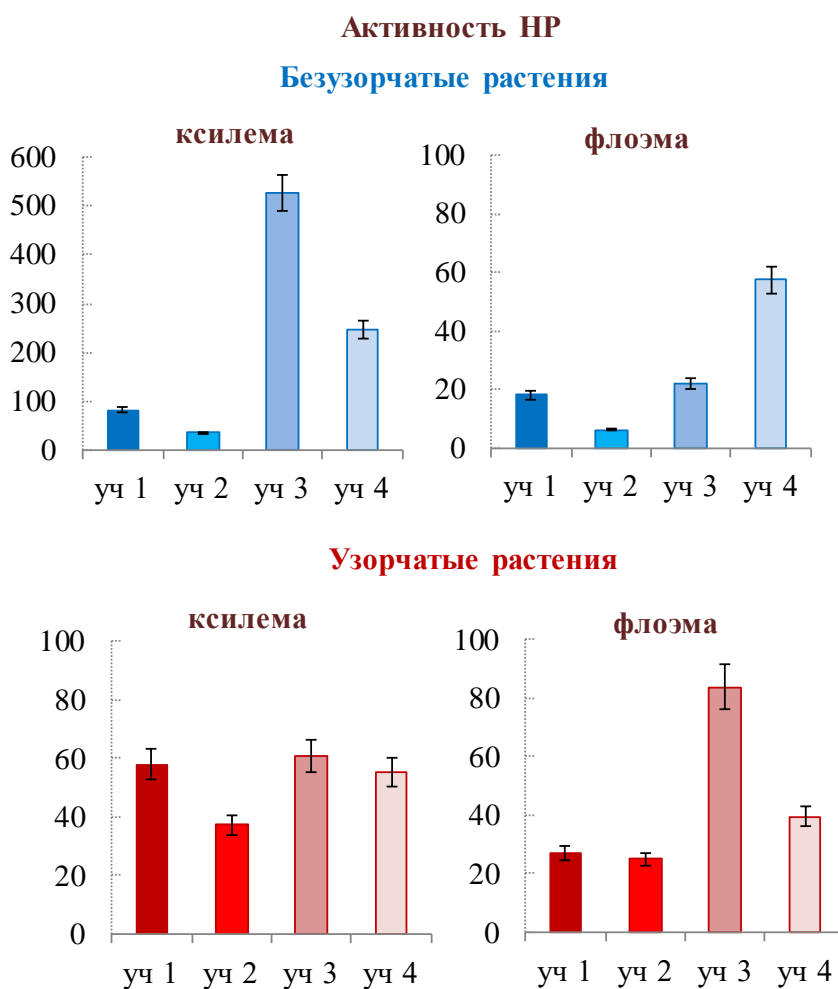


Рисунок 70. Активность нитратредуктазы (НР) (мкмоль образовавшегося нитрита на мг белка) в ксилеме и флоэме безузорчатых и узорчатых растений карельской березы, произрастающих на разных по уровню плодородия почвы участках (уч. 1-4).

6.2.5. Снижение подвижного азота в почве увеличивает метаболизацию сахарозы по апопластному пути у узорчатых растений карельской березы

Самый лучший узор на фоне активного роста ксилемы формировался у растений с участка 2 (рис. 67 Е, К). У этих растений в древесине было больше темноокрашенных включений, образующихся в результате паренхиматизации тканей ствола. Формирование узорчатой древесины протекает на фоне повышенной активности АпИInv во флоэме (рис. 71). Если у безузорчатых растений активность АпИInv во флоэме (7-8 мкмоль/г сырой ткани) не отличалась у растений, произрастающих на разных по уровню плодородия участках, а в ксилеме в период активного камбиального роста была в 5-15 раз меньше, чем во флоэме, и колебалась в диапазоне 0.5-1.5 мкмоль/г сырой ткани, то во флоэме узорчатых растений участка 2 значение ее достигало 57 мкмоль/г сырой ткани (рис. 71).

Взаимосвязь между активностью АпИInv и почвенными условиями может быть следующей. У узорчатых и безузорчатых растений участка 2 происходит снижение активности СС (рис. 69) на фоне снижения подвижного азота в почве (табл. 7) и активности НР в тканях ствола (рис. 70). У узорчатых растений, по сравнению с безузорчатыми, выше использование сахарозы в стволе за счет увеличения активности АпИInv (рис. 71). Наличие этого компенсаторного механизма является особенностью узорчатых растений: 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 (глава 3). Из апопласта гексозы поступают в клетку, где могут расходоваться на пополнение пула УДФ-глюкозы, необходимого для синтеза полисахаридов клеточных стенок (Amor et al., 1995; Gerber et al., 2014; Barratt et al., 2009; Koch, 2004; Coleman et al., 2009; Haigler et al., 2001; Bieniawska et al., 2007). Так, узорчатые растения участка 2 не отличаются по морфологическим параметрам от узорчатых растений участка 1 и не отличаются по высоте от безузорчатых растений участка 2 (рис. 68). С другой стороны, гексозы индуцируют реакции запасного метаболизма (Smeekens, 2000; Koch, 2004; Rolland et al., 2006), что ведет к увеличению количества запасных веществ и сопровождается усилением паренхиматизации ксилемы у растений участка 2 (рис. 67 Е, К), по сравнению с растениями участка 1 (рис. 67 Д, И).

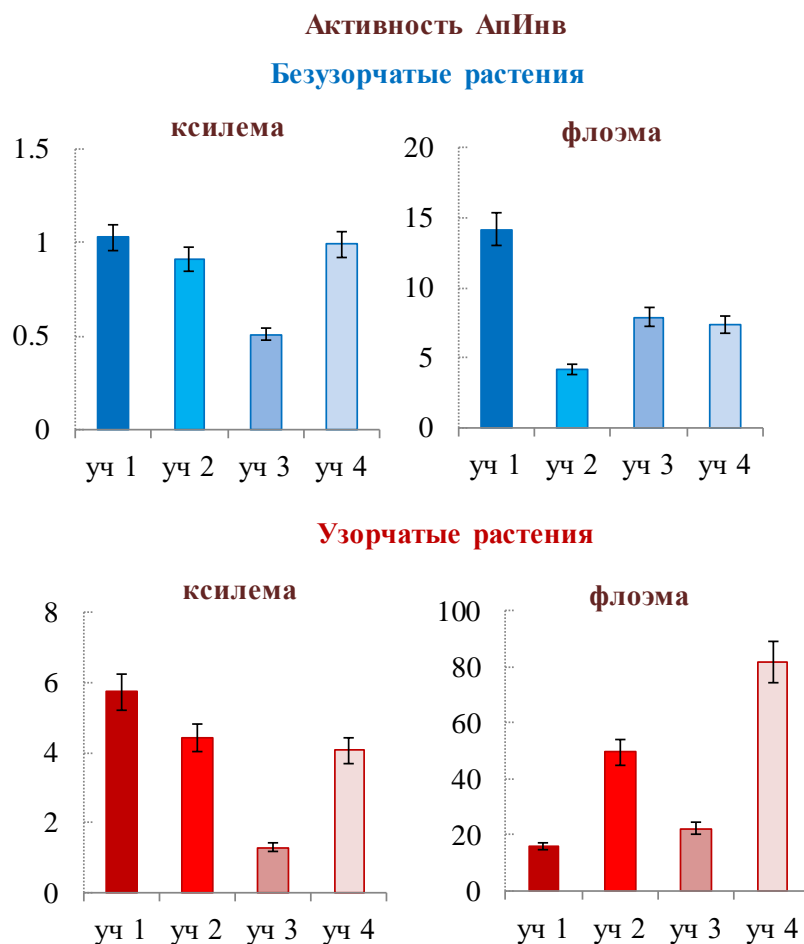


Рисунок 71. Активность апопластной инвертазы (АпИInv) (мкмоль распавшейся сахарозы на г сырой ткани) в ксилеме и флоэме безузорчатых и узорчатых растений карельской березы, произрастающих на разных по уровню плодородия почвы участках (уч. 1-4).

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 параметрами.

6.2.6. Возрастание нитратредуктазной активности отрицательно влияет на формирование узорчатой древесины у растений карельской березы

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) (рис. 70). Формирование ксилемы у них идет на фоне высокой активности СС (70 мкмоль/мг белка) (рис. 69), в результате растения имеют высокие таксационные параметры (рис. 68). Повышение метаболизации сахарозы по СС-пути уменьшает ее метаболизацию с участием инвертазы. Активность АпИнв 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) (рис. 71). В итоге у растений участка 1, по сравнению с растениями участка 2, меньше степень паренхиматизации древесины (рис. 67 Д, И), и, следовательно, она имеет меньшую насыщенность узора.

При дефиците доступного азота в почве на фоне увеличения содержания фосфора у узорчатых и безузорчатых растений карельской березы в тканях ствола возрастает ассимиляция нитратов НР. Нитрат может быть 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 усилению конкуренции между двумя процессами, для которых необходимо большое количество фотоассимилятов, а именно, между ростом дерева и формированием узорчатой текстуры древесины за счет увеличения в ней количества паренхимы. 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) (рис. 69). При этом метаболизация сахарозы по инвертазному пути у них понижена до 22 мкмоль/мг ткани (рис. 71). Это приводит к тому, что растения участка 3 не отличаются по высоте и диаметру ствола от растений участка 2 (рис. 68), но у них формируется древесина со слабым узором (рис. 67 Ж, Л). Во втором случае (участок 4) узорчатые растения формируются на фоне высокой активности АпИнв во флоэме (65 мкмоль/г ткани) (рис. 71). В итоге у них снижаются морфологические параметры (рис. 5), и возрастает степень узорчатости древесины (рис. 67 З, М).

Таким образом, большое влияние на проявление признака узорчатости древесины у карельской березы оказывает доступность подвижного азота в почве. В условиях нормального обеспечения азотом (~80-100 кг/га) формирование узора идет на фоне

интенсивного камбиального роста (высокие активность СС и АпИнв в ксилеме и активность АпИнв во флоэме) (рис. 69, 71). Некоторое снижение плодородия почвы (азот до ~60 кг/га при Р/Н не больше 3) приводит к снижению активности СС на фоне возрастания активности АпИнв и сопровождается увеличением количества темноокрашенных включений в древесине (рис. 67 Е, К). При этом морфологические показатели растений не изменяются (рис. 68). При сильном дефиците подвижного азота в почве на фоне увеличения содержания фосфора возрастает ассимиляция нитратов в тканях ствола (рис. 70). При этом усиливается конкуренция за фотоассимиляты между формированием в древесине узора (метаболизация сахарозы по апопластному пути во флоэме) и увеличением ее прироста (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.

Показано, что экзогенный нитрат по-разному влияет на активность ферментов метаболизации сахарозы – СС и АпИнв, в ксилеме и флоэме обычной и карельской березы. У обычной березы действие нитратов усиливало использование сахарозы через сахарозосинтазный путь ее метаболизации, результатом чего было увеличение прироста древесины. В ксилеме карельской березы нитраты привели к снижению активности как СС (уменьшение прироста древесины), так и АпИнв (уменьшение количества паренхимы, т.е. нормализация строения древесины). Снижение метаболизации сахарозы в ксилеме происходило на фоне увеличения ее использования во флоэме, где возросла активность обоих ферментов. Выдвинуто предположение, что ограничение ареала карельской березы со стороны плодородных почв может быть обусловлено смещением зоны интенсивного усвоения сахарозы в сторону флоэмы под влиянием высоких доз азотного питания. Следствием этого становится интенсивный рост и паренхиматизация тканей коры, что ведет к появлению грубокорых форм березы повислой.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное исследование позволило выявить молекулярно-генетические закономерности при разных сценариях ксилогенеза древесинных растений. Изучение механизмов ксилогенеза проводили 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 стволовых 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 камбиальном регионе 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 камбиальном регионе, 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 камбиальных производных.

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 камбиальном регионе транскриптов мРНК генов VND6, VND7 и увеличением 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 (*Ces8*, *Ces3*, *Ces7*), кодирующих целлюлозосинтазу. 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 на единицу массы ксилемы. 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 показывают, что уменьшение отношения активности СС/АпИнов коррелирует со степенью развития структурных аномалий в камбиальной зоне березы повислой.

Установлено, что в период камбиального роста регуляция активности АпИнов происходит на посттрансляционном уровне через белковые ингибиторы (CIF). У карельской березы уровень экспрессии генов, кодирующих АпИнов (*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 АпИнов 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 ассимилянты 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 АпИнов, и в клетку в основном поступают образующиеся гексозы, которые в свою очередь запасаются в виде крахмала. В связи с этим, связь повышенной активности АпИнов с транспортерами сахаров 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 стволовых 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 положение экспрессии *CLE41*, что в свою очередь может быть причиной нарушения плоскости деления камбиальных производных. Это согласуется с мнением, что наличие избытка сахаров в камбиальном регионе изменяет пути развития камбиальных производных.

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 АпИнв), подобные тем, которые характерны для взрослых растений. Таким образом, уже на начальных этапах онтогенеза, когда видимые отличия между двумя формами березы повислой еще отсутствуют, 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. 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, ее субстратной обеспеченности в период камбиального роста и уровня экспрессии генов, контролирующих этот процесс,

возможно, позволит получить дополнительную информацию о механизмах анольного 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 (~80-100 кг/га) формирование узора идет на фоне интенсивного роста (высокие активности СС и АпИ_{нв} в ксилеме и активность АпИ_{нв} во флоэме). Некоторое снижение плодородия почвы (азот до ~60 кг/га при Р/Н не больше 3) приводит к снижению активности СС на фоне возрастания активности АпИ_{нв} и сопровождается увеличением количества темноокрашенных включений паренхимы в древесине. В этих условиях морфологические показатели растений не изменяются. При сильном дефиците подвижного азота в почве на фоне увеличения содержания фосфора возрастает ассимиляция нитратов в тканях ствола. При этом 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 распространяется на 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 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 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 запасящей 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 ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алехина Н.Д., Харитонашвили Е.В., Ключикова А.И. Изменение содержания нитрата в растениях пшеницы в зависимости от температурных условий роста // Физиология растений. 1988. Т. 35. № 3. С. 303-311.
2. Алехина Н.Д., Харитонашвили Е.В., Ризнвчевке Г.Ю., Плюснина Т.Ю., Сидоров С.В., Рубин А.Б. Регуляция метаболизма нитрата с участием системы поликомпартаментации аниона в корнях растений // Биофизика. 2000. Т. 45. № 3. С.532-541.
3. Антонова Г. Ф. Формирование ксилемы и флоэмы хвойных // Структурные и функциональные отклонения от нормального роста и развития растений под воздействием факторов среды: материалы международной конференции (Петрозаводск, 20-24 июня 2011 г.). Петрозаводск, 2011. С. 6-11.
4. Антонова Г.Ф. Рост клеток хвойных. Новосибирск: Сибирская издательская фирма «Наука» РАН, 1999. 232 с.
5. Аринушкина Е. В. Руководство по химическому анализу почв. М.: Изд-во МГУ, 1970. 488 с.
6. Базилевич Н.А., Титлянова А.А. Биотический круговорот на пяти континентах: азот и зольные элементы в природных наземных экосистемах. Новосибирск: Изд-во Сибирского отделения РАН., 2008. 376 с.
7. Барильская Л.А. Сравнительный структурный анализ древесины березы повислой и карельской березы. Дис. на соискание уч. ст. к.б.н. Петрозаводск, 1978.
8. Барильская Л.А. Структурный анализ узорчатой древесины карельской березы // Ботанический журнал. 1978. Т. 63. №6. С. 805-811.
9. Барильская Л.А., Ахтио И.Т. Особенности строения коры березы карельской // Проблемы комплексного использования древесины и охраны природы. Петрозаводск, 1981. С. 4-5.
10. Баташева С.Н. Нитратный ион в апопласте растения: влияние на фотосинтез и транспорт ассимилятов. Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Казань, 2006. 168 с.
11. Баташева С.Н., Абдрахимов Ф.А., Бакирова Г.Г. и др. Влияние донора оксида азота – нитропруссиды натрия – на фотосинтез и ультраструктуру листовых пластинок льна-долгунца // Физиология растений. 2010. Т. 57. № 3. С. 398-403.

