

Федеральное Государственное Бюджетное Учреждение Науки
Институт леса Карельского Научного Центра
Российской Академии Наук

На правах рукописи



Мощенская Юлия Леонидовна

АКТИВНОСТЬ САХАРОЗОСИНТАЗЫ
В ХОДЕ КСИЛОГЕНЕЗА ДВУХ ФОРМ *BETULA PENDULA* ROTH,
РАЗЛИЧАЮЩИХСЯ ПО ТЕКСТУРЕ ДРЕВЕСИНЫ

03.01.05 – «Физиология и биохимия растений»

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель: д.б.н. Новицкая Л.Л.

Петрозаводск-2017

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	5
ВВЕДЕНИЕ	6
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	11
1.1 Ксилогенез у древесных растений.....	11
1.1.1 Типы структурных элементов ксилемы	12
1.1.2 Клеточные стенки структурных элементов ксилемы	14
1.1.3 Программируемая клеточная смерть.....	17
1.2 Формы березы повислой (<i>Betula pendula</i> Roth) – ценные объекты для изучения механизмов ксилогенеза древесных растений	18
1.2.1 Гистологический состав древесины березы повислой	18
1.2.2 Строение клеточных стенок древесины березы повислой	20
1.2.3 Особенности строения древесины карельской березы	21
1.2.4 Некоторые метаболические особенности тканей ствола карельской березы	22
1.3 Ферменты метаболизма сахарозы.....	23
1.3.1 Функции сахарозорасщепляющих ферментов в растительном организме	23
1.3.2 Гены, кодирующие сахарозосинтазу.....	27
1.3.3 Регуляция активности и экспрессии генов сахарозосинтазы	29
1.4 Основные выводы по обзору литературы и перспективы исследований.....	30
Глава 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	32
2.1 Объекты исследования	32
2.2 Методы исследования	35
2.2.1 Определение активности сахарозосинтазы	35
2.2.2 Определение содержания растворимых углеводов	35
2.2.3 Определение содержания крахмала	36
2.2.4 Определение содержания целлюлозы	36
2.2.5 Определение уровня экспрессии генов	36
2.2.6 Статистическая обработка данных	39
Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ	40
3.1 Активность сахарозосинтазы в период камбиального роста	40
3.1.1 Ксилема и флоэма ствола обычной березы повислой и карельской березы с признаками развития структурных аномалий.....	40

3.1.2 Ксилема ствола деревьев обычной березы повислой и деревьев карельской березы с разной степенью развития структурных аномалий	43
3.2 Активность сахарозосинтазы на разных этапах вегетационного периода	47
3.2.1 Ксилема и флоэма ствола безузорчатых и узорчатых деревьев карельской березы	47
3.2.2 Ксилема и флоэма ствола деревьев обычной березы повислой и узорчатых деревьев карельской березы	52
3.3 Активность сахарозосинтазы в раннем онтогенезе обычной березы повислой и карельской березы	62
3.3.1 Сеянцы в возрасте 1,5 месяцев	62
3.3.2 Сеянцы в возрасте 5 месяцев	63
3.3.3 Пятимесячные сеянцы, выращенные при дефиците азота	65
3.4 Экспрессия генов, кодирующих изоформы сахарозосинтазы, в ходе ксилогенеза обычной березы повислой и карельской березы	67
3.4.1 Ксилема ствола 10-летних деревьев обычной березы повислой и деревьев карельской березы с разной степенью развития структурных аномалий	67
3.4.2 Стебель сеянцев обычной березы повислой и карельской березы	69
Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ	71
4.1 Активность сахарозосинтазы на разных этапах вегетационного периода	71
4.2 Различия в активности сахарозосинтазы между ксилемой и флоэмой ствола деревьев березы повислой	72
4.3 Различия в активности сахарозосинтазы при нормальном и аномальном ксилогенезе у деревьев березы повислой	72
4.4 Участие сахарозосинтазы в синтезе целлюлозы	74
4.5 Активность сахарозосинтазы и структурные особенности ксилемы березы повислой	75
4.6 Деятельность камбия в сторону ксилемы и флоэмы	76
4.7 Роль сахарозосинтазы в создании акцепторной силы ксилемы	78
4.8 Активность сахарозосинтазы и содержание крахмала	80
4.9 Изоформы сахарозосинтазы при нормальном и аномальном ксилогенезе березы повислой	83
4.10 Активность сахарозосинтазы на ранних этапах онтогенеза березы повислой	84
4.11 Особенности активности сахарозосинтазы на фоне дефицита азота	86

ЗАКЛЮЧЕНИЕ	88
ВЫВОДЫ.....	90
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	91

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АДФ	аденозиндифосфат
АДФГ	аденозиндифосфат-глюкоза
АТФ	аденозинтрифосфат
Глю	глюкоза
Инв	инвертаза
кДНК	комплементарная дезоксирибонуклеиновая кислота
мРНК	матричная рибонуклеиновая кислота
НАДФ	никотинамидадениндинуклеотидфосфат
ПКС	программируемая клеточная смерть
РР	пирофосфат
СС	сахарозосинтаза
Трис	трис(гидроксиметил)аминометан
тРНК	тотальная рибонуклеиновая кислота
УДФ	уридиндифосфат
УДФГ	уридиндифосфат-глюкоза
Фру	фруктоза
ЭГТА	этиленгликоль тетрауксусная кислота
ЭДТА	этилендиаминтетрауксусной кислоты
DTT	дителиотреитол
Нерес	N-2-гидроксиэтилпиперазин-N'-2-этансульфоновая кислота
PMSF	фенилметилсульфонилфторид
RQ	относительный уровень транскрипции

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы

В настоящее время одной из важных задач в области физиологии и биохимии растений является изучение механизмов ксилогенеза и продуктивности древесных растений.