12. Бахмет О.Н. Особенности органического вещества почв в различных ландшафтах Карелии // Лесоведение. 2012. № 2. С. 19-27.
13. Бахмет О.Н.. Особенности органического вещества почв в лесных ландшафтах Карелии // Лесоведение. 2012. Т. 2. С. 19–27.
14. Брускова Р.К., Никитин А.В., Сацкая М.В., Измайлов С. Действие нитрата на активность сахарозсинтазы растений гороха // Физиология растений. 2009. Т. 56. С. 85-91.
15. Ветчинникова Л.В. Карельская береза и другие редкие представители рода *Betula* L. М.: Наука, 2005. 269 с.
16. Галибина Н.А. Клеточная стенка хвои деревьев сосны обыкновенной и ели сибирской в условиях аэротехногенного загрязнения. Автореферат дис ... канд. биол. наук. Петрозаводск, 2003. 19 с.
17. 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.
18. Галибина Н.А., Терехова Е.Н. Физико-химические свойства клеточных стенок тканей ствола деревьев *Betula pendula* Roth // Ученые записки ПетрГУ, сер. естеств. и технич. науки. 2014. № 4 С. 19-25.
19. 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, сер. естеств. и технич. науки. 2013. № 4. С. 7-13.
20. Гамалей Ю.В. Транспортная система сосудистых растений. С-Пб: Изд-во Санкт-Петербургского государственного университета, 2004. 422 с.
21. Германова Н. И., Медведева М. В. Микрофлора почв заповедника "Кивач" // Природа государственного заповедника "Кивач". Труды КарНЦ РАН. Выпуск 10. Петрозаводск: КарНЦ РАН, 2006. С. 10-13.
22. Джамеев В.Ю. Внутриклеточный сигналинг у растений: учебное пособие. Х.: АССА, 2015. 224 с.
23. Додуева И.Е., Ганчева М.С, Осипова М.А., Творогова В.Е., Лутова Л.А. Латеральные меристемы высших растений: фитогормональный и генетический контроль // Физиология растений. 2014. Т. 61. № 5. С. 611-631.

24. Додуева И.Е., Юрлова Е.В., Осипова М.А., Лутова Л.А. СLE-пептиды – универсальные регуляторы развития меристем // Физиология растений. 2012. Т. 59. С. 17–31.
25. Дымова О.В., Гриб И., Головки Т.К., Стржалка К. Состояние пигментного аппарата зимне- и летнезеленых листьев теневыносливого растения *Ajuga reptans* // Физиология растений. 2010. Т. 57. С. 809–818.
26. Евдокимов А.П. Биология и культура карельской березы. Л.: Изд-во Ленинградского университета, 1989. 226 с.
27. Ермаков В.И. Механизмы адаптации березы к условиям севера. Л.: Наука, 1986. 144 с.
28. Измайлов С.Ф. Азотный обмен в растениях. М.: Наука, 1986. 320 с.
29. Казимиров Н. И., Морозова Р. М., Куликова В. К. Органическая масса и потоки веществ в березняках средней тайги. Л.: Наука. 1978. 216 с.
30. Климов С.В., Трунова Т.И., Мокроносов А.Т. Механизм адаптации растений к неблагоприятным условиям окружающей среды через изменение донорно-акцепторных отношений // Физиология растений. 1990. Т. 37. № 5. С. 1024-1035
31. Колесниченко В.М. Динамика содержания и превращения ассимилятов у древесных растений. Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Воронеж. 1985. 22с.
32. Коровин В.В., Новицкая Л.Л., Курносов Г.А. Структурные аномалии стебля древесных растений - 2-е изд М.: МГУЛ, 2003. 280 с.
33. Кретович В.Л. Биохимия растений. - Высш. шк., М., 1986. - 503 с.
34. Курсанов А.Л. Транспорт ассимилятов в растениях. Москва: Наука, 1976. 647 с.
35. Курсанов А.Л., Прасолова М.Ф., Павлинова О.А. Пути ферментативного превращения сахарозы в корне сахарной свеклы в связи с его атрагирующей функцией // Физиология растений. 1989. Т. 36. № 4. С.629-640
36. Лутова Л.А. Современные аспекты генетики развития растений. // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2013. Т. 17. С. 1003-1016.
37. Любавская А.Я. Карельская береза. Москва: Лесная промышленность, 1978. 158 с.
38. Люленова В.В. Регуляция минерального питания, активность сахарозосинтазы, сахарозофосфатсинтазы и накопление сахарозы свекловичным растением. Автореф. дис. ... докт. биол. наук. М., 2007. 33 с.

39. Мамай А. В. Микробная трансформация соединений азота и углерода в лесных почвах средней тайги (на примере Карелии): автореф. дис. ... канд. биол. наук. Москва, 2014. 24 с.
40. Машкина О.С., Табацкая Т.М., Исаков Ю.Н. Клональное размножение березы карельской // Лесн. хоз-во. 2000. № 4. С. 33-34.
41. Медведев С.С., Шарова Е.И. Генетическая и эпигенетическая регуляция развития растительных организмов // Журнал Сибирского федерального университета. Серия: Биология. 2010. Т. 3. № 2. С. 109-129.
42. Мокроносова А.Т. Интеграция функций роста и фотосинтеза // Физиология растений. 1983. Т. 30. №5. С. 868-880
43. Мощенская Ю.Л. Активность сахарозосинтазы в ходе ксилогенеза двух форм *Betula pendula* Roth, отличающихся по текстуре древесины: Автореф. дисс. канд. биол. наук. СПб: БИН РАН, 2017. 24 с.)
44. Никитин А. В., Измайлов С. Ф. Ферменты диссимиляции сахарозы как мишени действия нитрата в раннем онтогенезе гороха посевного // Физиология растений. 2016. том 63, № 1. С. 159–164.
45. Никитин А.В., Брускова Р.К., Измайлов С.Ф. Действие аммония на сахарозосинтазу гороха *Pisum sativum* L. // Физиология растений. 2010. Т. 57. С. 76-80.
46. Николаева Н.Н. Формирование листового аппарата у форм березы повислой (*Betula pendula* Roth) с разной текстурой древесины: Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. СПб: БИН РАН, 2004. 25 с.
47. Николаева Н.Н., Новицкая Л.Л. Структурные особенности ассимиляционного аппарата и формирование аномальной древесины карельской березы // Лесоведение. 2007. № 1. с. 70–73.
48. Новицкая Л.Л. Карельская береза: механизмы роста и развития структурных аномалий. Петрозаводск: Verso, 2008. 144 с.
49. Новицкая Л.Л. О возможной причине формирования структурных аномалий ствола карельской березы // Бот. журн. 1997. Т. 82. № 9. С. 61-66.
50. Новицкая Л.Л., Галибина Н.А., Никерова К.М. Транспорт и запасание сахаров во флоэме *Betula pendula* Roth var. *pendula* и var. *carelica* // Труды Карельского научного центра РАН. 2015. № 11. С. 35-47.

51. Новицкая Ю.Е. Особенности физиолого-биохимических процессов в хвое и побегах ели в условиях Севера. - Изд-во Наука, Л., 1985. - 116 с.
52. Павлинова О.А. Метаболизм сахарозы и сахаронакопление в корне сахарной свеклы // Физиология и биохимия культурных растений. 1971. Т. 8. № 5. С. 451 – 461.
53. Павлинова О.А., Прасолова М.Ф. О физиологической роли сахарозосинтазы в корне сахарной свеклы // Физиология растений. 1972. Т. 19. С. 920.
54. Ребриков Д.В., Саматов Г.А., Трофимов Д.Ю. и др. ПЦР «в реальном времени». М.: БИНОМ.Лаборатория знаний., 2011. 223 с.
55. Ремезов Н. П. ,Быкова Л. Н. , Смирнова К. М. Потребление и круговорот азота и зольных элементов в лесах Европейской части СССР. Москва: Изд-во Моск. ун-та, 1959. 284 с.
56. Роньжина Е.С., Мокроносов А.Т. Донорно-акцепторные отношения и участие цитокининов в регуляции транспорта и распределения органических веществ в растениях // Физиология растений. 1994. Т. 41. С. 448–459.
57. Соколов Н.О. Карельская береза. Петрозаводск: Изд-во Карело-финской ССР, 1950. 116 с.
58. Софронова Г.И. Фенологические исследования // Физиолого-биохимические основы роста и адаптации сосны на Севере. Л.: Наука, 1985. С. 5 - 12.
59. Судачкова Н.Е. Метаболизм хвойных и формирование древесины. Новосибирск: Наука, 1977. 230 с.
60. Тарчевский И.А., Иванова А.П., Биктемиров У.А. Транспорт ассимилятов и отложение веществ в запас у растений. Владивосток. 1973. С. 174-178.
61. Федорков А.Л. Адаптация хвойных пород к бореальному климату Северной Европы // Лесоведение. 2007. № 3. С. 46–51.
62. Хамидуллина Л.А., Абдрахимов Ф.А., Баташева С.Н., Фролов Д.А., Чиков В.И. Влияние введения нитратов в апопласт побега на фотосинтез и транспорт ассимилятов у симпластных и апопластных растений // Физиология растений. 2011. Т.58. № 3. С. 420-426.
63. Харитонашвили Е.В., Лебедева Г.В., Плюснина Т.Ю., Ризниченко Г.Ю., Алехина Н.Д. Эмпирическая модель регуляции метаболизма нитрата в корнях проростков пшеницы // Физиология растений. 1997. Т. 44. № 4. С. 568-575.

64. Харитонашвили Е.В., Черный С.Г., Алехина Н.Д. Формирование запасного пула нитрата в корнях проростков пшеницы // Физиология растений. 1993. Т. 40. № 3. С. 443-447.
65. Цельникер Ю.Л., Малкина И.С. Баланс органического вещества в онтогенезе листа у лиственных деревьев // Физиология растений. 1986. Т. 33. №5. С. 935-940.
66. Чикина П.Ф. Азотный обмен // Физиолого-биохимические основы роста и адаптации сосны на Севере. Л. Изд-во Наука. 1985. С. 57-82.
67. Чиков В.И. Фотосинтез и транспорт ассимилятов. М.: Наука, 1987. 188 с
68. Чиков В.И., Бакирова Г.Г., Иванова Н.П., Нестерова Т.Н., Чемикосова С.Б. Изменение фотосинтетического метаболизма углерода во флаговом листе пшеницы при подкормке аммиачной и нитратной формой азота // Физиология и биохимия культ. растений. 1998. Т. 30. С. 333-341.
69. Шуляковская Т.А., Ильинова М.К., Репин А.В., Канючкова Г.К., Шредерс С.М. Физиолого-биохимические особенности особей *Betula pubescens* и *B. pendula* (*Betulaceae*) на ранних этапах онтогенеза // Растительные ресурсы. 2010а. Т. 46. №1. С. 57 – 66.
70. Шуляковская Т.А., Репин А.В., Шредерс С.М. Влияние подкормок азотом на развитие саженцев березы повислой и карельской березы // Лесной вестник. 2010б. №1. С. 9 – 14.
71. Шуляковская Т.А., Репин А.В., Шредерс С.М. Динамика накопления азотосодержащих соединений в сеянцах *Betula pendula* и *B. pendula* var. *carelica* (*Betulaceae*) в течение вегетационного периода // Растительные ресурсы. 2011. № 3. С. 81 – 87.
72. Эверт Р. Фю анатомия растения Эзаю Меристемы, клетки и ткани растений: строение, функции и развитие. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2015. 600с.
73. Albrecht G. Mustraph A. Localization of sucrose synthase in wheat roots: increased in situ activity of sucrose synthase correlates with cell wall thickening by cellulose deposition under hypoxia // Planta. 2003. Vol. 217. P. 252-260.
74. Alekhina N.D., Kharitonashvili E.V., Riznichenko G.Yu., Plyusnina T.Yu., Rubin A.B., Sidorov S.V. A Model of nitrate metabolism regulation through anion polycompartmentation in plant roots // Биофизика. 2000. Т. 45. С. 532-541.
75. Ameglio T., Bodet c., Lacoainte A., Cochard H. Winter embolism, mechanisms of xylem hydraulic conductivity recovery and springtime growth patterns in walnut and peach trees // Tree Physiology. Vol. 22. P. 1211-1220.