В основе ксилогенеза лежит процесс фиксации углерода в составе полимерных компонентов клеточных стенок ксилемы (целлюлозы, гемицеллюлоз, пектиновых веществ, лигнина). Главным источником углерода для биосинтеза полисахаридов является сахароза. Использование сахарозы в метаболизме акцепторных тканей возможно лишь после ее предварительного расщепления инвертазой или сахарозосинтазой (Koch, Zeng, 2002; Sturm, Tang, 1999; Winter, Huber, 2000). У древесных растений при интенсивной дифференцировке ксилемных производных камбия сахарозосинтаза является основным ферментом, создающим акцепторную силу растущих тканей ствола (Nauch, Magel, 1998; Hertzberg et al., 2001; Coleman et al., 2009). Она катализирует обратимую реакцию превращения сахарозы в присутствии УДФ во фруктозу и УДФ-глюкозу, последняя служит субстратом для биосинтеза целлюлозы. Мембраносвязанная форма сахарозосинтазы входит в состав целлюлозосинтазного комплекса, где УДФ-глюкоза сразу вовлекается в синтез целлюлозы (Delmer, Amor, 1995; Brill et al., 2011).

Несмотря на большое количество работ, посвященных изучению активности сахарозосинтазы (Winter, Huber, 2000; Hertzberg et al., 2001; Koch, Zeng, 2002; Coleman et al., 2008, 2009, 2010 и др.), существует очень мало данных о роли фермента в распределении углерода в акцепторных органах древесных растений. Малоизученным остается вопрос об активности фермента и экспрессии генов сахарозосинтазного ряда при разных сценариях ксилогенеза.

Одним из основных подходов к познанию закономерностей роста и развития растений является изучение отклонений от нормы. В этом отношении большой интерес для изучения камбиального роста древесных растений представляет форма березы повислой (*Betula pendula* Roth) – карельская береза (*B. pendula* Roth var. *carelica* (Mercl.) Hämet-Ahti), обладающая высокодекоративной аномальной по строению древесиной. Из всех древесных пород структурные аномалии тканей ствола выражены у нее 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). Известно, что естественный дискретный ареал карельской березы совпадает с участками относительно невысокого плодородия почвы (Новицкая, 2008). Исследования, проведенные на деревьях березы повислой, произрастающих на разных по плодородию почвах, показали, что увеличение содержания экзогенных нитратов в почве приводит к нормализации строения древесины березы повислой. Было выдвинуто предположение, что ограничение ареала карельской березы со стороны плодородных почв может быть обусловлено смещением зоны интенсивного апопластного усвоения сахарозы в сторону флоэмы под влиянием высоких доз азотного питания (Галибина и др., 2016).

Существует гипотеза, что оригинальная текстура древесины карельской березы формируется в результате отклонений в деятельности камбия, вызванных накоплением избыточных количеств сахарозы в проводящей флоэме и камбиальной зоне (Новицкая, 1997, 1999, 2008; Novitskaya, Kushnir, 2006). В зонах развития структурных аномалий не запускается программа гибели клеток, приводящая к формированию сосудов и трахеид ксилемы и ситовидных трубок флоэмы; дифференцирующиеся камбиальные производные сохраняют протопласт и превращаются в клетки запасующей паренхимы, которые накапливают большие количества липидов и таннинов (Novitskaya, Kushnir, 2006). Визуально нарушение дифференцировки проводящих элементов ксилемы и флоэмы выражается в появлении крупных скоплений паренхимных клеток, образующих на спилах древесины характерный узор.

Изучение активности сахарозосинтазы у форм березы повислой с нормальным и аномальным строением древесины может быть полезным с точки зрения познания механизмов ксилогенеза древесных растений. Наряду с этим, проведение таких исследований представляется важным для выявления причин развития морфогенетических аномалий карельской березы.

Состояние исследований

В литературе имеется множество данных о роли сахарозосинтазы в формировании компонентов клеточной стенки и накоплении запасных метаболитов (Kladnik et al., 2005; Andersson-Gunneras et al., 2006; Barratt, 2009; Nilsson et al., 2010; Coleman et al., 2010; An, 2014; Gerber et al., 2014). Большинство работ по изучению

активности сахарозосинтазы и кодирующих ее генов проводилось на травянистых растениях (Echt, Chourey, 1985; Winter et al., 1998; Tanase, Yamaki, 2000; Haigler et al., 2001; Ruan et al., 2003; Baud et al., 2004; Coleman, 2006; Bieniawska et al., 2007; Barratt et al., 2009; Patrick et al., 2013 и др.). На растениях гороха показано позитивное влияние нитратного азота на активность сахарозосинтазы в акцепторных тканях (Брускова и др., 2009; Никитин, Измайлов, 2016).

На древесных растениях исследование сахарозосинтазной активности и экспрессии кодирующих ее генов проводились в основном на растениях тополя (Zhang., 2011; Gerber, 2014). Показана специфичность экспрессии генов *SUS1*, *SUS2* и *SUS3* для ксилемы древесных растений (Geisler-Lee et al., 2006; Zhang., 2011; Gerber, 2014).

Цель и задачи исследования

Целью данной работы является сравнительное изучение деятельности сахарозосинтазы, – ключевого фермента углеводного обмена, у растений обычной березы повислой (*Betula pendula* Roth var. *pendula*) с нормальным строением древесины и карельской березы (*B. pendula* Roth var. *carelica* (Mercl.) Hämet-Ahti), отличающейся аномальной структурой древесины, для определения роли фермента в протекании ксилогенеза древесных растений.