76. Amor Y., Haigler C.H., Johnson S., Wainscott M., Delmer D.P. A membrane - associated from of sucrose synthase and its potential role in synthesis of cellulose and callose in plants // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1995. Vol. 92. P. 9353 - 9357.
77. An X., Chen Zh., Wang Jin., Ye M., Ji l., Wang Jia., Liao W., Ma H. Identification and characterization of the *Populus* sucrose synthase gene family // Gene, Vol. 539, 2014. pp. 58–67.
78. Andersen M.N., Asch F., Wu Y., Jensen C.R., Næsted H., Mogensen V.O., Koch K.E. Soluble Invertase expression is an early target of drought stress during the critical, abortion-sensitive phase of young ovary development in maize // Plant Physiology. 2002. Vol. 130. P. 1-14.
79. Andersson-Gunneras S., Mellerowicz E.J., Love J., Segerman B., Ohmiya Y., Coutinho P.M., Nilsson P., Henrissat B., Moritz T., Sundberg B. Biosynthesis of cellulose-enriched tension wood in *Populus*: global analysis of transcripts and metabolites identifies biochemical and developmental regulators in secondary wall biosynthesis // Plant. 2006. Vol. 45. P. 144-165.
80. Azama K., Abe S., Sugimoto H., Davies E. Lysine-containing proteins in maize endosperm: a major contribution from cytoskeleton-associated carbohydrate-metabolizing enzymes. // Planta. 2003. Vol. 217. P. 628-638.
81. Baena-Gonzalez E. Energy signaling in the regulation of gene expression during stress // Molecular Plant. 2010. Vol. 3. P. 300-313.
82. Baena-Gonzalez E., Rolland F., Thevelein J.M., Sheen J. A central integrator of transcription networks in plant stress and energy signaling // Nature. Vol. 448. P. 938-942.
83. Balasubramanian R., Karve A., Kandasamy M. K., Meagher R.B., d Moore B. A role for F-actin in hexokinase-mediated glucose signaling // Plant physiology. 2007. Vol. 145. N 4. P. 1423-1434.
84. Barbier H., Gaudillere J.P., Rothan C. Gene expression profiles in response to nitrogen nutrition in *Vitis vinifera* L. // VII International Symposium on Grapevine Physiology and Biotechnology ISHS Acta Horticulturae L.E. Williams Ed. 2005. Vol. 689. P. 429-434.
85. Barnett J.R., Harris J.M. Early stages of bordered pit formation in radiate pine // Wood Sci. Techn. 1975. Vol. 9. P. 233-241.
86. Baroja-Fernandez E., Munoz F.J., Li J., Bahaji A., Almagro G., Montero M., Etxeberria E., Hidalgo M., Sesma M.T., Pozueta-Romero J. Sucrose synthase activity in the

- sus1/sus2/sus3/sus4 *Arabidopsis* mutant is sufficient to support normal cellulose and starch production // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2012. Vol. 109. P. 321–326.
87. Baroja-Fernández E., Muñoz F.J., Saikusa T., Rodríguez-López M., Akazawa T., Pozueta-Romero J. Sucrose synthase catalyzes the de novo production of ADP-glucose linked to starch biosynthesis in heterotrophic tissues of plants // Plant Cell Physiol. 2003. Vol. 44. P. 500–509.
88. Barratt D.H. P., Barber L., Kruger N.J., Smith A.M., Wang T. L., Martin C. Multiple distinct isoforms of sucrose synthase in pea // Plant Physiol. 2001. Vol. 127. P. 655-664.
89. Barratt D.H., Derbyshire P., Findlay K., Pike M., Wellner N., Lunn J., Feil R., Simpson C., Maule A.J., Smith A.M. Normal growth of *Arabidopsis* requires cytosolic invertase but not sucrose synthase // PNAS. 2009. Vol. 106. P. 13124-13129.
90. Batasheva S. N., Abdrakhimov F. A., Bakirova G. G., Chikov V. I. Effect of nitrates supplied with the transpiration flow on assimilate translocation // Russian Journal of Plant Physiology. 2007. Vol. 54. No. 3. P. 373–380.
91. Baud S., Vaultier M.N., Rochat C. Structure and expression profile of the sucrose synthase multigene family in *Arabidopsis* // Journal of Experimental Botany. 2004. Vol. 55. P. 397-409.
92. Beevers L., Hageman R.H. Nitrate and Nitrite Reduction // The biochemistry of plants. a comprehensive treatise. 1980. Vol. 5. P. 115.
93. Benhamou N., Genier J., Chrispeels, M.J. Accumulation of b-fructosidase in the cell walls of tomato roots following infection by a fungal wilt pathogen // Plant Physiol. 1991. Vol. 97. P. 739-750.
94. Betsuyaku S., Takahashi F., Kinoshita A., Miwa H., Shinozaki K., Fukuda H., Sawa S. Mitogen activated protein kinase regulated by the clavata receptors contributes to shoot apical meristem homeostasis // Plant Cell Physiol. 2011. Vol. 52. P. 14-29.
95. Bieniawska Z., Barratt D.H., Garlick A.P., Thole V., Kruger N.J. , Martin C., Zrenner R. Analysis of the sucrose synthase gene family in *Arabidopsis* // Plant J. 2007. Vol. 49. P. 810–828.
96. Blasing O.E., Gibon Y., Gunther M., Hohne M., Morcuende R., Osuna D., Thimm O., Usadel B., Scheible W-R., Stitt M. Sugars and circadian regulation make major contributions to the global regulation of diurnal gene expression in *Arabidopsis* //The Plant Cell. 2005. Vol. 17. P. 3257-3281.

97. Bocoock P.N., Morse A.M., Dervinis C. Davis J.M. Evolution and diversity of invertase genes in *Populus trichocarpa* // *Planta*. 2008. Vol. 227. P. 565-576
98. Bolouri-Moghaddam M.R., Le Roy K., Xiang L., Rolland F., Van den Ende W. Sugar signalling and antioxidant network connections in plant cells // *FEBS Journal*. 2010. Vol. 277. P. 2022-2037.
99. Bonke M., Thitamadee S. Mahonen A.P. Hauser M.T., Helariutta Y. *APL* regulates vascular tissue identity in *Arabidopsis* // *Nature*. 2003. Vol. 426. P. 181-186.
100. Borisjuk L., Rolletschek H., Wobus U., Weber H. Differentiation of legume cotyledons as related to metabolic gradients and assimilate transport into seeds // *Journal of Experimental Botany*. 2003. Vol. 54. P. 503-512.
101. Borisjuk L., Walenta S., Rolletschek H., Mueller-Klieser W., Wobus U., Weber H. Spatial analysis of plant development: sucrose imaging within *Vicia faba* cotyledons reveals specific developmental patterns // *The Plant Journal*. 2002. Vol. 29. P 521-530.
102. Borisjuk L., Walenta S., Weber H., Mueller-Klieser W., Wobus U. High resolution histographical mapping of glucose concentration in developing cotyledons of *V. faba* in relation to mitotic activity and starch accumulation: glucose as a possible developmental trigger // *The Plant Journal* 1998. Vol. 15. P. 583-591.
103. Botha C.E.J., Cross R.H.M. Towards reconciliation of structure with function in plasmodesmata – Who is the gatekeeper? // *Micron*. 2000. Vol. 31. P. 713–721.
104. Bracho G.E., Whitaker J.R. Purification and partial characterization of potato (*Solanum tuberosum*) invertase and its endogenous proteinaceous inhibitor // *Plant Physiol*. 1990. Vol. 92. P. 386-394.
105. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding // *Anal biochem*. 1976. Vol. 72. P. 248 – 254.
106. Brenner, W.G. Romanov G.A., Kollmer I., Burkle L., Schmulling T. Immediate-early and delayed cytokinin response genes of *Arabidopsis thaliana* identified by genome-wide expression profiling reveal novel cytokinin-sensitive processes and suggest cytokinin action through transcriptional cascades // *Plant J*. 2005. Vol. 44. P. 314-333.

107. Brun A., Chalot M., Finlay R. D., Soderstrom B. Structure and function of the ectomycorrhizal association between *Paxillus involutus* (Batsch) Fr and *Betula pendula* Roth. I. Dynamics of mycorrhiza formation. *New Phytologist*. 1995. Vol. 129. P. 487-493.
108. Caba, J.M. Centeno M.L., Fernáandez B., Gressho P.M., Ligeró F. Inoculation and nitrate alter phytohormone levels in soybean roots: differences between a supernodulating mutant and the wild type // *Planta*. 2000. Vol. 211. P. 98-104.
109. Campbell W.H. Nitrate reductase structure, function and regulation: Bridging the gap between biochemistry and Physiology // *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 1999. Vol. 50. P. 277-303.
110. Canam T., Mak S. W. Y., Mansfield S.D. Spatial and temporal expression profiling of cell-wall invertase genes during early development in hybrid poplar // *Tree Physiology*. 2008. Vol. 28. P. 1059–1067.
111. Carlson S.J., Chourey P.S. A re-evaluation of the relative roles of two invertases, INCW2 and IVR1 in developing maize kernels and other tissues // *Plant Physiol*. 1999. Vol. 121. P. 1025-1035.
112. Carlson S.J., Chourey P.S., Chourey P.S. Evidence for plasma membrane-associated forms of sucrose synthase in maize // *Mol. Gen. Genet*. 1996. Vol. 252. P. 303-310.
113. Castro-Rodríguez V., Cañas R.A., de la Torre F.N., Pascual M.B., Avila C., Cánovas F.M. Molecular fundamentals of nitrogen uptake and transport in trees // *Journal of Experimental Botany* // 2017. Vol. 68. P. 2489-2500.
114. Chen Ch., Yuan Yu., Zhang Ch., Li H., Ma F., Li M. Sucrose phloem unloading follows an apoplstic pathway with high sucrose synthase in *Actinidia* fruit // *Plant Sci*. 2017. Vol. 255. P. 40-50.
115. Chen J.G., Cheng S.H., Cao W., Zhou X. Involvement of endogenous plant hormones in the effect of mixed nitrogen source on growth and tillering of wheat // *J. Plant Nutr*. 1998. Vol. 21. P. 87-97.
116. Chen L-Q., Qu X-Q., Hou B-H., Sosso D., Osorio S., Fernie A.R., Frommer W.B. Sucrose efflux mediated by SWEET proteins as a key step for phloem transport // *Science*. 2012. Vol. 335. P. 207-211.
117. Chen X.Y., Kim J.Y. Callose synthesis in higher plant // *Plant. Signal. Behav*. 2009. Vol. 4. P. 489-492.

118. Chen Z., Gao K., Su X., Rao P., An X. Genome-wide identification of the invertase gene family in *Populus* // PLoS ONE. 2015. Vol. 10(9). e0138540.
119. Cheng C.L., Acedo G.N., Cristinsin M., Conkling M.A. Sucrose mimics the light induction of *Arabidopsis* nitrate reductase gene transcription // Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 1992. Vol. 89. № 5. P. 1861-1864.
120. Cheng S.H., Willmann M.R., Chen H.C., Sheen J. Calcium signaling through protein kinases. The *Arabidopsis* calcium-dependent protein kinase gene family // Plant Physiol. 2002. Vol. 129. P. 469-485.
121. Cheng W-H., Taliercio E.W., Chourey P.S. Sugars modulate an unusual mode of control of the cell-wall invertase gene (*Incw1*) through its 3' untranslated region in a cell suspension culture of maize // PNAS. 1999. Vol. 96. P. 10512-10517.
122. Chikano H., Ogawa M., Ikeda Y., Koizumi N., Kusano T., Sano H. Two novel genes encoding SNF-1 related protein kinases from *Arabidopsis thaliana*: differential accumulation of AtSR1 and AtSR2 transcripts in response to cytokinins and sugars, and phosphorylation of sucrose synthase by AtSR2 // Mol. Gen. Genet. 2001. V. 264. P. 674-681.
123. Chikov V., Bakirova G. Relationship between Carbon and nitrogen metabolism in photosynthesis. The role of photooxidation processes // Photosynthetica. 1999. V. 37. P. 519-527
124. Chikov V.I., Avvakumova N.I., Bakirova G.G., Belova L.A., Zaripova L.M. Apoplastic Transport of ¹⁴C-photosynthates measured under drought and nitrogen supply // Biol. Plant. 2001. Vol. 44. P. 517-521.
125. Chikov V.I., Avvakumova N.Yu., Bakirova G.G. Postphotosynthetic Utilization of Labeled Assimilates in Fiber Flax // Biology Bulletin of the Russian Academy of Sciences. 2003. Vol. 30. P. 377-382.
126. Chikov V.I., Bakirova G.G. Role of the apoplast in the control of assimilate transport, photosynthesis, and plant productivity // Russian Journal of Plant Physiology. 2004. Vol. 51. №. 3. P. 420-431.
127. Cho J.I., Lee S.K., Ko S., Kim H.K., Jun S.H., Lee Y.H., et al. Molecular cloning and expression analysis of the cell-wall invertase gene family in rice (*Oryza sativa* L.) // Plant Cell Rep. 2005. Vol. 24. P. 225-236.

128. Chourey P.S. Genetic control of sucrose synthetase in maize endosperm // Mol. Gen. Genet. 1981. Vol.184. P. 372-376.
129. Chourey P.S., Latham M., Still P.E. Expression of two sucrose synthase genes in endosperm and seedling cells of maize: evidence of tissue-specific polymerization of protomers // Mol. Gen. Genet. 1986. Vol. 203. P. 251–255.
130. Chourey P.S., Taliercio E.W. Epistatic interaction and functional compensation between the two tissue- and cell-specific sucrose synthase genes in maize // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1994. Vol. 91. P. 7917–7921.
131. Claeysen E., Rivoal J. Isozymes of plant hexokinase: occurrence, properties and functions // Phytochemistry. 2007. Vol. 68. P.709-731.
132. Coleman H.D. Up-regulation of sucrose synthase and UDP-glucose pyrophosphorylase impacts plant growth and metabolism // Plant Biotechnol. 2006. Vol. 4. P. 87–101.
133. Coleman H.D., Yan J., Mansfield S.D. Sucrose synthase affects carbon partitioning to increase cellulose production and altered cell wall ultrastructure // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2009. Vol. 106. P. 13118–13123.
134. Coleman, H.D., Samuels, A.L., Guy, R.D. et al. Perturbed lignification impacts tree growth in hybrid poplar- a function of sink strength, vascular integrity, and photosynthetic assimilation // Plant Physiology. 2008. Vol. 148. № 3. P. 1229-1237.
135. Copeland L. Enzymes of sucrose metabolism // Methods Plant Biochem. 1990. Vol. 3. P. 73–85.
136. Coruzzi G., R. Bush D. Nitrogen and carbon nutrient and metabolite signaling in plants // Plant Physiology. 2001. Vol. 125. P. 61–64.
137. Crawford N.M. Nitrate: Nutrient and signal for plant growth // Plant Cell. 1995. Vol. 7. P. 859–868.
138. Crawford, N.M. Mechanisms for nitric oxide synthesis in plants //J. Exp. Bot. 2006. Vol. 57. P. 471–478.
139. Cumbie B. G. Developmental changes in the vascular cambium of *Polygonum lapathifolium* // Am. J. Bot. 1969. Vol. 56. P. 139-146.
140. da-Silva W.S., Gomez-Puyou A., de Gomez-Puyou M.T., Moreno-Sanchez R., De Felice F.G., de Meis L., Oliveira M.F., Galina A. Mitochondrial bound hexokinase activity as a preventive antioxidant defense: steady-state ADP formation as a regulatory mechanism of

- membrane potential and reactive oxygen species generation in mitochondria // *J. Biol Chem* 2004. Vol. 279. P. 39846-39855.
141. Daudet F.A., Amerglia T., Cochard H., Archilla O., Lacoïnte A. Experimental analysis of the role of water and carbon in tree stem diameter variations // *Journal of Experimental Botany*. 2005. Vol. 56. No. 409. P. 135–144.
142. Davies C., Robinson S.P. Sugar accumulation in grape berries. Cloning of two putative vacuolar invertase cDNAs and their expression in grapevine tissues // *Plant Physiol*. 1996. Vol. 11. P. 275-283.
143. Davis J.D., Evert R.F. Seasonal development of the secondary phloem in *Populus tremuloides* // *Bot. Gaz*. 1968. Vol. 129. P. 1-8.
144. Dean J.V., Harper J.E. The conversion of nitrite to nitrogen oxide(s) by the constitutive NAD(P)H-nitrate reductase enzyme from soybean // *Plant Physiology*. 1988. Vol. 88. P. 389-395.
145. Dejardin A., Rochat C., Maugenest S., Boutin J.P. Purification, characterization and physiological role of sucrose synthase in the pea seed coat (*Pisum sativum* L.) // *Planta*. 1997. Vol. 201. P. 128-137.
146. Delmer D.P., Amor Y. Cellulose biosynthesis // *The Plant Cell*. 1995. Vol. 7. P. 987–1000.
147. Demura T. Fukuda H. Transcriptional regulation in wood formation // *Trends Plant Sci*. 2007. Vol. 12. P. 64-70.
148. Derr W.F., Evert R.F. the cambium and seasonal development of phloem in *Robinia pseudoacacia* // *Am. J. Bot*. 1967. Vol. 54. P. 147-153.
149. Devito K., Westbrook C., Schiff S.L. Nitrogen mineralization and nitrification in upland and peatland forest soils in two Canadian Shield catchments // *Canadian Journal of Forest Research*. 1999. Vol. 29. P. 1793-1804.
150. Dinwoodie J.M. Timber – a review of the structure-mechanical property relationship // *J. Microscopie*. 1975. Vol. 104. P. 3–32.
151. Du J., Groover A. Transcriptional regulation of secondary growth and wood formation // *JIPB*. 2010. Vol. 52. P. 17–27.

152. Duncan K.A., Hardin S.C., Huber S.C. The Three maize sucrose synthase isoforms differ in distribution, localization, and phosphorylation // *Plant Cell Physiol.* 2006. Vol. 47. P. 959–971.
153. Duncan K.A., Huber S.C. Sucrose synthase oligomerization and F-actin association are regulated by sucrose concentration and phosphorylation // *Plant Cell Physiol.* 2007. Vol. 48. P. 1612-1623
154. Echt C.S., Chourey P.S. A Comparison of two sucrose synthetase isozymes from normal and *shrunk-en-1* maize // *Plant Physiol.* 1985. Vol. 79. P. 530-536.
155. Ehness R, Ecker M, Godt DE, Roitsch T. Glucose and stress independently regulate source/sink relations and defense mechanisms via signal transduction pathways involving protein phosphorylation // *The Plant Cell.* 1997. Vol. 9. P. 1825–1841.
156. Escamez S., Tuominen H. Programmes of cell death and autolysis in tracheary elements: when a suicidal cell arranges its own corpse removal // *J. Exp. Bot.* 2014. Vol. 65. P. 1313-1321.
157. Eschrich W. Free space invertase, its possible role in phloem unloading // *Ber. Deutsch. Bot. Ges.* 1980. Vol. 93. P. 363-378.
158. Essmann J., Schmitz-Thom I., Schön H., Sonnewald S., Weis E., Scharte J. RNA interference-mediated repression of cell wall invertase impairs defense in source leaves of tobacco // *Plant Physiol.* 2008. Vol. 147. P. 1288-1299.
159. Etchells J.P., Mishra L.S., Kumar M., Campbell L., Turner S.R. Wood formation in trees is increased by manipulating PXY-regulated cell division // *Current Biology.* 2015. Vol. 25. P. 1050-1055.
160. Etchells J.P., Provost C.M., Mishra L., Turner S.R. *WOX4* and *WOX14* act downstream of the PXY receptor kinase to regulate plant vascular proliferation independently of any role in vascular organization // *Development.* 2013. Vol. 140. P. 2224-2234.
161. Etchells J.P., Provost C.M., Turner S.R. Plant vascular cell division is maintained by an interaction between PXY and ethylene signaling // *PLoS Genet.* 2012. Vol. 8. e1002997.
162. Etchells J.P., Turner S.R. The PXY-CLE41 receptor ligand pair defines a multifunctional pathway that controls the rate and orientation of vascular cell division // *Development.* 2010. Vol. 137. P. 767-774.

163. Eveland A.L., Jackson D.P. Sugars, signalling, and plant development // Journal of Experimental Botany. 2012. Vol. 63.P. 3367-3377.
164. Ever R.F. The cambium and seasonal development of the phloem in *Pyrus malus* // Am. J. Bot. 1963. Vol. 50. P. 149-159.
165. Evert R.F. Some aspects of cambial development in *Pyrus communis* // Am. J. Bot. 1961. Vol. 48. P. 479-488.
166. Fan L., Bao J., Wang Y., Yao J., Gui Y., W. Hu, J. Zhu, M. Zeng, Y. Li, Y. Xu // Post-domestication selection in the maize starch pathway // PLoS ONE. 2009. V. 4(10). e7612.
167. Fisher D.B., Oparka K.J. Post-phloem transport: principles and problems // J. Exp. Bot. 1996. Vol. 47. P. 1141–1154.
168. Fisher K., Turner S. PXY, a receptor-like kinase essential for maintaining polarity during plant vascular-tissue development // Curr. Biol. 2007. Vol. 17. P. 1061-1066.
169. Forde B. G., Clarkson D. T. Nitrate and Ammonium Nutrition of Plants: Physiological and Molecular Perspectives Advances in Botanical Research // Advances in Plant Pathology. 1999. Vol. 30. P. ISBN 0-12-005930-4
170. Forde, 2002
171. Foyer C.H., Lescure J.C., Lefebvre C., Morot-Gaudry J.F., Vincentz M., Vaucheret H. Adaptations of photosynthetic electron transport, carbon assimilation, and carbon partitioning in transgenic *Nicotiana plumbaginifolia* plants to changes in nitrate reductase activity // Plant Physiology. 1994. Vol. 104. P. 171-178.
172. Francis D., Halford N.G. Nutrient sensing in plant meristems // Plant Molecular Biology. 2006. Vol. 60. P. 981-993.
173. Friemann A., Brinkmann K., Hachtel W. Sequence of a cDNA encoding the bispecific NAD(P)H-nitrate reductase from the tree *Betula pendula* and identification of conserved protein regions // Mol. Gen. Genet. 1991. Vol. 237. P. 97-105.
174. Friemann A., Brinkmann K., Hachtel W. Sequence of a cDNA encoding nitrite reductase from the tree *Betula pendula* and identification of conserved protein regions // Mol. Gen. Genet. 1992a. Vol. 237. 411-416.
175. Friemann A., Lange M., Hachtel W., Brinkmann K. Induction of nitrate assimilatory enzymes in the tree *Betula pendula* // Plant Physiol. 1992b. Vol. 99. P. 837-842.

176. Fujii S., Hayashi T., Mizuno K. Sucrose Synthase is an Integral Component of the Cellulose Synthesis Machinery // *Plant Cell Physiol.* 2010. V. 51(2). P. 294-301.
177. Gan Y., Filleur S., Rahman A., Gotensparre S., Forde B.G. Nutritional regulation of ANR1 and other rootexpressed MADS-box genes in *Arabidopsis thaliana* // *Planta.* 2005. Vol. 222. P. 730-742.
178. Gancheva M.S, Dodueva M.A., Lebedeva M.A., Tvorogova V.E., Tkachenko A.A., Lytova L.A. Identification, expression, and functional analysis of *CLE* genes in radish (*Raphanus sativus* L.) storage root // *BMC Plant biology.* 2016. Vol. 16. P. 23-33.
179. Gardiner J.C., Taylor N.G., Turner S.R. Control of cellulose synthase complex localization in developing xylem // *Plant Cell.* 2003. Vol. 15. P. 1740-1748.
180. Gebauer G., Stadler J. Nitrate assimilation and nitrate content in different organs of ash trees (*Fraxinus excelsior*) // *Plant Nutrition – Physiology and Applications.* 1990. Vol 41. P. 101-106.
181. Geiger M., Walch-Piu L., Harnecker J., Schulz E.-D., Ludewig F., Sonnewald U., Stitt M. Enhanced carbon dioxide leads to a modified diurnal rhythm of nitrate reductase activity in older plants, and a large stimulation of nitrate reductase activity and higher levels of amino acids in higher plants // *Plant, Cell and Environment.* 1999. Vol. 21. P. 253-268.
182. Geisler-Lee J., Geisler M., Coutinho P.M., Segerman B., Nishikubo N., Takahashi J., Aspeborg H., Djerbi S., Master E., Andersson-Gunneras S., Sundberg B., Karpinski S., Teeri T. T., Kleczkowski L.A., Henrissat B., Mellerowicz E.J. Poplar carbohydrate-active enzymes. Gene identification and expression analyses // *Plant Physiology.* 2006. Vol. 140. P. 946-962.
183. Gerber L., Zhang B., Roach M., Rende U., Gorzsas A., Kumar M., Burgert I., Niittylla T., Sundberg B. Deficient sucrose synthase activity in developing wood does not specifically affect cellulose biosynthesis, but causes an overall decrease in cell wall polymers // *New Phytol.* 2014. Vol. 203. P. 1220-1230.
184. Ghillebert R., Swinnen E., Wen J., Vandesteene L., Ramon M., Norga K., Rolland F., Winderickx J. The AMPK/SNF1/SnRK1 fuel gauge and energy regulator: structure, function and regulation // *FEBS J.* 2011 Vol. 278. P. 3978-3990.
185. Gibson S.I. Plant Sugar-Response Pathways. Part of a Complex Regulatory Web // *Plant Physiology.* 2000. Vol. 124, pp. 1532-1539.

186. Gibson S.I. Plant Sugar-Response Pathways. Part of a Complex Regulatory Web // *Plant Physiology*. 2000, Vol. 124, pp. 1532–1539.
187. Gibson S.I. Sugar and phytohormone response pathways: navigating a signalling network // *Journal of Experimental Botany*. 2004. Vol. 55. № 395. P. 253-264.
188. Godt D.E. Roitsch T. Regulation and tissue-specific distribution of mRNAs for three extracellular invertase isoenzymes of tomato suggests an important function in establishing and maintaining sink metabolism // *Plant Physiol*. 1997. Vol. 115. P. 273-282.
189. Godt D.E., Roitsch T. The developmental and organ specific expression of sucrose cleaving enzymes in sugar beet suggests a transition between apoplasmic and symplasmic phloem unloading in the tap roots // *Plant Physiol. Biochem*. 2006. Vol. 44. P. 656-665.
190. Goetz M., Godt D.E., Guivarc'h A., Kahmann U., Chriqui D., Roitsch T. Induction of male sterility in plants by metabolic engineering of the carbohydrate supply // *PNAS*. 2001. Vol. 98. P. 6522-6527.
191. Gordon A. J., Minchin F. R., James C. L. et al. Sucrose synthase in legume nodules is essential for nitrogen fixation // *Plant Physiology*. 1999. Vol. 120. № 3. P. 867–878.
192. Gordon A.J., Skøt L., James C.L., Minchin F.R. Short term metabolic responses of soybean root nodules to nitrate // *Journal of Experimental Botany*. 2002. Vol. 53. P. 423–428.
193. Graham I.A., Denby K.J., Leaver C.J. Carbon catabolite repression regulates glyoxylate cycle gene expression in cucumber // *Plant Cell*. 1994. Vol. 6. P. 761-772.
194. Graham, I.A. Carbohydrate control of gene expression in higher plants // *Res. Microbiol*. 1996. Vol. 147. P. 572-580.
195. Greenshields D.L., Wang F., Wei Y., Selvaraj G. Activity and gene expression of acid invertases in einkorn wheat (*Triticum monococcum*) infected with powdery mildew // *Can. J. Plant Pathol*. 2004. Vol. 26. P. 506-513.
196. Greiner S., Krausgrill S., Rausch T. Cloning of a tobacco apoplasmic invertase inhibitor. Proof of function of the recombinant protein and expression analysis during plant development // *Plant Physiol*. 1998. Vol. 116. P. 733-742.
197. Groot W.J., Wein R.W. Effects of fire severity and season of burn on *Betula glandulosa* growth dynamics // *International Journal of Wildland Fire*. 2004. Vol. 13. P. 287-295.

198. Guo F.Q. Wang R., Crawford N.M. The *Arabidopsis* dual-affinity nitrate transporter gene *AtNRT1.1* (*CHLI*) is regulated by auxin in both shoots and roots // *J. Exp. Bot.* 2002. Vol. 53. P. 835-844.
199. Guy C.L. Freezing tolerance of plants: Current understanding and selected emerging concepts // *Can J Bot-Revue Canadienne De Botanique.* 2003. V. 81. P. 1216-1223.
200. Hachtel W., Strater, T. The nitrate reductase promoter of birch directs differential reporter gene expression in tissues of transgenic tobacco // *Plant Soil.* 2000. Vol. 221. P. 33-38.
201. Haigler C.H, Ivanova-Datcheva M., Hogan P.S., Salnikov V.V., Hwang S., Martin L.K., Delmer D.P. Carbon partitioning to cellulose synthesis // *Plant Mol. Biol.* 2001. Vol. 47. P. 29-51.
202. Halford N.G., Dickinson J.R. Sugar sensing and cell cycle control: evidence of cross-talk between two ancient signalling pathways / *The plant cell cycle and its interfaces.* Sheffield: Sheffield Academic Press, 2001. P. 87–107.
203. Halford N.G., Hey S., Jhurreea D., Laurie S., McKibbin R.S., Paul M., Zhang Y. Metabolic signalling and carbon partitioning: role of Snf1-related (SnRK1) protein kinase // *J. Exp. Bot.* 2003. Vol. 54. P. 467-475.
204. Halford N.G., Hey S.J. Snf1-related protein kinases (SnRKs) act within an intricate network that links metabolic and stress signalling in plants // *Biochem J.* 2009. Vol. 419. P. 247-259.
205. Hardin S.C., Duncan K.A., Huber S.C. Determination of structural requirements and probable regulatory effectors for membrane association of maize sucrose synthase1 // *Plant Physiol.* 2006. Vol. 141. P. 1106–1119.
206. Hardin S.C., Huber S.C. Proteasome activity and the post-translational control of sucrose synthase stability in maize leaves. // *Plant Physiol. Biochemistry.* 2004. Vol. 42. P. 197–208.
207. Hardin S.C., Tang G-Q., Scholz A., Holtgraewe D., Winter H., Huber S.C. Phosphorylation of sucrose synthase at serine 170: occurrence and possible role as a signal for proteolysis // *Plant J.* 2003. Vol. 35. P. 588–603.

208. Hardin S.C., Winter H., Huber S.C. Phosphorylation of the amino terminus of maize sucrose synthase in relation to membrane association and enzyme activity // *Plant Physiol.* 2004. Vol. 134. P. 1427–1438.
209. Hauch S., Magel E. Extractable activities and protein content of sucrose-phosphate synthase, sucrose synthase and neutral invertase in trunk tissues of *Robinia pseudoacacia* L. are related to cambial wood production and heartwood formation // *Planta.* 1998. Vol. 207. P. 266-274.
210. Hayes M.A., Davies C., Dry I.B., Isolation, functional characterization, and expression analysis of grapevine (*Vitis vinifera* L.) hexose transporters: differential roles in sink and source tissues // *Journal of Experimental Botany.* 2007. Vol. 58. P. 1985-1997.
211. Heo J., Roszak P., Furuta K. M., Helariutta Y. Phloem development: current knowledge and future perspectives // *American Journal of Botany.* 2014. Vol. 101. P. 1393-1402.
212. Herbers K., Meuwly P., Frommer W.B., Métraux J.P., Sonnewald U. Systemic acquired resistance mediated by the ectopic expression of invertase: possible hexose sensing in the secretory pathway // *Plant Cell.* 1996. Vol. 8. P. 793-803.
213. Hertzberg M., Aspeborg H., Schrader J., Andersson A., Erlandsson R., Blomqvist K., Bhalerao R., Uhlen M., Teeri M., Lundeberg J., Sundberg R., Nilsson P., Sandberg G. A transcriptional roadmap to wood formation // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2001. Vol. 98. P. 14732–14737.
214. Heyer A.G., Raap M., Schroeer B., Marty B., Willmitzer L. Cell wall invertase expression at the apical meristem alters floral, architectural and reproductive traits in *Arabidopsis thaliana* // *The Plant Journal.* 2004. Vol. 39. P. 161-169.
215. Hirakawa Y., Kondo Y., Fukuda H. Regulation of vascular development by CLE peptide-receptor systems // *J. Integr. Plant Biol.* 2010a. Vol. 52. P. 8-16.
216. Hirakawa Y., Kondo Y., Fukuda H. TDIF peptide signaling regulates vascular stem cell proliferation via the *WOX4* homeobox gene in *Arabidopsis* // *Plant Cell.* 2010b. Vol. 22. P. 2618-2629.
217. Hirakawa Y., Shinohara H., Kondo Y., Inoue A., Nakanomyo I., Ogawa M., Sawa S., Ohashi-Ito K., Matsubayashi Y., Fukuda H. Non-cell-autonomous control of vascular stem cell fate by a CLE peptide/receptor system // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2008. Vol. 105. P. 15208-15213.