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

1. в период активного камбиального роста исследовать активность сахарозосинтазы в тканях ствола деревьев березы повислой с нормальным и аномальным строением древесины;
2. изучить активности сахарозосинтазы у взрослых деревьев обычной березы повислой и карельской березы с разной степенью узорчатости древесины на разных этапах вегетационного периода;
3. исследовать активность сахарозосинтазы в раннем онтогенезе березы повислой;
4. изучить уровень экспрессии кодирующих сахарозосинтазу генов у взрослых растений и семян березы повислой.

Научная новизна и практическая значимость работы

Впервые выявлена обратная зависимость между активностью сахарозосинтазы и степенью проявления признаков аномального морфогенеза у деревьев березы повислой;

показаны различия в активности сахарозосинтазы у растений, выращенных из семян обычной березы повислой и карельской березы, на ранних этапах онтогенеза; обнаружены различные уровни транскрипции генов *SUS1*, *SUS2* *SUS3* у деревьев, отличающихся по степени проявления признаков узорчатости древесины.

Изучение деятельности основных сахарозорасщепляющих ферментов необходимо для понимания механизмов формирования древесины растений. Фермент сахарозосинтаза определяет включение сахарозы в метаболизм клеток камбиальной зоны древесных растений, влияя, тем самым, на строение и качество древесины.

В диссертационной работе описаны биохимические механизмы регуляции метаболизма сахарозы в связи с образованием высокодекоративной древесины карельской березы. Полученные данные могут быть использованы при поиске путей управления этим процессом.

Положения, выносимые на защиту

1. Деревья обычной березы повислой и карельской березы различаются по активности сахарозосинтазы в тканях ствола. Низкий уровень активности фермента в ксилеме коррелирует с проявлением признаков аномального морфогенеза древесины карельской березы.

2. Активность сахарозосинтазы в тканях ствола березы повислой коррелирует с интенсивностью камбиального роста. Наиболее высокая активность исследуемого фермента наблюдается в тканях с высоким содержанием целлюлозы и поддерживается за счет высокой экспрессии гена *SUS1*, кодирующего изоформу SuSy1.

3. Различия активностей сахарозосинтазы в тканях ствола разных форм березы повислой проявляются уже в раннем онтогенезе и определяются не только эндогенными, но и экзогенными факторами, в частности, уровнем доступного азота.

Апробация работы

Материалы диссертации были представлены на II (X) Международной Ботанической Конференции молодых ученых (Санкт-Петербург, 2012); 18-й Международной Пущинской школе-конференции «Биология - Наука XXI века» (Пущино, 2014); Международной конференции и школе молодых ученых «Физиология растений – теоретическая основа инновационных агро- и фитобиотехнологий» (Калининград, 2014); Всероссийской конференции с международным участием

«Растения в условиях глобальных и локальных природно-климатических и антропогенных воздействий» (Петрозаводск, 2015); Научной конференции с международным участием и школе молодых ученых «Сигнальные системы растений: от рецептора до ответной реакции организма» (Санкт-Петербург, 2016); Fourth International Symposium «Plant Signaling and Behavior». (Saint Petersburg, 2016); IV Российском симпозиуме с международным участием «Фитоиммунитет и клеточная сигнализация у растений» (Казань, 2016).

Личный вклад автора в проведенные исследования

Автором проведен анализ отечественной и зарубежной литературы по теме проводимых исследований. Автор лично принимала участие в разработке темы, в планировании и постановке экспериментов, в сборе экспериментальных данных и обработке полученных результатов, в подготовке публикаций по теме диссертационной работы и представлении результатов на научных конференциях.

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 12 работ, в том числе 4 статьи в рецензируемых журналах из списков ВАК (2 – Scopus и Web of Science).

Структура и объем работы

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследования, результатов, обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Список литературы включает 200 наименований, из них 160 на иностранных языках. Диссертация изложена на 108 страницах машинописного текста, содержит 2 таблицы и 39 рисунков.

Благодарности

Автор выражает благодарность научному руководителю д.б.н. Новицкой Л.Л. за поддержку и консультации на протяжении всех этапов выполнения работы, к.б.н. Галибиной Н.А. за неоценимую помощь в планировании лабораторных исследований и обсуждение полученных результатов. Автор хотел бы поблагодарить Софронову И.Н., Подгорную М.Н., Коржову М.А. и Никерову К.М. за помощь в проведении биохимических исследований и сборе экспериментального материала.

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Ксилогенез у древесных растений

Ксилогенез – процесс формирования ксилемы (древесины), включает в себя образование ее структурных элементов и синтез полимерных компонентов клеточной стенки. Продукция ксилогенеза – древесина, составляет до 80% биомассы дерева, поэтому поиск путей эффективного управления этим процессом является весьма актуальным с точки зрения повышения продуктивности древесных растений (Никишов, 1985).

В состав ксилемы входят структурные элементы, выполняющие водопроводящую, опорно-механическую и запасающую функции. Из перечисленных функций следует, что изменение количественного соотношения ксилемных элементов влияет как на качество древесины, так и на рост, развитие и продуктивность дерева в целом.

Формирование ксилемы происходит в результате деятельности камбия (Larson, 1994; Telewski et al., 1996; Sterky et al., 1998). Камбий является латеральной меристемой, деятельность которой приводит к образованию вторичной ксилемы и вторичной флоэмы (Philipson et al., 1971; Sachs, 1981; Savidge, Wareing, 1981; Fahn, 1982; Larson, 1982). Он дает начало клеткам-предшественникам всех типов структурных элементов проводящих тканей.