218. Ho S.L., Chao Y.C., Tong W.F., Yu S.M. Sugar coordinately and differentially regulates growth- and stress-related gene expression via a complex signal transduction network and multiple control mechanisms // *Plant Physiol.* 2001. Vol. 125. P. 877-890.
219. Hohmann S., Winderickx J., de Winde J.H., Valckx D., Cobbaert P., Luyten K., de Meersman C., Ramos J., Thevelein J.M. Novel alleles of yeast hexokinase PII with distinct effects on catalytic activity and catabolite repression of SUC2 // *Microbiology* 1999. Vol. 145. P. 703-714.
220. Hong Z., Zhang Z., Olson J.M., Verma D.P. A novel UDP-glucose transferase is part of the callose synthase complex and interacts with phragmoplastin at the forming cell plate // *Plant Cell.* 2001. V. 13. P. 769-779.
221. Hubbard N.L., Huber S.C., Pharr D.M. Sucrose phosphate synthase and acid invertase as determinants of sucrose concentration in developing muskmelon (*Cucumis melo* L.) fruit // *Plant Physiol.* 1989. Vol. 91. P 1527-1534.
222. Huber S.C., Bachmann M., Huber J.L. Post-translational regulation of nitrate reductase activity: a role for Ca²⁺ and 14-3-3-proteins // *Trends in Plant Science.* 1996a. Vol. 12. P. 432-438.
223. Huber S.C., Huber J.L., Laio P.C., Gage D.A., McMichael R.W.Jr., Chourey P.S., Hannah L.C., Koch K.E. Phosphorylation of serine-15 of maize leaf sucrose synthase // *Plant Physiol.* 1996b. Vol. 112. P. 793–802.
224. Hughes J.E., Gunning B.E.S. Glutaraldehyde-induced deposition of callose // *Can. J. Bot.* 1980. Vol. 58. P. 250–258.
- identifies potential regulators of cambial stem cell identity // *Plant Cell.* 2004. Vol. 16. P. 2278-2292.
225. Iglesias V.A., Meins F. Movement of plant viruses is delayed in a beta-1,3-glucanase-deficient mutant showing a reduced plasmodesmatal size exclusion limit and enhanced callose deposition // *Plant J.* 2000. Vol. 21. P. 157–166.
226. Iraqi D., Le V-Q., Lamhamedi M.S. et al. Sucrose utilization during somatic embryo development in black spruce: involvement of apoplastic invertase in the tissue and of extracellular invertase in the medium // *J. of Plant Physiology.* 2005. Vol. 162. P. 115-124.

227. Iraqi D., Tremblay F.M. The role of sucrose during maturation of black spruce (*Picea mariana*) and white spruce (*Picea glauca*) somatic embryos // *Physiologia Plantarum*. 2001. Vol. 111. № 3. P. 381-388.
228. Ito Y., Nakanomyo I., Motose H., Iwamoto K., Sawa S., Dohmae N., Fukuda H. Dodeca-CLE peptides as suppressors of plant stem cell differentiation // *Science*. 2006. Vol. 313. P. 842-845.
229. IUSS Working Group WRB 2014
230. Jackson WA. Nitrate Acquisition and Assimilation by Higher Plants: Processes in the Root System // *Nitrogen in the Environment*. Vol. 2. N. Y. etc.: Academic Press. 1978. P. 45.
231. Jang, J.C., Sheen, J. Sugar sensing in higher plants // *Plant Cell*. 1994. Vol. 6. P. 1665-1679.
232. Jia L., Zhang B., Mao C., Li J., Wu Y., Wu P., Wu Z. OsCYT-INV1 for alkaline/neutral invertase is involved in root cell development and reproductivity in rice (*Oryza sativa* L.) // *Planta*. 2008. Vp;. 228. P. 51-59.
233. Jin Y., Ni D.A., Ruan Y.L. Posttranslational elevation of cell wall invertase activity by silencing its inhibitor in tomato delays leaf senescence and increases seed weight and fruit hexose level // *Plant Cell*. 2009. Vol. 21. P. 2072–2089.
234. Johansen A, Jakobsen I, Jensen E S. Hyphal N transport by a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus associated with cucumber grown at three nitrogen levels // *Plant Soil*. 1994. Vol. 160. P. 1-9.
235. Joshi, C.P. Xylem-specific and tension stress responsive expression of cellulose synthase genes from aspen trees // *Appl. Biochem. Biotechnol* . 2003. Vol. 105–108. P. 17-25.
236. Joshi, C.P.; Bhandari, S.; Ranjan, P.; Kalluri, U.C.; Liang, X.; Fujino, T.; Samuga, A. Genomics of cellulose biosynthesis in poplars // *New Phytol*. 2004. Vol. 164. P. 53-61.
237. Kaiser W.M., Weiner H., Huber S.C. Nitrate reductase in higher plants: a case and a potentially important side reaction // *Journal of Experimental Botany*. 1999. Vol. 53. P. 875-882.
238. Kaiser, W.M., and Huber, S.C. Post-translational regulation of nitrate reductase: Mechanism, physiological relevance and environmental triggers // *J. Exp. Bot*. 2001. Vol. 52. P. 1981-1989.

239. Kalluri, U.C.; Joshi, C.P. Differential expression patterns of two cellulose synthase genes are associated with primary and secondary cell wall development in aspen trees // *Planta*. 2004. Vol. 220. P. 47-55.
240. Kandlbinder A, Weiner H, Kaiser W.M. Nitrate reductases from leaves of *Ricinus* (*Ricinus communis* L.) and spinach (*Spinacia oleracea* L.) have different regulatory properties // *Journal of Experimental Botany*. 2000. Vol. 51. P. 1099-1105.
241. Karve A., Rauh B.L., Xia X., Kandasamy, M., Meagher R.B., Sheen J., et al. Expression and evolutionary features of the hexokinase gene family in *Arabidopsis* // *Planta*. 2008. Vol. 228. P. 411–425. doi:10.1007/s00425-008-0746-9
242. Katsir L., Davies K. A., Bergmann D. C., Laux T. Peptide signaling in plant development // *Curr. Biol*. 2011. Vol. 21. P. 356–364.
243. Kaufman P.B., Ghosheh N.S., Lacroix J.D., Soni S.L., Ikuma H. Regulation of invertase levels in *Avena* stem segments by gibberellic acid, sucrose, glucose, and fructose // *Plant Physiol*. 1973. Vol. 52. P. 221-228.
244. Keunen E., Peshev D., Vangronsveld J., VAN DEN Ende W., Cuypers A. Plant sugars are crucial players in the oxidative challenge during abiotic stress: extending the traditional concept // *Plant Cell Environ*. 2013. Vol. 36. P. 1242-1255.
245. Kiba T., Kudo T., Kojima M., Sakakibara H. Hormonal control of nitrogen acquisition: roles of auxin, abscisic acid, and cytokinin // *J. Exp. Bot*. 2011. Vol. 62. P. 1399-1409.
246. Kladnik A., Chamusco K., Chourey P.S., Dermastia M. In situ detection of programmed cell death in the maize caryopsis // *Period. Biol*. 2005. Vol. 107. P. 11–16.
247. Klann E.M., Hall B., Bennett A.B. Antisense acid invertase (*TW7*) gene alters soluble sugar composition and size in transgenic tomato fruit // *Plant Physiol*. 1996. Vol. 112. P. 1321-1330.
248. Klemens P.A.W., Patzke K., Deitmer J.W., Spinner L., Le Hir R., Bellini C., Bedu M., Chardon F., Krapp A., Neuhaus E. Overexpression of the vacuolar sugar carrier *AtSWEET16* modifies germination, growth and stress tolerance in *Arabidopsis thaliana* // *Plant Physiology*. 2013. Vol. 163. P. 1338-1352.
249. Klimenko S.B., Peshkova A.A., Dorofeev N.V Nitrate reductase activity during heat shock in winter wheat // *Journal of Stress Physiology and Biochemistry*. 2006. Vol. 2. No. 1. P. 50-55.

250. Koch K.E. Carbohydrate-modulated gene expression in plants // *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 1996. Vol. 47. P. 509–540.
251. Koch K.E. Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development // *Curr. Opin. Plant Biol.* 2004. Vol. 7. P. 235–246.
252. Koch K.E., Nolte K.D., Duke E.R., McCarty D.R., Avigne W.T. Sugar levels modulate differential expression of maize sucrose synthase genes // *Plant Cell.* 1992. Vol. 4. P. 59–69.
253. Koch K.E., Zeng Y. Molecular approaches to altered C partitioning: genes for sucrose metabolism // *J Amer Soc Hort Sci.* 2002. Vol. 127. P. 474-483.
254. Komina O., Zhou Y., Sarath G., Chollet R. In vivo and in vitro phosphorylation of membrane and soluble forms of soybean nodule sucrose synthase // *Plant Physiol.* 2002. Vol. 129. P. 1664–1673.
255. Kondo Y., Fujita T., Sugiyama M., Fukuda H. A novel system for xylem cell differentiation in *Arabidopsis thaliana* // *Mol. Plant.* 2015. Vol. 8. P. 612-621.
256. Kondo Y., Fujita T., Sugiyama M., Fukuda H. A novel system for xylem cell differentiation in *Arabidopsis thaliana* // *Mol Plant.* 2015. Vol. 8. P. 612-621.
257. Kondo Y., Ito T., Nakagami H., Hirakawa Y., Saito M., Tamaki T., Shirasu K., and Fukuda H. Plant GSK3 proteins regulate xylem cell differentiation downstream of TDIF-TDR signaling // *Nat. Commun.* 2014. Vol. 5. P. 3504.
258. Kondo Y., Nurani A.M., Saito C., Ichihashi Y., Saito M., Yamazaki K., Mitsuda N., Ohme-Takagi M., Fukuda H. Vascular cell induction culture system using *Arabidopsis* leaves (VISUAL) reveals the sequential differentiation of sieve element-like cells // *Plant Cell.* 2016. Vol. 20. P. 1250-1262.
259. Koonjul P.K., Minhas J.S., Nunes C., Sheoran I.S., Saini H.S. Selective transcriptional down-regulation of anther invertases precedes the failure of pollen development in water-stressed wheat // *Journal of Experimental Botany.* 2005. Vol. 56. P. 179-190.
260. Kouchi H., Takane K., So R.B., Ladha J.K., Reddy P.M. Rice ENOD40: isolation and expression analysis in rice and transgenic soybean root nodules // *Plant J.* 1999. Vol. 18. P. 121–129.
261. Kozlowski T.T., Clausen J.J. Shoot growth characteristics of heterophyllous woody plants // *Can. J. Bot.* 1966. Vol.44. N6. P. 827–843.

262. Krapp A., Hofmann B., Schafer C., Stitt M. Regulation of the expression of *rbcS* and other photosynthetic genes by carbohydrates: a mechanism for the “sink regulation” of photosynthesis? // *Plant J.* 1993. Vol. 3. P. 817-828.
263. Krouk G., Lacombe B., Bielach A., Perrine-Walker F., Malinska K., Mounier E., Hoyerova K., Tillard P., Leon S., Ljung K., Zazimalova E., Benkova E., Nacry P., Gojon A. Nitrate and auxin transport by NRT1.1 defines a mechanism for nutrient sensing in plants // *Dev. Cell.* 2010. Vol. 18. P. 927-937.
264. Krouk G., Ruffel S., Gutierrez R.A., Gojon A., Crawford N.M., Coruzzi G.M., Lacombe B. A framework integrating plant growth with hormones and nutrients // *Trends Plant Sci.* 2011. Vol. 16. P. 178-182.
265. Kubo M., Udagawa M., Nishikubo N., Horiguchi G., Yamaguchi M., Ito J., Mimura T., Fukuda H., and Demura T. Transcription switches for protoxylem and metaxylem vessel formation // *Genes Dev.* 2005. Vol. 19. P. 1855-1860.
266. Kumar R., Kumar D., Kyung Hyun T., Kim J.-Y. Players at Plasmodesmal Nano-channels // *J. Plant Biol.* 2015. Vol. 58. 75-86.
267. Lam H.M., Coschigano K.T., Oliveira I.C., Melooliveira R., and Coruzzi G.M. The molecular-genetics of nitrogen assimilation into amino acids in higher plants // *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 1996. Vol. 47. P. 569–593.
268. Landrein B., Formosa-Jordan P., Malivert A., Schuster C., Melnyk C.W., Yang W., Turnbull C., Meyerowitz E.M., Locke J.C. W., Jönsson H. Nitrate modulates stem cell dynamics in *Arabidopsis* shoot meristems through cytokinins // *PNAS.* 2018. Vol. 6. P. 1382-1387.
269. Larson P.R. *The Vascular Cambium: Development and Structure.* Springer, 1994. 725 p.
270. Lastdrager J., Hanson J., Smeekens S. Sugar signals and the control of plant growth and development // *Journal of Experimental Botany.* 2014. Vol. 65. P. 799-807.
271. LeClere S., Schmelz E.A., Chourey P.S. Sugar levels regulate tryptophan-dependent auxin biosynthesis in developing maize kernels // *Plant Physiol.* 2010. Vol. 153. P. 306-318.
272. Lehesranta S.J, Lichtenberger R., Helariutta Y. Cell-to-cell communication in vascular morphogenesis // *Current Opinion in Plant Biology.* 2010. Vol. 13. P. 59-65.

273. Lichtenthaler H.K. Chlorophylls and carotenoids: pigment of photosynthetic biomembranes // *Methods Enzymol.* 1987. Vol. 148. P. 331–382.
274. Liu J., An X., Cheng L., Chen F., Bao J., Yuan L., Zhang F., Mi G. Auxin transport in maize roots in response to localized nitrate supply // *Ann. Bot.* 2010. Vol. 106. P. 1019-1026.
275. Liu X., Wang Q., Chen P., Song F., Guan M., Jin L., Wang Y., Yang C. Four novel cellulose synthase (CESA) genes from *birch* (*Betula platyphylla* Suk.) involved in primary and secondary cell wall biosynthesis // *Int. J. Mol. Sci.* 2012. Vol. 13. P. 12195-12212.
276. Lorenz K., Lienhard S., Sturm A. Structural organization and differential expression of carrot β -fructofuranosidase genes: identification of a gene coding for a flower bud-specific isozyme // *Plant Molecular Biology.* 1995. Vol. 28. P. 189-194.
277. Lu, J. Ertl J.R., Chen C.M. Transcriptional regulation of nitrate reductase mRNA levels by cytokinin-abscisic acid interactions in etiolated barley leaves // *Plant Physiol.* 1992. Vol. 98. P. 1255-1260.
278. Maddison A.L., Hedley P.E., Meyer R.C., Aziz N., Davidson D., Machray G.C. Expression of tandem invertase genes associated with sexual and vegetative growth cycles in potato // *Plant Mol Biol.* 1999. Vol. 41. P. 741-751.
279. Maeda H., Song W., Sage T.L., Dellapenna D. Tocopherols play a crucial role in low-temperature adaptation and phloem loading in *Arabidopsis* // *Plant Cell.* 2006. Vol. 18. P. 2710–2732.
280. Magel E., Kruse S., Lütje G., Liese W. Soluble carbohydrates and acid invertases involved in the rapid growth of developing culms in *Sasa palmata* (Bean) Camus // *Bamboo Science and Culture: J. Amer. Bamboo Soc.* 2006. Vol. 19. № 1. P. 23-29.
281. Margalha L., Valerio C., Baena-González E. Plant SnRK1 kinases: structure, regulation and function AMP-activated Protein Kinase. Springer, 2016. P. 403-438.
282. Matic S., Akerlund H.-E., Everitt E., Widell S. Sucrose synthase isoforms in cultured tobacco cells // *Plant Physiol. Biochem.* 2004. Vol. 42. P. 299–306.
283. Matt P, Geiger M, Walch-Liu P, Engels C, Krapp A, Stitt M. Elevated carbon dioxide increases nitrate uptake and nitrate reductase activity when tobacco is growing on nitrate, but increases ammonium uptake and inhibits nitrate reductase activity when tobacco is growing on ammonium nitrate // *Plant, Cell and Environment.* 2001. Vol. 24. P. 1119–1137.

284. Matt P., Geiger M., Walch-Liu P., Engels C., Krapp A., Stitt M. The immediate cause of the diurnal changes of nitrogen metabolism in leaves of nitrate-replete tobacco: a major imbalance between the rate of nitrate reduction and the rates of nitrate uptake and ammonium metabolism during the first part of the light period // *Plant Cell Environ.* 2001. V. 24. P. 177-190.
285. Maurel K., Leite G.B., Bonhomme M., Guilliot A., Rageau R., Pétel G., Sakr S. Trophic control of bud break in peach (*Prunus persica*) trees: a possible role of hexoses // *Tree Physiology.* 2004. Vol. 24. P. 579-588.
286. McElfresh K.C., Chourey P.S. Anaerobiosis induces transcription but not translation of sucrose synthase in maize // *Plant Physiol.* 1988. Vol.87. P.542-546.
287. McNairn R.B. Phloem translocation and heat-induced callose formation in field-grown *Cossypium hirsutum* L. // *Plant Physiol.* 1972. Vol. 50. P. 366-370.
288. Meijer M., Murray J.A.H. The role and regulation of D-type cyclins in the plant cell cycle // *Plant Molecular Biology.* 2000. Vol. 43. P. 621-633.
289. Miernyk J.A., Dennis D.T. Mitochondrial, plastid and cytosolic isozymes of hexokinase from developing endosperm of *Ricinus communis* // *Arch Biochem Biophys.* 1983. Vol. 226. P. 458-468.
290. Mishra B.S., Singh M., Aggrawal P., Laxmi A. Glucose and auxin signaling interaction in controlling *Arabidopsis thaliana* seedlings root growth and development // *PLoS ONE.* 2009. 4: e4502.
291. Mitsuda N., Iwase A., Yamamoto H., Yoshida M., Seki M., Shinozaki K., and Ohme-Takagi M. NAC transcription factors, NST1 and NST3, are key regulators of the formation of secondary walls in woody tissues of *Arabidopsis* // *Plant Cell.* 2007. Vol. 19. P. 270-280.
292. Miyashima S., Sebastian J., Lee J.Y., Helariutta Y. Stem cell function during plant vascular development // *EMBO J.* 2013. Vol. 32. P. 178-193.
293. Moghaddam M.R.B., Ende W.V. Sugars and plant innate immunity // *Journal of Experimental Botany.* 2012. Vol. 2. P. 1-10.
294. Moore B., Zhou L., Rolland F., Hall Q., Cheng W-H., Liu Y-X., Hwang I., Jones T., Sheen J. Role of the *Arabidopsis* glucose sensor HXK1 in nutrient, light, and hormonal signaling // *Science.* 2003. Vol. 300. P. 332-336.

295. Morell M., Copeland L. Sucrose synthase of soybean nodules // *Plant Physiol.* 1985. V. 78. P. 149–154.
296. Morkunas I., Marczak Q., Stachowiak J., Stobiecki M. Sucrose-stimulated accumulation of isoflavonoids as a defence response of lupine to *Fusarium oxysporum* // *Plant Physiology and Biochemistry.* 2005. Vol. 43. P. 363-373.
297. Morris D.A., Arthur E.D. Effects of gibberellic acid on patterns of carbohydrate distribution and acid invertase activity in *Phaseolus vulgaris* // *Physiologia Plantarum.* 1985. Vol. 65. p. 257-262.
298. Müller D, Waldie T., Miyawaki K., To J.P., Melnyk C.W., Kieber J.J., Kakimoto T., Leyser O. Cytokinin is required for escape but not release from auxin mediated apical dominance // *Plant J.* 2015. Vol. 82. P. 874-886.
299. Nägele T., Henkel S., Hörmiller I., Sauter T., Sawodny O., Ederer M., Heyer A.G. Mathematical modeling of the central carbohydrate metabolism in *Arabidopsis* reveals a substantial regulatory influence of vacuolar invertase on whole plant carbon metabolism // *Plant Physiol.* 2010. Vol. 153. P. 260–272.
300. Nguyen Q.A., Luan S., Wi S.G., Bae H., Lee D.-S., Bae H.-J. Pronounced phenotypic changes in transgenic tobacco plants overexpressing sucrose synthase may reveal a novel sugar signaling pathway // *Front. Plant Sci.* 2016. Vol. 6. P. 1–15.
301. Nieminen K., Blomster T., Helariutta Y., Mähönen A P. Vascular cambium development // *The Arabidopsis Book.* 2015. American Society of Plant Biologists Nitrate modulates stem cell dynamics in *Arabidopsis* shoot meristems through cytokinins.
302. Nilsson R., Bernfur K., Gustavsson N., Bygdell J., Wingsle G., Larsson C. Proteomics of plasma membranes from poplar trees reveals tissue distribution of transporters, receptors, and proteins in cell wall formation // *Mol. Cell. Proteomics.* 2010. Vol. 9. P. 368–387.
303. 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. Vol. 50. P. 1461-1478.
304. Novitskaya L.L. Effect of sucrose on sclerification of bark cells in *Betula pendula* Roth // *Acta Horticulturae.* 2009. Vol. 835. P. 109-116.

305. Novitskaya L.L., Kushnir F.V. The role of sucrose in regulation of trunk tissue development in *Betula pendula* Roth // Journal of plant growth regulation. 2006. Vol. 25(1). P. 18-29.
306. Nunes C., Primavesi L.F., Patel M.K., Martinez-Barajas E., Powers S.J., Sagar R., Fevereiro P.S., Davis B.G., Paul M.J. Inhibition of SnRK1 by metabolites: tissue-dependent effects and cooperative inhibition by glucose 1-phosphate in combination with trehalose 6-phosphate // Plant Physiol Biochem. 201. Vol. 363. P. 89-98.
307. Nystedt B, Street NR, Wetterbom A, Zuccolo A, Lin YC, Scofield DG, Vezzi F, Delhomme N, Giacomello S, Alexeyenko A et al. The Norway spruce genome sequence and conifer genome evolution // Nature. 2013. Vol. 497. P. 579-584.
308. O'Hara L.E., Paul M.J., Wingler A. How do sugars regulate plant growth and development? New insight into the role of trehalose-6-phosphate // Molecular Plant. 2012. Vol. 6. P. 261-274.
309. Ohashi-Ito K., Oda Y., Fukuda, H. *Arabidopsis* VASCULAR-RELATED NAC-DOMAIN6 directly regulates the genes that govern programmed cell death and secondary wall formation during xylem differentiation // Plant Cell 2010. Vol. 22. P. 3461-3473.
310. Oliver A. J., Smith S. E., Nicholas D. J. D., Wallace W. Activity of nitrate reductase in *Trifolium subterraneum*: Effects of mycorrhizal infection and phosphate nutrition // New Phytologist. 1983. Vol. 94. P. 63-79.
311. Oliver, S.N., Dennis E.S., Dolferus R. ABA regulates apoplastic sugar transporter and is a potential signal for cold-induced pollen sterility in rice // Plant Cell Physiol. 2007. Vol. 48. P. 1319-1330.
312. Oparika K.J., Santa Cruz S. The great escape: phloem transport and unloading of macromolecules // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 2000. Vol. 51. P. 323-347.
313. Osuna D., Usadel B., Morcuende R., Gibon Y., Bläsing O.E., Höhne M., Günter M., Kamlage B., Trethewey R., Scheible W.R., Stitt M. Temporal responses of transcripts, enzyme activities and metabolites after adding sucrose to carbon-deprived *Arabidopsis* seedlings // The Plant Journal. 2007. Vol. 49. P. 463-491.
314. Pagter M., Jensen C.R., Petersen K.K., Liu F., Arora R. Changes in carbohydrates, ABA and bark proteins during seasonal cold acclimation and deacclimation in *Hydrangea* species differing in cold hardiness // Physiologia Plantarum. 2008. Vol. 134. P. 473-485.

315. Palmer W.M., Ru L., Jin Y., Patrick J.W., Ruan Y-L. Tomato ovary-to-fruit transition is characterized by a spatial shift of mRNAs for cell wall invertase and its inhibitor with the encoded proteins localized to sieve elements // *Molecular Plant*. 2015. Vol. 8. P. 315-328.
316. Patrick J.W., Botha F.C., Birch R.G. Metabolic engineering of sugars and simple sugar derivatives in plants // *Plant Biotechnol. J.* 2013. Vol. 11. P. 142–156.
317. Patrick J.W., Offler C.E. Compartmentation of transport and transfer events in developing seeds // *J. Exp. Bot.* 2001. Vol. 52. P. 551-564.
318. Pego J.V., Kortstee A.J., Huijser C., Smeekens S.C.M. Photosynthesis, sugars and the regulation of gene expression // *J. Exp. Bot.* 2000. Vol. 51. P. 407-416.
319. Percival G.C., Barnes S. The influence of carbohydrates, nitrogen fertilizers and water-retaining polymer root dips on survival and growth of newly transplanted bare-rooted silver birch (*Betula pendula* Roth.) and european beech (*Fagus sylvatica* L.) // *Arboricultural Journal*. 2007. Vol. 30. P. 223 – 244.
320. Persia D., Cai G., Casino C.D., Faleri C., Willemse M.T.M., Cresti M. Sucrose synthase is associated with the cell wall of tobacco pollen tubes // *Plant Physiology* 2008. Vol. 147. P. 1603-1618.
321. Pesquet E., Zhang B., Gorzsás A., Puhakainen T., Serk H., Escamez S., Barbier O., Gerber L., Courtois-Moreau C., Alatalo E. et al. Non-cell-autonomous postmortem lignification of tracheary elements in *Zinnia elegans* // *The Plant Cell*. 2013. Vol. 25. P. 1314-1328.
322. Pfaffl M.W., Tichopad A., Prgomet C., Neuvians T.P. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper - Excel-based tool using pair-wise correlations // *Biotechnol Lett.* 2004. V. 26. P. 509-515.
323. Piispanen R., Saranpää P. Variation of non-structural carbohydrates in silver birch (*Betula pendula* Roth) wood // *Trees*. 2001. Vol. 15. P. 444 – 451.
324. Pirsellova B., Matusikova I. Callose: the plant cell wall polysaccharide with multiple biological functions // *Acta Physiol. Plant.* 2013. Vol. 35 P. 635–644.
325. Pirsellova B., Mistrikova V., Libantova J., Moravcikova J., Matusikova I. Study on metal-triggered callose deposition in roots of maize and soybean // *Biologia*. 2012. Vol. 67. P. 698-705.

326. Plomion C., Leprovost G., Stokes A. Wood Formation in Trees // Plant Physiol. December 2001. Vol. 127. P. 1513–1523.
327. Polge C., Thomas M. SNF1/AMPK/SnRK1 kinases, global regulators at the heart of energy control? // Trends in Plant Science. 2007. Vol. 12. P. 20-28.
328. Pozueta-Romero J., Perata P., Akazawa T. Sucrose-starch conversion in heterotrophic tissues of plants // Crit. Rev. Plant Sci. 1999. Vol. 18. P. 489-525.
329. Price J., Laxmi A., St Martin S.K., Jang J-C. Global transcription profiling reveals multiple sugar signal transduction mechanisms in *Arabidopsis* // The Plant Cell. 2004. Vol. 16. P. 2128-2150.
330. Pucher G.W., Leavenworth C.S., Vickery H.B. Determination of starch in plant tissues // An- alyt. Chem. 1948. Vol. 20. P. 850-853.
331. Purcell P.C., Smith A.M., Halford N.G. Antisense expression of a sucrose non-fermenting-1-related protein kinase sequence in potato results in decreased expression of sucrose synthase in tubers and loss of sucrose-inducibility of sucrose synthase transcripts in leaves // Plant J. 1998. Vol. 14. P. 195–202.
332. Quick W.P., Schaffer A.A. Sucrose metabolism in sources and sinks // Photoassimilate distribution in plants and crops: source-sink relationships / Eds. Zamski E., Schaffer, A.A. New York: Marcel Dekker, 1996. P. 115–156.
333. Raab T.K., Terry N., Carbon, nitrogen, and nutrient interactions in *Beta vulgaris* L. as influenced by nitrogen source, NO_3^- versus NH_4^+ // Plant Physiol. 1995. Vol. 107. P. 575-585.
334. Rahayu Y.S., Walch-Liu P., Neumann G., Römheld V., von Wirén N., Bangerth F. Root-derived cytokinins as long-distance signals for NO_3^- -induced stimulation of leaf growth // J. Exp. Bot. 2005. Vol. 56. P. 1143-1152.
335. Ramon M., Rolland F., Sheen J. Sugar sensing and signaling / The Arabidopsis Book (TAB), 2008. ISSN: 1543-8120. P. 1-22.
336. Rao K.S. Cambial activity and developmental changes in ray initials of some tropical trees // Flora. 1988. Vol. 181. P. 425-434.
337. Rausch T., Greiner S. Plant protein inhibitors of invertases // Biochim. Biophys. Acta. 2004. Vol. 1696. P. 253-261.
338. Razgulin S. M. Mineralization of nitrogen compounds in the soil under the bilberry-sphagnum birch forest (Yaroslavl Oblast) // Eurasian Soil Science. 2014. V. 47. P. 70-77.