Термин «камбий» обычно используют для обозначения непосредственно камбиальных инициалей. Совокупность камбиальных инициалей и материнских клеток ксилемы и флоэмы называют «камбиальной зоной» (Lachaud др., 1999; Prislán et al., 2013). Камбий содержит два морфологически различных типа клеток: веретеновидные клетки, вытянутые в аксиальном направлении, и лучевые клетки, имеющие изодиаметрическую форму. Первые дают начало осевым, а вторые – радиальным элементам вторичной ксилемы и флоэмы (Prislán et al., 2013). Принадлежность клеток камбия к тому или иному типу определяется, в большей степени, сигналами позиционной системы контроля, а не преимуществом в ряду клеточных поколений, поскольку довольно часто наблюдается взаимопревращение веретеновидных и лучевых клеток (Larson, 1994; Mellerowicz et al., 2001).

В результате каждого цикла деления клетки в радиальном направлении образуются новые материнские клетки ксилемы или флоэмы (Catesson, 1994). Таким образом, формирование проводящих тканей определяется числом делящихся камбиальных клеток, а также тем, как быстро новые клетки проходят стадии дифференциации и выходят за пределы камбиальной зоны (Uggla et al., 1998; Mellerowicz et al., 2001; Prislán et al., 2013).

Процессы формирования ксилемы и флоэмы не являются заранее запрограммированными. Характер и направленность дифференцировки клеток камбия легко изменяются под влиянием взаимодействий генотипа и окружающей среды (Savidge, 2000) и требуют четкой системы контроля, которая бы определяла радиальную структуру зоны деления (Uggla et al., 1998; Savidge, 2000). Обычно деятельность камбия в сторону ксилемы идет более активно, что объясняет значительное превосходство данной ткани по массовой и объемной доле, по сравнению с флоэмой. Отношение ксилема/флоэма у большинства видов древесных растений варьирует в пределах 4:1 и 10:1 (Plomion et al., 2001).

Производные камбия в процессе дифференцировки в клетки ксилемы проходят ряд последовательных стадий: а) рост клетки б) отложение многослойной вторичной клеточной стенки в) одревеснение г) запрограммированная клеточная смерть (Savidge, 2000; Plomion et al., 2001).

1.1.1 Типы структурных элементов ксилемы

Трахеальные элементы

Трахеальные элементы ксилемы подразделяют на два основных типа: трахеиды и сосудистые элементы (сосуды и членики сосудов). В зрелом состоянии они имеют удлиненную, вытянутую вдоль оси ствола форму, лишены клеточного содержимого и состоят исключительно из утолщенных лигнифицированных клеточных стенок. (Myburg, Sederoff, 2001; Эверт, 2015). Трахеиды являются неперфорированными структурными элементами, они соединяются между собой посредством пар окаймленных пор. Через окаймленные поры между трахеидами происходит обмен воды и растворенных в ней веществ. Членики сосудов имеют на торцевых концах перфорационные пластинки – участки, на которых отсутствует клеточная стенка (Wheeler et al., 1989; Эверт, 2015). Чаще встречаются простые перфорационные

пластинки с одной большой перфорацией, но также имеют распространение сетчатые перфорационные пластинки с двумя и более перфорациями (Эверт, 2015). У некоторых семейств покрытосеменных встречается лестничный тип перфорационной пластинки (Ohtani et al., 1992). Простые перфорации обладают наименьшим сопротивлением току воды, и, следовательно, максимальной водопроницаемостью (Myburg, Sederoff, 2001).

Волокнистые элементы

Волокна представляют собой удлиненные структурные элементы ксилемы с частично лигнифицированными клеточными стенками. Клеточные стенки волокон, как правило, толще, чем у трахеид (Myburg, Sederoff, 2001; Эверт, 2015). В ксилеме встречаются два типа волокон – волокнистые трахеиды и волокна либриформа. Волокна либриформа, как правило, длиннее и имеют более толстую клеточную стенку, по сравнению с волокнистыми трахеидами. Отличием этих двух типов структурных элементов ксилемы является также наличие у волокнистых трахеид окаймленных пор. Волокна либриформа имеют только простые неокймленные поры щелевидной формы (Эверт, 2015).

Ксилемная паренхима

Клетки, выполняющие в ксилеме функцию запасания, носят название клеток паренхимы (Myburg, Sederoff, 2001). Для вторичной ксилемы характерны два вида паренхимных клеток – клетки осевой (аксиальной) паренхимы и клетки лучевой паренхимы (Эверт, 2015). Клетки осевой паренхимы формируются из веретеновидных инициалей камбия. Паренхимные клетки лучей образуются из лучевых инициалей, их тяжи могут располагаться как вертикально, так и горизонтально оси побега (Эверт, 2015).

У древесных растений клетки ксилемной паренхимы имеют утолщенные лигнифицированные вторичные клеточные стенки (Mellerowicz et al, 2001, Mellerowicz, Sundberg, 2008). У некоторых паренхимных клеток стенки утолщаются и склерифицируются, в данном случае, клетки носят название склерееид.

Зрелые паренхимные клетки ксилемы сохраняют протопласт и накапливают запасные вещества – крахмал, липиды, танины, белки. Эти клетки также играют важную роль в образовании каллуса при ранении и могут редифференцироваться в другие

структурные элементы ксилемы (Myburg, Sederoff, 2001; Эверт, 2015). Содержание запасных веществ в клетках паренхимы сильно варьирует в зависимости от фазы растения (Крамер, Козловский, 1983). Так, у большинства видов древесных растений обнаружено два пика содержания крахмала – весной и осенью. Летом содержание крахмала резко падает вследствие его активной утилизации на ростовые процессы, зимой снижение содержания крахмала обусловлено его преобразованием в сахарозу под воздействием низких температур (Крамер, Козловский, 1983; Kozlowski, Pallardy, 1997; Эверт, 2015). Содержание запасных липидов и белков также имеет значительную сезонную динамику (Kozlowski, Pallardy, 1997).