339. Razgulin S.M Nitrogen mineralization in soil of a highly productive southern taiga birch forest // Russian Journal of Forest Science, 2012. № 1. P. 65-71. ISSN: 0024-1148.
340. Rees A.P., Wilson P.M., Wright B.W. The ability of *Sordaria fimicola* to take up and metabolize glucose and sucrose // J. Gen. Microbiol. 1984. Vol. 130. P. 3235–3238.
341. Regierer N., Streb S., Zeeman S.C., Frey B. Seasonal changes in starch and sugar content of poplar (*Populus deltoids x nigra* cv. Dorskamp) and the impact of stem girdling on carbohydrate allocation to roots // Tree Physiology. 2010. Vol. 30. P. 979 – 987.
342. Riou-Khamlichi C., Menges M., Healy J.M., Murray J.A. Sugar control of the plant cell cycle: differential regulation of *Arabidopsis* D-type cyclin gene expression // Molecular Cell Biology. 2000. Vol. 20. P. 4513-4521.
343. Robaglia C., Thomas M., Meyer C. Sensing nutrient and energy status by SnRK1 and TOR kinases // Curr. Opin. Plant Biol. 2012. Vol. 15. P. 301-307.
344. Rodriguez-Villalon A., Gujas B., Kang Y.H., Breda A.S., Cattaneo P., Depuydt S., Hardtke, C.S. Molecular genetic framework for protophloem formation // PNAS. 2014. Vol. 111. P. 11551-11556.
345. Rohrig H., John M., Schmidt J. Modification of soybean sucrose synthase by S-thiolation with ENOD40 peptide A // Biochem. Bioph. Res. Co. 2004. Vol. 325. P. 864-870.
346. Rohrig H., Schmidt J., Miklashevichs E., Schell J., John M. Soybean ENOD40 encodes two peptides that bind to sucrose synthase // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2002. V. 99. P. 1915-1920.
347. Roitsch T. Source-sink regulation by sugar and stress // Current Opinion in Plant Biology. 1999. Vol. 2. P. 198-206.
348. Roitsch T., Balibrea M.E., ofmannM. H, Proels R., Sinha A.K. Extracellular invertase: key metabolic enzyme and PR protein // Journal of Experimental Botany. 2003. Vol. 54. P. 513-524.
349. Roitsch T., Bittner M., Codt D.E. Induction of apoplastic invertase of *Chenopodium rubrum* by D-glucose and a glucose analog and tissue-specific expression suggest a role in sink-source regulation // Plant Physiol. 1995. Vol. 108. P. 285-294.
350. Roitsch T., Ehness R., Goetz M., Hause B., Hofmann M., Sinha A. Regulation and function of extracellular invertase from higher plants in relation to assimilate partitioning,

- stress responses and sugar signaling // *Australian Journal of Plant Physiology*. 2000. Vol. 27. P. 815-825.
351. Roitsch T., González M-C. Function and regulation of plant invertases: sweet sensations // *Trends in Plant Science*. 2004. Vol. 9. P. 606-613.
352. Rolland F., Baena-Gonzalez E., Sheen J. Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms // *Annu. Rev. Plant Biol.* 2006. Vol. 57. P. 675–709.
353. Rolland F., Moore B., Sheen J. Sugar sensing and signaling in plants // *Plant Cell*. 2002. Vol. 14 P. 185-205.
354. Rook F., Bevan M.W. Genetic approaches to understanding sugar-response pathways // *J. Exp. Bot.* 2003. Vol. 54. P. 495-501.
355. Ruan Y.-L. Sucrose metabolism: gateway to diverse carbon use and sugar signaling // *Annu. Rev. Plant Biol.* 2014. Vol. 65. P. 33-67.
356. Ruan Y.-L., Jin Y., Yang Y.J., Li G.J., Boyer J.S. Sugar input, metabolism, and signaling mediated by invertase: roles in development, yield potential, and response to drought and heat // *Mol. Plant*. 2010. Vol. 3. P. 942-955.
357. Ruan Y.L., Llewellyn D.J., Furbank R.T. Suppression of sucrose synthase gene expression represses cotton fiber cell initiation, elongation, and seed development // *Plant Cell*. 2003. Vol. 15. P. 952–964.
358. Ruffel S., Krouk G. Ristova D., Shasha D., Birnbaum K.D, Coruzzi G.M. Nitrogen economics of root foraging: Transitive closure of the nitrate-cytokinin relay and distinct systemic signaling for N supply vs. demand // *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011. Vol. 108. P. 18524-18529.
359. Sakakibara H., Takei K., Hirose N. Interactions between nitrogen and cytokinin in the regulation of metabolism and development // *Trends Plant Sci*. 2006. Vol. 11. P. 440-448.
360. Salnikov V.V., Grimson M.J., Delmer D.P., Haigler C.H. Sucrose synthase localizes to cellulose synthesis sites in tracheary elements // *Phytochemistry*. 2001. Vol. 57. P. 823–833.
361. Salnikov V.V., Grimson M.J., Seagull R.W., Haigler C.H. Localization of sucrose synthase and callose in freeze-substituted secondary-wall-stage cotton fibers // *Protoplasma*. 2003. Vol. 221. P. 175-184.
362. Salojärvi J. et al. Genome sequencing and population genomic analyses provide insights into the adaptive landscape of silver birch // *Nat. Genet.* 2017. Vol. 49. P. 904–912.

363. Samuga A.; Joshi C.P. A new cellulose synthase gene (*PtrCesA2*) from aspen xylem is orthologous to *Arabidopsis AtCesA7 (irx3)* gene associated with secondary cell wall synthesis // *Gene*. 2002. Vol. 296. P. 37-44.
364. Samuga A.; Joshi C.P. Differential expression patterns of two new primary cell wall-related cellulose synthase cDNAs; *PtrCesA6* and *PtrCesA7* from aspen trees // *Gene* 2004. Vol. 334. P. 73-82.
365. Sander A., Krausgrill S., Greiner S., Weil M., Rausch T. Sucrose protects cell wall invertase but not vacuolar invertase against proteinaceous inhibitors // *FEBS*. 1996. Vol. 385. P. 171-175.
366. Saramäki J., Hytönen J. Nutritional status and development of mixed plantations of silver birch (*Betula pubescens* Ehrh.) on former agricultural soils // *Baltic Forestry*. 2004. Vol. 10. P. 2-11.
367. Savidge R.A. Biochemistry of seasonal cambial growth and wood formation - an overview of the challenges // In: *Cell and molecular biology of wood formation. Experimental biology reviews* / Ed. by Savidge R.A. Oxford: BIOS Scientific Publishers, 2000. P. 1-30.
368. Schnarrenberger C. Characterization and compartmentalization in green leaves of hexokinases with different specificities for glucose, fructose and mannose and for nucleoside triphosphates // *Planta*. 1990. Vol. 181. P. 249-255.
369. Schrader J. Developmental biology of wood formation – finding regulatory factors through functional genomics. Doctoral thesis. SLU, Grafiska Enheten, Umeå, Sweden, 2003. 60 p.
370. Schrader J., Nilsson J., Mellerowicz E., Berglund A., Nilsson P., Hertzberg M., Sandberg G. A high-resolution transcript profile across the wood-forming meristem of poplar
371. Shannon J.C., Pien F.-M., Cao P., Liu K.-C. Brittle-1, an adenylatetranslocator, facilitates transfer of extraplastidial ADP-glucose into amyloplasts of maize endosperms // *Plant Physiol*. 1998. Vol. 117. P. 1235-1252.
372. Sheen J, Zhou L, Jang J.-C. Sugars as signaling molecules // *Curr. Opin. Plant Biol*. 1999. Vol. 2. P. 410-418.
373. Sherson S.M., Alford H.L., Forbes S.M., Wallace G., Smith S.M. Roles of cell-wall invertases and monosaccharide transporters in the growth and development of *Arabidopsis* // *J. Exp. Bot*. 2003. Vol. 54. P. 525-531.

374. Shrader S., Sauter J.J. Seasonal changes of sucrose-phosphate synthase and sucrose synthase activities in poplar wood (*Populus × canadensis* Moench ‘robusta’) and their possible role in carbohydrate metabolism // J. Plant Physiol. 2002. Vol. 159. P. 833-843.
375. Sieburth L.E., Deyholos M.K. Vascular development: the long and winding road // Curr. Opin. Plant Biol. 2006. Vol. 9. P. 48-54.
376. Simpson C., Thomas C., Findlay K., Bayer E., Maule A.J. An Arabidopsis GPI-anchor plasmodesmal neck protein with callose binding activity and potential to regulate cell-to-cell trafficking // Plant Cell. 2009. Vol. 21. P. 581-594.
377. Sivaguru M., Fujiwara T., Samaj J., Baluska F., Yang Z., Osawa H., Maeda T., Mori T., Volkmann D., Matsumoto H. Aluminum-induced 1→3-beta-D-glucan inhibits cell-to-cell trafficking of molecules through plasmodesmata. A new mechanism of aluminum toxicity in plants // Plant Physiol. 2000. Vol. 124. P. 991-1006.
378. Slewinski T.L. Diverse functional roles of monosaccharide transporters and their homologs in vascular plants: a physiological perspective // Mol. Plant. 2011. Vol. 4. P. 641-662.
379. Smeekens S. Sugar regulation of gene expression in plants // Curr. Opin. Plant Biol. 1998. Vol. 1. P. 230-234.
380. Smeekens S. Sugar-induced signal transduction in plants // Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol. 2000. Vol. 51. P. 49-81.
381. Song D.L., Shen J.H., Li L.G. Characterization of cellulose synthase complexes in *Populus* xylem differentiation // New Phytol. 2010. Vol. 187. P. 777-790.
382. Sparks E., Wachsman G., Benfey P.N. Spatiotemporal signalling in plant development // Nat. Rev. Genet. 2013. Vol. 14. P. 631-644.
383. Springer B., Werr W., Starlinger P., Bennett C.D., Zokolica M., Freeling M. The *shrunken* gene on chromosome 9 of *Zea mays* L is expressed in various plant tissues and encodes an anaerobic protein // Mol Gen Genet. 1986. Vol. 205. P. 461-468.
384. Stitt M. Nitrate regulation of metabolism and growth // Current Opinion in Plant Biology 1999. Vol. 2. P. 178-186.
385. Stitt M., Sonnewald U. Regulation of metabolism in transgenic plants // Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol. 1995. Vol. 46. P. 341-368.

386. Sturm A. Invertases. Primary structures, functions, and roles in plant development and sucrose partitioning // *Plant Physiology*. 1999. Vol. 121. P. 1-7.
387. Sturm A., Chrispeels M.J. cDNA cloning of carrot extracellular beta-fructosidase and its expression in response to wounding and bacterial infection // *Plant Cell*. 1990. Vol. 2. P. 1107-1119.
388. Sturm A., Lienhard S., Schatt S., Hardegger M. Tissue-specific expression of two genes for sucrose synthase in carrot (*Daucus carota* L.) // *Plant Molecular Biology*. 1999. Vol. 39. P. 349-360.
389. Sturm A., Sebkova V., Lorenz K., Hardegger M., Lienhard S., Unger C. Developmental-specific and organ-specific expression of the genes for sucrose synthase and three isoenzymes of acid beta-fructofuranosidase in carrot // *Planta*. 1995. Vol. 195. P. 601-610.
390. Sturm A., Tang G.Q. The sucrose-cleaving enzymes of plants are crucial for development, growth and carbon partitioning // *Trends Plant Sci*. 1999. Vol. 4. P. 401-407.
391. Su J.C., Preiss J. Sucrose synthase from corn kernels // *Seikagaku*. 1977. Vol. 49. P. 6.
392. Suarez, M.F., Avila, C., Gallardo, F., Canton, F., Garcia-Gutierrez, A., Claros, M.G., and Canovas, F. Molecular and enzymatic analysis of ammonium assimilation in woody plants // *J. Exp. Bot*. 2002. Vol. 53. P. 891-904.
393. Suer S., Agusti J., Sanchez P., Schwarz M., Greb T. WOX4 imparts auxin responsiveness to cambium cells in *Arabidopsis* // *Plant Cell*. 2011. Vol. 23. P. 3247-3259.
394. Suty L., Moureaux T., Leydecker M.T., Teyssentier de la Serve B. Cytokinin affects nitrate reductase expression through the modulation of polyadenylation of the nitrate reductase mRNA transcript // *Plant Sci*. 1993. Vol. 90. P. 11-19.
395. Suzuki A, Kanayama Y, Yamaki S Occurrence of two sucrose synthase isozymes during maturation of Japanese pear fruit // *J. Amer. Soc. Hort. Sci*. 1996. Vol. 121. P. 943-947.
396. Takeda H., Niikura M., Narumi A., Aoki H., Sasaki T., Shimada H. Phosphorylation of rice sucrose synthase isoforms promotes the activity of sucrose degradation // *Plant Biotechnol*. 2017. Vol. 34. P. 107-113.
397. Tamaki V., Mercier H. Cytokinins and auxin communicate nitrogen availability as long-distance signal molecules in pineapple (*Ananas comosus*) // *J. Plant Physiol*. 2007. Vol. 164. P. 1543-1547.

398. Tanase K., Yamaki S. Purification and characterization of two sucrose synthase isoforms from Japanese pear fruit // *Plant Cell Physiol.* 2000. Vol. 41. P. 408-414.
399. Tang G.Q., Luscher M., Sturm A. Antisense repression and vacuolar and cell wall invertase in transgenic carrot alters early plant development and sucrose partitioning // *The Plant Cell.* 1999. Vol. 11. P. 1-14.
400. Tang X., Su T., Han M., Wei L., Wang W., Yu Z., Xue Y., Wei H., Du Y., Greiner S., Rausch T., Liu L. Suppression of extracellular invertase inhibitor gene expression improves seed weight in soybean (*Glycine max*) // *Journal of Experimental Botany.* 2017. Vol. 68. №. 3 P. 469-482.
401. Tauberger E., Fernie A.R., Emmermann M., Renz A., Kossmann J., Willmitzer L., Trethewey R.N. Antisense inhibition of plastidial phosphoglucomutase provides compelling evidence that potato tuber amyloplasts import carbon from the cytosol in the form of glucose-6-phosphate // *Plant J.* 2000. Vol. 23. P. 43-53.
402. Tian Q.Y. Sun P., Zhang W.H. Ethylene is involved in nitrate-dependent root growth and branching in *Arabidopsis thaliana* // *New Phytol.* 2009. Vol. 184. P. 918-931.
403. Tiessen A., Hendriks J.H.M., Stitt M., Branscheid A., Gibon Y., Farre E.M., Geigenberger P. Starch synthesis in potato tubers is regulated by post-translational redox modification of ADP-glucose pyrophosphorylase: a novel regulatory mechanism linking starch synthesis to the sucrose supply // *Plant Cell.* 2002. Vol. 14. P. 2191–2213.
404. Tiessen A., Padilla-Chacon D. Subcellular compartmentation of sugar signaling: links among carbon cellular status, route of sucrolysis, sink-source allocation, and metabolic partitioning // *Front. Plant. Sci.* 2013. Vol. 3. P. 1-6.
405. Tognetti J.A., Pontis H.G., Martinez-Noel G.M.A. Sucrose signaling in plants: a world yet to be explored // *Plant Signaling and Behavior* 2013. Vol. 8. P. 1-10.
406. Tomé F., Nägele T., Adamo M., Garg A., Marco-Illorca C., Nukarinen E., Pedrotti L., Peviani A., Simeunovic A., Tatkiewicz A., Tomar M., Gamm M. The low energy signaling network // *Front Plant Sci.* 2014. Vol. 5. P 353.
407. Truernit E. Phloem imaging // *J. Exp. Bot.* 2014. Vol. 65. P. 1681-1688.
408. Truernit E., Bauby H., Dubreucq B., Grandjean O., Runions J., Barthélémy J., Palauqui J.-C. High-resolution whole-mount imaging of three-dimensional tissue organization and gene