1.1.2 Клеточные стенки структурных элементов ксилемы

Функции, выполняемые разными типами клеток ксилемы, тесно связаны с образованием вторичной клеточной стенки (Myburg, Sederoff, 2001; Escamez, Tuominen, 2014). Плотность клеток ксилемы – это функция соотношения толщины клеточной стенки к диаметру полости клетки. Таким образом, плотность и, в значительной мере, прочность древесины зависят от количественного соотношения клеток различных типов, а также от толщины клеточной стенки структурных элементов, главным образом волокон (Wheeler, Vaas, 1998). На различных древесных породах показано, что диапазон плотности древесины может варьировать от 120 до 1200 кг/м³ в зависимости от того, какие элементы преобладают в древесине (Dinwoodie, 1975). Эффективность выполняемых ксилемой функций также зависит от соотношения структурных элементов. Так, в составе ранней древесины, формирующейся в начале вегетационного периода, когда необходим активный ксилемный транспорт, преобладают сосуды большого диаметра, в то время как в поздней древесине диаметр сосудов меньше и выше содержание волокон (Dinwoodie, 1975; Gourlay, 1995; Mattos et al., 1999; Tomazello, Silva Cardoso, 1999; Эверт, 2015). На примере сосны показано, что ранняя и поздняя древесина отличаются по толщине клеточной стенки трахеид: толщина клеточной стенки трахеид ранней древесины ~2 мкм, поздней ~10 мкм (Dinwoodie, 1975).

Состав клеточной стенки

Клеточные стенки растений состоят из микрофибрилл целлюлозы, погруженных в матрикс из гемицеллюлоз (ксилан, ксилоглюкан, арабиноксилан, глюкоманан), и

пектинов (рамногалактуронан, арабинан, галактан, гомогалактуронан) (Northcote, 1972; Mellerowicz, Sundberg, 2008; Hobson et al., 2010). Предшественниками для синтеза полисахаридов выступают нуклеозидфосфаты сахаров (Northcote, 1972; Титок и др., 2007). Синтез полисахаридов клеточной стенки регулируется уровнем доступности нуклеозидфосфатов сахаров, их локализацией и возможностью транспорта в направлении клеточной стенки (Northcote, 1972).

Целлюлоза представляет собой полисахарид, молекулы которого построены из остатков D-глюкозы (Титок и др., 2007).

Гемицеллюлозы являются более пластичными полисахаридными структурами, которые собирают микрофибриллы целлюлозы в единую сеть и предотвращают их трение (Медведев, 2004). Гемицеллюлозы в зависимости от того, остатки каких моносахаров входят в их состав, подразделяют на маннаны, галактаны и пентозаны (арабан, ксилан) (Кретович, 1986).

Содержание целлюлозы составляет 40-50% сухой массы древесины, гемицеллюлоз – 20-30% (Schuetz et al., 2013).

Пектины — это кислые полисахариды, имеющие в своем составе полимерную цепь галактуроновой кислоты, а также остатки липидов. Пектины образуют гелевую фазу клеточной стенки растения с погруженными в нее целлюлозой и гемицеллюлозами (Медведев, 2004).

В процессе формирования клеточной стенки наряду с образованием углеводов происходит биосинтез структурных белков и липидов (Fukuda, 1996; Mijnsbrugge, 2000; Myburg, Sederoff, 2001). Структурные белки клеточных стенок представлены в основном экстенсинами, способствующими механической прочности клеточных стенок (Cassab, 1998). Наряду с этим они осуществляют контроль внутриклеточной организации, в частности, организацию микротрубочек (Akashi et al., 1990; Fukuda, 1996), которые, в свою очередь, определяют характер отложения клеточной стенки (Gunning, Hardham, 1982).

Строение клеточной стенки

При делении клеток камбия между ними формируется клеточная пластинка, на которую затем откладываются слои первичной клеточной стенки (клеточной оболочки).

Первичная клеточная стенка формируется до и во время роста клетки (Эверт, 2015). После того, как клетка завершает рост, начинается образование вторичной клеточной стенки (MacAdam, Nelson, 2002; Gritsch, Murphy, 2005). Во вторичных клеточных стенках ксилемы древесных растений четко выделяются три слоя: внешний (S_1), самый толстый – средний слой (S_2) и внутренний слой (S_3). Выделение слоев в клеточной стенке основано на различной ориентации в них микрофибрилл целлюлозы (Frey-Wyssling, 1976).

Одревеснение клеточной стенки

На определенном этапе формирования клеточной стенки структурных элементов ксилемы происходит ее одревеснение – лигнификация (Fukuda, 1996).

Наиболее быстро подвергается одревеснению срединная пластинка и первичная клеточная стенка, затем постепенно происходит лигнификация вторичной клеточной стенки (Myburg, Sederoff, 2001).

Лигнин представляет собой сложный трехмерный полимер, состоящий из ароматических фенольных мономеров, называемых коричневыми спиртами или монолигнолами (Boudet et al., 1995; Myburg, Sederoff, 2001; Vanholme et al., 2008; Neutelings, 2011). У древесных растений доля лигнина в сухой массе древесины составляет 25-35% (Медведев, 2004). Лигнин является гидрофобной структурой за счет ароматического характера его мономеров. Лигнин обеспечивает водонепроницаемость внутренней поверхности вторичной клеточной стенки, что способствует транспорту воды без потерь. Трехмерная природа лигнина обеспечивает жесткость и прочность клеточной стенки, а его химическая стабильность – защиту от патогенных микроорганизмов (Myburg, Sederoff, 2001). Таким образом, лигнификация клеточной стенки играет большую роль в функциональности зрелых трахеальных и волокнистых элементов ксилемы (Schuetz et al., 2013).

Одревеснение клеточных стенок трахеальных и волокнистых элементов происходит с участием клеток паренхимы (Pickett-Heaps, 1968; McCann et al., 2001; Schuetz et al., 2013). В исследованиях Pickett-Heaps (1968) показано, что паренхимные клетки ксилемы способны синтезировать монолигнолы и экспортировать их в клеточную стенку соседствующих с ними одревесневающих клеток. На культуре клеток *Zinnia* продемонстрировано использование клетками ксилемы экзогенных монолигнолов

для синтеза вторичной клеточной стенки, что делает возможным продолжение утолщения клеточной стенки даже после гибели протопласта (Hosokawa et al., 2001; Tokunaga et al., 2005). Таким образом, паренхимные клетки выполняют важную роль в дифференциации водопроводящих и механических элементов ксилемы за счет обеспечения их экзогенными монолигнолами (McCann et al., 2001; Schuetz et al., 2013).

1.1.3 Программируемая клеточная смерть

После завершения формирования вторичной клеточной стенки и ее одревеснения, у трахеальных и волокнистых элементов ксилемы происходит автолиз протопласта. Многие авторы считают это примером программируемой клеточной смерти (ПКС) (Fukuda, 1996; Fukuda et al., 1998; Mittler, 1998; Groover, Jones, 1999; Courtois-Moreau et al., 2009; Эверт, 2015).

Программируемую клеточную смерть животных клеток обозначают термином «апоптоз» (Kerr et al., 1972; Kerr, Harmon, 1991; Bowen, 1993; Durme, Nowack, 2016). В ряде работ показано, что ПКС растительных клеток не обладает всеми признаками, характерными для апоптоза (Lai, Srivastava, 1976; O'Brien, 1981; Lee, Chen, 2002; Watanabe et al., 2002). Поэтому для обозначения гибели клеток в ходе дифференцировки ксилемы мы в дальнейшем будем использовать общий термин «программируемая клеточная смерть».

Сразу после начала утолщения вторичной клеточной стенки в вакуолях будущих трахеальных и волокнистых элементов ксилемы накапливаются гидролитические ферменты – гидролазы (ДНКазы, РНКазы и протеазы). Автолитический процесс начинается после разрыва тонопласта и выхода ферментов из вакуоли в цитоплазму (Myburg, Sederoff, 2001; Эверт, 2015). Гидролазы разрушают участки первичной клеточной стенки, нелигнифицированные участки вторичной стенки и замыкающие пленки пор между трахеальными элементами (Myburg, Sederoff, 2001; Эверт, 2015). Клеточные стенки торцевых концов дифференцирующихся сосудов частично деградируют и превращаются в перфорационные пластинки, через которые осуществляется прямой транспорт воды и минеральных веществ (Fukuda, 1996; Myburg, Sederoff, 2001; Эверт, 2015). Мембраны окаймленных пор трахеид также частично подвергаются лизису. Транспорт воды через окаймленные поры – это единственный способ передвижения воды через трахеиды (Myburg, Sederoff, 2001; Эверт, 2015).

Что касается клеток ксилемной паренхимы, то они, несмотря на сильно утолщенные лигнифицированные клеточные стенки, остаются живыми и функционируют в течение нескольких лет. Это свидетельствует о том, что запрограммированная клеточная гибель не связана непосредственно с одревеснением клеточных стенок (Myburg, Sederoff, 2001; Эверт, 2015).

1.2 Формы березы повислой (*Betula pendula* Roth) – ценные объекты для изучения механизмов ксилогенеза древесных растений

Одним из основных подходов к познанию закономерностей роста и развития растений является изучение отклонений от нормы. Ценными объектами для изучения камбиального роста являются две формы березы повислой – обычная береза повислая (*B. pendula* var. *pendula*) с типичной для вида прямослойной древесиной и карельская береза (*B. pendula* var. *carelica*), обладающая высокодекоративной, аномальной по строению узорчатой древесиной. Из всех древесных пород структурные аномалии тканей ствола выражены у нее 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). На протяжении многих лет две перечисленные формы березы повислой являются одними из основных объектов исследования лаборатории физиологии и цитологии древесных растений Института леса КарНЦ РАН.

1.2.1 Гистологический состав древесины березы повислой

Древесина березы состоит из волокнистых элементов, сосудов, клеток аксиальной и лучевой паренхимы.

В литературе встречаются противоречивые сведения о типе волокнистых элементов в древесине березы. Одни авторы указывают, что прозенхимные элементы в ее древесине представлены сосудами и волокнами, но не уточняют тип волокон (Luostarinen, Verkasalo, 2000; Heräjärvi, 2004; Koch, Schmitt, 2013). Другие говорят о наличии сосудов и волокон либриформа (Касесалу, 1968; Козьмин, 1969; Технеряднов, Данченко, 1969). Третьи считают, что волокнистые элементы в древесине березы представляют собой переходную форму между трахеидами и волокнами либриформа, т.е. являются волокнистыми трахеидами (Барильская, 1978а; Атрохин и др., 1982; Baum,

2001; Schwarze, 2007; Price, Macdonald, 2012). Мы разделяем последнюю точку зрения, поскольку это мнение основывается на результатах электронно-микроскопического анализа (Барильская, 1978а) и данных о мономерном составе лигнина клеточных стенок (Baum, 2001). О том, что эти элементы являются трахеидами, свидетельствуют их умеренно утолщенные (до 3 мкм) оболочки, окаймленные поры в них и приуроченность пор к радиальным стенкам (Барильская, 1978а). Оболочки волокон либриформа обычно толще, и они имеют мелкие щелевидные поры, которые случайно распределяются по клеточной стенке (Pvessalo-Pfaffli, 1995). С другой стороны, окаймленные поры в оболочках волокнистых элементов березы повислой очень редкие, большинство из них имеют щелевидные внутренние отверстия. Это указывает на высокую приспособленность указанных элементов к выполнению опорно-механической функции и о значительном структурном сходстве их с волокнами либриформа (Барильская, 1978а).