- expression enables the study of phloem development and structure in *Arabidopsis* // *Plant Cell*. 2008. Vol. 20. P. 1494-1503.
409. Truernit E., Sauer N. The promoter of the *Arabidopsis thaliana* SUC2 SUCROSE-H⁺ SYMPORTER gene directs expression of beta-Glucuronidase to the phloem: evidence for phloem loading and unloading by SUC2 // *Planta*. 1995. Vol. 196. P. 564-570.
410. Tucker C.M., Evert R.F. Seasonal development of the secondary phloem in *Acer negundo* // *Am. J. Bot.* 1969. Vol. 56. P. 275-284.
411. Tymowska-Lalanne Z, Kreis M. The plant invertases: physiology, biochemistry and molecular biology // *Advances in Botanical Research*. 1998. Vol. 28. P. 71-117.
412. Uggla C., Magel E., Moritz T., Sundberg B. Functions and dynamics of auxin and carbohydrates during earlywood/latewood transition in Scots pine // *Plant Physiol*. 2001. Vol. 125. P. 2029-2039.
413. Usadel B., Bläsing O.E., Gibon Y., Poree F., Höhne M., Günther M., Trethewey R., Kamlage B., Poorter H., Stitt M. Multilevel genomic analysis of the response of transcripts enzyme activities and metabolites in *Arabidopsis* rosettes to a progressive decrease of temperature in the non-freezing range // *Plant Cell Environ*. 2008. Vol. 31: P. 518-547.
414. Varkonyi-Gasic E, White D.W. The white clover enod40 gene family. Expression patterns of two types of genes indicate a role in vascular function // *Plant Physiol*. 2002. Vol. 129. P. 1107-1118.
415. Vuylsteker C., Brigitte Huss B., Rambour S. Nitrate reductase activity in chicory roots following excision // *J. Exp. Bot.* 1997a. V. 48. P. 59-65.
416. Vuylsteker C., Leleu O., Rambour S. Influence of BAP and NAA on the expression of nitrate reductase in excised chicory roots // *J. Exp. Bot.* 1997b. V. 48. P. 1079-1085.
417. Walch-Liu P., Ivanov I.I., Filleur S., Gan Y., Remans T., Forde B.G. Nitrogen regulation of root branching // *Ann. Bot.* 2006. Vol. 97. P. 875-881.
418. Walch-Liu P., Neumann G., Bangerth F., Engels C. Rapid effects of nitrogen form on leaf morphogenesis in tobacco // *J. Exp. Bot.* 2000. Vol. 51. P. 227-237.
419. Wang H.X., Weerasinghe R.R., Perdue T.D., Cakmakci N.G., Taylor J.P., Marzluff W.F., Jones A.M. A Golgi-localized hexose transporter is involved in heterotrimeric G protein-mediated early development in *Arabidopsis* // *Mol. Biol. Cell*. 2006. Vol. 17. P. 4257-4269.

420. Wang L., Cook A., Patrick J.W., Chen X.Y., Ruan Y.L. Silencing the vacuolar invertase gene *GhVIN1* blocks cotton fiber initiation from the ovule epidermis, probably by suppressing a cohort of regulatory genes via sugar signaling // *Plant J.* 2014. Vol. 78. P. 686-696.
421. Wang L., Ruan Y. Regulation of cell division and expansion by sugar and auxin signaling // *Frontiers in Plant Science.* 2013. Vol. 4. P. 1-9.
422. Wang L., Ruan Y.L. New insights into roles of cell wall invertase in early seed development revealed by comprehensive spatial and temporal expression patterns of *GhCWNI* in cotton // *Plant Physiology.* 2012. Vol. 160. P. 777-787.
423. Wang R., Guan P., Chen M., Xing X., Zhangand Y., Crawford N. M. Multiple regulatory elements in the *Arabidopsis NIA1* promoter act synergistically to form a nitrate enhancer // *Plant Physiology.* 2010. Vol. 154. P. 1423-1432.
424. Wang R., Guegler K., Labrie S.T., Crawford N.M. Genomic analysis of a nutrient response in *Arabidopsis* reveals diverse expression patterns and novel metabolic and potential regulatory genes induced by nitrate // *Plant Cell.* 2000. Vol. 12. P. 1491-1509.
425. Wang R., Okamoto M., Xing X., Crawford N. M. Microarray analysis of the nitrate response in *Arabidopsis* roots and shoots reveals over 1,000 rapidly responding genes and new linkages to glucose, trehalose-6-phosphate, iron, and sulfate metabolism // *Plant Physiology.* 2003. Vol. 132. P. 2556-2567.
426. Wang X.Q., Zheng L.L., Lin H., Yu F., Sun L.H., Li L.M. Grape hexokinases are involved in the expression regulation of sucrose synthase- and cell wall invertase-encoding genes by glucose and ABA // *Plant Mol Biol.* 2017. Vol. 94. P. 61-78.
427. Weber H., Borisjuk L., Heim U., Buchner P., Wobus U. Seed coat-associated invertases of fava bean control both unloading and storage functions: cloning of cDNAs and cell type-specific expression // *Plant Cell.* 1995. Vol. 7. P. 1835-1846.
428. Weber H., Borisjuk L., Wobus U. Controlling seed development and seed size in *Vicia faba*: a role for seed coat-associated invertases and carbohydrate state // *The Plant Journal.* 1996. Vol. 10. P. 823-834.
429. Weber H., Borisjuk L., Wobus U. Molecular physiology of legume seed development // *Annu. Rev. Plant Biol.* 2005. Vol. 56. P. 253-279.

430. Wei Z., Qu Z., Zhang L., Zhao S., Bi Z., Ji X., Wang X., Wei H. Overexpression of *Poplar* xylem sucrose synthase in tobacco leads to a thickened cell wall and increased height // PLoS ONE. 2015. Vol. 10(3). e0120669.
431. Welham T., Pike J., Horst I., Flemetakis E., Katinakis P., Kaneko T., Sato S., Tabata S., Perry J., Parniske M., Wang T.L. A cytosolic invertase is required for normal growth and cell development in the model legume, *Lotus japonicas* // J. Exp. Bot. 2009. Vol. 60. pp. 3353-3365.
432. Werner T., Schmülling T. Cytokinin action in plant development // Curr Opin Plant Biol 2009. V. 12. P. 527-538.
433. Whitford R., Fernandez A., De Groodt R., Ortega E., Hilson P. Plant CLE peptides from two distinct functional classes synergistically induce division of vascular cells // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2008. Vol. 105. P. 18625-18630.
434. Winter H., Huber J.L., Huber S.C. Identification of sucrose synthase as an actin-binding protein // FEBS Lett. 1998. Vol. 430. P. 205-208.
435. Winter H., Huber J.L., Huber S.C. Membrane association of sucrose synthase: changes during the gravi response and possible control by protein phosphorylation // FEBS Lett. 1997. Vol. 420. P. 151-155.
436. Winter H., Huber S.C. Regulation of sucrose metabolism in higher plants: localization and regulation of activity of key enzymes // Crit. Rev. Plant Sci. 2000. Vol. 19. P. 31-67.
437. Winter H., Huber S.C. Sucrose metabolism and the actin cytoskeleton: SuSy as actin-binding protein // Actin: a dynamic framework for multiple plant cell functions. Developments in plant and soil sciences / Eds. Staiger C.J., Baluška F., Volkmann D., Barlow P.W. Dordrecht: Springer, 2013. P. 119-128.
438. Wobus U., Weber H. Sugars as signal molecules in plant seed development // Biological Chemistry. 1999. Vol. 380. P. 937-944.
439. Wong B.L., Baggett K.L., Rye A.H. Seasonal patterns of reserve soluble carbohydrates in mature sugar maple (*Acer saccharum*) // Can. J. Bot. 2003. Vol. 81. P. 780-788.
440. Wu L.; Joshi C.P.; Chiang V.L. A xylem-specific cellulose synthase gene from aspen (*Populus tremuloides*) is responsive to mechanical stress // Plant J. 2000. Vol. 22. P. 495-502.

441. Wu L.L., Song I., Kim D., Kaufmann P.B. Molecular basis of the increase in invertase activity elicited by gravistimulation of oat-shoot pulvini // *J. of Plant Physiology*. 1993. Vol. 142. P. 179-183.
442. Xiao W., Sheen J., Jang J.C. The role of hexokinase in plant sugar signal transduction and growth and development // *Plant Mol. Biol.* 2000. Vol. 44. P. 451–461.
443. Xiao X., Tang C., Fang Y., Yang M., Zhou B., Qi J., Zhang Y. Structure and expression profile of the sucrose synthase gene family in the rubber tree: indicative of roles in stress response and sucrose utilization in the laticifers // *FEBS J.* 2014. Vol. 281. P. 291-305.
444. Xu J., Avigne W.T., McCarty D.R., Koch K.E. A Similar dichotomy of sugar modulation and developmental expression affects both paths of sucrose metabolism: evidence from a maize Invertase gene family // *The Plant Cell*. 1996. Vol. 8. P. 1209-1220.
445. Xu J., Pemberton G.H., Almira E.C., McCarty D.R., Koch K.E. The *Ivr1* gene for invertase from maize // *Plant Physiol.* 1995. Vol. 108. P. 1293–1294.
446. Yamaguchi M., N. Goue, H. Igarashi, M. Ohtani, Y. Nakano, J. C. Mortimer, N. Nishikubo, M. Kubo, Y. Katayama, K. Kakegawa, P. Dupree, T. Demura. VASCULAR-RELATED NAC-DOMAIN 6 and VASCULAR-RELATED NAC-DOMAIN 7 Effectively Induce Transdifferentiation into Xylem Vessel Elements under Control of an Induction System // *Plant Physiology*. 2010. Vol. 153. P. 906–914.
447. Yamasaki H., Sakihama Y. Simultaneous production of nitric oxide and peroxynitrite by plant nitrate reductase: in vitro evidence for the NR-dependent formation of active nitrogen species // *FEBS Letters*. 2000. Vol. 468. P. 89-92.
448. Yanagisawa S., Yoo S.-D., Sheen J. Differential regulation of EIN3 stability by glucose and ethylene signalling in plants // *Nature*. 2003. Vol. 425. P. 521-525.
449. Ye Z.H., Zhong R. Molecular control of wood formation in trees // *J. Exp. Bot.* 2015. Vol. 66. P. 4119-4131.
450. Yelle S., Chetelat R.T., Dorais M., DeVerna J.W., Bennett A.B. Sink metabolism in tomato fruit. IV. Genetic and biochemical analysis of sucrose accumulation // *Plant Physiol.* 1991. V. 95. P. 1026-1035.
451. Yu S-M. Cellular and genetic responses of plants to sugar starvation // *Plant Physiol.* 1999. Vol. 121. P. 687-693.

452. Yuan M., Wang S. Rice MtN3/saliva family genes and their homologues in cellular organisms // *Molecular Plant*. 2013. Vol. 6. P. 665-674
453. Zanon M.I., Osorio S., Nunes-Nesi A., Carrari F., Lohse M., Usadel B., Kühn C., Bleiss W., Giavalisco P., Willmitzer L., Sulpice R., Zhou Y-H., Fernie A.R. RNA interference of LIN5 in tomato confirms its role in controlling brix content, uncovers the influence of sugars on the levels of fruit hormones, and demonstrates the importance of sucrose cleavage for normal fruit development and fertility // *Plant Physiol*. 2009. Vol. 150. P. 1204-1218.
454. Zeng Y., Wu Y., Avigne W.T., Koch K.E. Rapid repression of maize invertases by low oxygen: invertase/sucrose synthase balance, sugar signalling potential, and seedling survival // *Plant Physiol*. 1999. Vol. 121. P. 599-608.
455. Zhang C., Han L., Slewinski T. L., Sun J., Zhang J., Wang Z-Y., Turgeon R. Symplastic phloem loading in poplar // *Plant Physiol*. 2014. Vol. 166. P. 306-313.
456. Zhang D., Xu B., Yang X., Zhang Z., Li B. The sucrose synthase gene family in *Populus*: structure, expression, and evolution // *Tree Genet. Genome*. 2011. Vol. 7. P. 443-456.
457. Zhang J., Nieminen K., Serra J.A.A., Helariutta Y. The formation of wood and its control // *Current Opinion in Plant Biology*. 2014. Vol. 17. P. 56-63.
458. Zhang L., Cohn N.S., Mitchell J.P. Induction of a pea cell-wall invertase gene by wounding and its localized expression in phloem // *Plant Physiol*. 1996. Vol. 112. P. 1111-1117.
459. Zhang X.Q., Lund A.A., Sarath G., Cerny R.L., Roberts D.M., Chollet R. Soybean nodule sucrose synthase (nodulin-100): further analysis of its phosphorylation using recombinant and authentic root-nodule enzymes // *Arch. Biochem. Biophys*. 1999. Vol. 371. P. 70-82.
460. Zhang X.Y., Wang X.L., Wang X.F., Xia G.H., Pan Q.H., Fan R.C., Wu F.Q., Yu X.C., Zhang D.P. A shift of phloem unloading from symplasmic to apoplasmic pathway is involved in developmental onset of ripening in grape berry // *Plant Physiol*. 2006. Vol. 142. P. 220-232.
461. Zhang Y., Primavesi L.F., Jhurrea D., Andralojc P.J., Mitchell R.A., Powers S.J., Schluempmann H., Delatte T., Wingler A., Paul M.J. Inhibition of SNF1-related protein kinase1 activity and regulation of metabolic pathways by trehalose-6-phosphate // *Plant Physiol*. 2009. Vol. 149. P. 1860-1871.

462. Zhong R., Ye Z.H. Regulation of cell wall biosynthesis // *Curr. Opin. Plant Biol.* 2007. Vol. 10. P. 564-572.
463. Zhou J., Fritz L. Okadaic acid antibody localizes to chloroplasts in the DSP-toxin-producing dinoflagellates *Prorocentrum lima* and *Prorocentrum maculosum* // *Phycologia*. 1994. Vol. 33. P. 455-461.
464. Zimmermann M.H., Ziegler H. List of sugars and sugar alcohols in sieve-tube exudates: Transport in plants // *Encyclopedia of plants physiology. N.s. I. Phloem Transport*. Eds. M.H. Zimmermann, J.A. Milburn. Berlin: Springer, 1975. P. 480-503.
465. Zouaghi M., Rollin P. Phytochrome control of β -fructosidase activity in radish // *Phytochemistry*. 1976. Vol. 15. P. 897-901.
466. Zrenner R., Salanoubat M., Willmitzer L., Sonnewald U. Evidence of the crucial role of sucrose synthase for sink strength using transgenic potato plants (*Solanum tuberosum* L.) // *The Plant Journal*. 1995. Vol. 7. N1. P. 97 – 107.