Согласно некоторым данным (Кедров, 1965, 1975), наличие либриформа в древесине тесно коррелирует с типом строения камбиальной зоны (наблюдается выраженная ярусность в расположении клеток камбия) и связано с характером размещения клеток аксиальной паренхимы в древесине (преобладает паратрахеальный тип паренхимы). Отсутствие ярусности в камбии березы повислой, а также апотрахеальный тип аксиальной паренхимы в ее древесине служат косвенным подтверждением того факта, что в данном случае основная масса древесины сложена волокнистыми трахеидами (Барильская, 1978а).

Установлено, что лигнин клеточных стенок трахеид и сосудов содержит больше гваяцилпропановых структурных единиц, а клеточных стенок волокон либриформа – сирингилпропановых единиц (Schwarze et al. 2000; Baum, 2001). С помощью ультрафиолетового микроскопа продемонстрировано, что в древесине березы повислой сосуды дают окраску, типичную для высокого уровня «гваяцилового лигнина» (guaiacil lignin), а основная масса древесины сложена элементами с очень низкой концентрацией «сирингилового лигнина» (siringil lignin) (Baum, 2001). Таким образом, особенности мономерного состава лигнина клеточных стенок также указывают на переходный тип волокнистых элементов древесины березы.

1.2.2 *Строение клеточных стенок древесины березы повислой*

Данные по строению клеточных стенок представлены на основе электронно-микроскопического анализа древесины березы повислой, выполненного Л.А. Барильской (Барильская, 1978а, б).

Волокнистые трахеиды

Наружный слой клеточных стенок зрелых волокнистых трахеид, называемый первичной клеточной оболочкой, весьма тонок – толщина его не превышает 0,3 мкм. Внутри от первичной оболочки лежит вторичная оболочка, состоящая из трех слоев – S_1 , S_2 и S_3 . Толщина слоя S_1 колеблется в пределах 0,2-0,4 мкм. Слой S_2 значительно более мощный – 1,6-2,4 мкм. Внутренний слой S_3 выражен очень слабо.

Сосуды

Сосуды состоят из отдельных члеников и имеют больший, по сравнению с волокнистыми трахеидами, диаметр. Кроме того, стенки сосудов сплошь покрыты мелкими порами, расположенными в очередном порядке. В зоне сплошного вторичного утолщения клеточные стенки сосудов по своей ультраструктуре идентичны оболочкам волокнистых трахеид. Однако, слой S_2 вторичной оболочки сосудов существенно \dot{y} же (0,6-1,5 мкм), по сравнению с аналогичным слоем вторичной оболочки волокнистых элементов. Вследствие этого стенки сосудов (0,8-2,0 мкм) в среднем уступают по толщине стенкам волокнистых трахеид (2,0-4,0 мкм).

Сосуды и волокнистые трахеиды у березы различаются по количественному содержанию лигнина. На примере березы бумажной (*Betula papyrifera* Marsh) установлено, что сосуды более лигнифицированы, но в связи с тем, что волокнистые элементы являются преобладающими компонентами древесины, на них приходится 77 % общего количества лигнина, содержащегося в древесине (Fergus, Goring, 1970).

Клетки паренхимы

Клеточные стенки вертикальной (аксиальной) и радиальной (лучевой) паренхимы древесины обычной березы повислой состоят из тех же слоев, что и клеточные стенки волокнистых элементов и сосудов. Однако, они в среднем тоньше, чем у элементов

водопродводящей и механической систем, их средняя толщина составляет 0,6-1,0 мкм (Барильская, 1978а, б).

1.2.3 Особенности строения древесины карельской березы

Специфический рисунок древесины карельской березы образуется сочетанием темно-коричневых включений на светлом фоне основной массы древесины. Электронно-микроскопический анализ показал, что основу темноокрашенных включений составляют клетки паренхимы (Барильская, 1978б). Насыщенность узора зависит от плотности включений, т.е. от количества и размеров скоплений паренхимных клеток. В Таблице 1 представлены данные о процентном содержании анатомических элементов древесины обычной березы повислой (*B. pendula* var. *pendula*) и карельской березы (*B. pendula* var. *carelica*).

Таблица 1. Сравнительная характеристика древесины 10 летних растений *B. pendula* var. *pendula* и *B. pendula* var. *carelica* (данные из монографии А.Я. Любавской, 1978).

Форма березы повислой	Соотношение анатомических элементов, %			
	Волокна	Сосуды	Сердцевинные лучи	Древесная паренхима
<i>B. pendula</i> var. <i>pendula</i>	62,6	23,7	10,3	3,4
<i>B. pendula</i> var. <i>carelica</i> (узорчатая древесина)	48,6	12,8	31,8	6,8
<i>B. pendula</i> var. <i>carelica</i> (нормальная древесина)	54,5	16,4	24,5	4,6

Большое количество паренхимы в древесине карельской березы указывает на переориентацию дифференцировки производных камбия: в зонах развития структурных аномалий не запускается программа гибели клеток, приводящая к формированию сосудов и волокнистых трахеид ксилемы; клетки сохраняют протопласт и превращаются в запасающую паренхиму. В цифровом выражении это выглядит следующим образом: по сравнению с обычной березой повислой, в древесине карельской березы количество сосудов меньше в 12 раз, волокнистых элементов меньше в 3 раза, а паренхимы больше примерно в 6 раз (Любавская, 1978).

1.2.4 Некоторые метаболические особенности тканей ствола карельской березы

Деревья карельской березы различаются по характеру развития узорчатой древесины в ходе онтогенеза (Новицкая, 2008; Kosonen, Markku, 2004; Hagqvist, Mikkola, 2008). Иногда узор формируется только с одной стороны ствола. Образование узорчатой древесины может резко прерываться, после чего камбий образует древесину нормального строения. Или, наоборот, после многих лет относительно нормального роста появляются ярко выраженные структурные аномалии. В некоторых случаях в течение жизни дерева наблюдается несколько смен периодов аномального и нормального роста. Широко известен факт, что по мере старения дерева узорчатая древесина постепенно сменяется древесиной нормального строения. Все это свидетельствует о том, что формирование узорчатой древесины карельской березы связано с изменением метаболического статуса тканей ствола.

Известно, что деление, рост и дифференцировка клеток в камбиальной зоне древесных растений осуществляются за счет притока фотоассимилятов из листьев (Kudlicka, Brown, 1997; Nakai et al. 1999; Титок и др., 2007). Основной транспортной формой фотоассимилятов является сахароза, которая доставляется к зонам потребления по ситовидным трубкам флоэмы (Курсанов, 1976). Таким образом, сахароза служит исходным субстратом в цепи биохимических реакций, обеспечивающих рост и развитие проводящих тканей ствола. У обычной березы повислой и карельской березы сахароза остается практически единственным сахаром флоэмного экссудата на протяжении всего вегетационного периода, и только осенью здесь появляются незначительные количества раффинозы и стахиозы (Колесниченко, 1985; Новицкая и др., 2015).

Для того чтобы флоэмный транспорт мог осуществляться, концентрация сахарозы в зоне разгрузки флоэмы должна поддерживаться на достаточно низком уровне. Повышение здесь уровня сахарозы может нарушить нормальные донорно-акцепторные отношения в системе «лист-ствол». Утилизация «лишней» сахарозы в проводящей флоэме происходит путем синтеза запасных веществ (Курсанов, 1976; Курсанов и др., 1989).

Результаты электронно-микроскопического и биохимического анализов показали, что в период активного камбиального роста в проводящей флоэме карельской березы, в отличие от обычной березы повислой, накапливается большое количество запасных

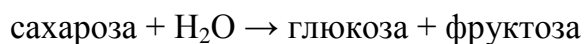
соединений – крахмала, липидов и танинов (Новицкая, 1997, 2008; Novitskaya, Kushnir 2006). Был сделан вывод, что флоэма карельской березы функционирует в условиях избытка сахарозы, который интенсивно утилизируется в ходе реакций запасного метаболизма.

1.3 Ферменты метаболизации сахарозы

Метаболизация сахарозы в акцепторных тканях происходит при участии ферментов – инвертазы и сахарозосинтазы (Курсанов, 1976; Koch, Zeng, 2002; Sturm, Tang, 1999) (Рисунок 1).

1.3.1 Функции сахарозорасщепляющих ферментов в растительном организме

Инвертаза (К.Ф.3.2.1.26) – это гидролаза, которая необратимо расщепляет молекулу сахарозы на две гексозы – глюкозу и фруктозу (Рисунок 1) (Sauer, 2007; Wind et al., 2010):

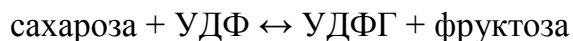


В растительном организме обнаружено три формы инвертазы, отличающиеся по локализации и оптимуму pH: вакуолярная инвертаза (ВакИндв, кислая растворимая инвертаза), инвертаза клеточной стенки или апопластная инвертаза (АпИндв, кислая нерастворимая инвертаза) и цитоплазматическая инвертаза (ЦитИндв, нейтральная растворимая инвертаза) (Rees, 1984). Как растворимые, так и нерастворимые инвертазы могут присутствовать в растительном организме в виде нескольких изоформ (Weil et al., 1994; Kladnik et al., 2005).

Показано, что АпИндв играет основную роль в поддержании концентрационного градиента сахарозы в месте разгрузки у растений с апопластным типом разгрузки флоэмы, а также у растений, способных к разгрузке флоэмы как по симпласту, так и по апопласту (Sturm, Tang, 1999; Koonjul et al., 2005; Iraqi et al., 2005; Godt, Roitisch, 2006; Jia et al., 2008; Barratt et al., 2009; Welham et al., 2009). Показана ключевая роль АпИндв в транспорте сахарозы при нарушении плазмодесменных связей (Patrick, 2001; Koch, Zeng, 2002). Роль инвертазы клеточной стенки в переносе сахарозы через апопласт была доказана в работах по изучению влияния биотических и абиотических факторов на

межклеточный транспорт углеводов (Cheng et al., 1996; Herbers, Sonnewald, 1998; Sturm, Tang, 1999; Wachter et al., 2003).

Сахарозосинтаза (К.Ф. 2.4.1.13) представляет собой гликозилтрансферазу, в присутствии уридиндифосфата (УДФ) она обратимо расщепляет сахарозу на уридиндифосфатглюкозу (УДФГ) и фруктозу (Рисунок 1):



Сахарозосинтаза имеет два оптимума рН: наибольшую активность в реакциях распада сахарозы она проявляет при рН 6,0 – 8,5, в направлении синтеза сахарозы оптимальные значения рН составляют 8,5 – 9,5 (Курсанов, 1976).

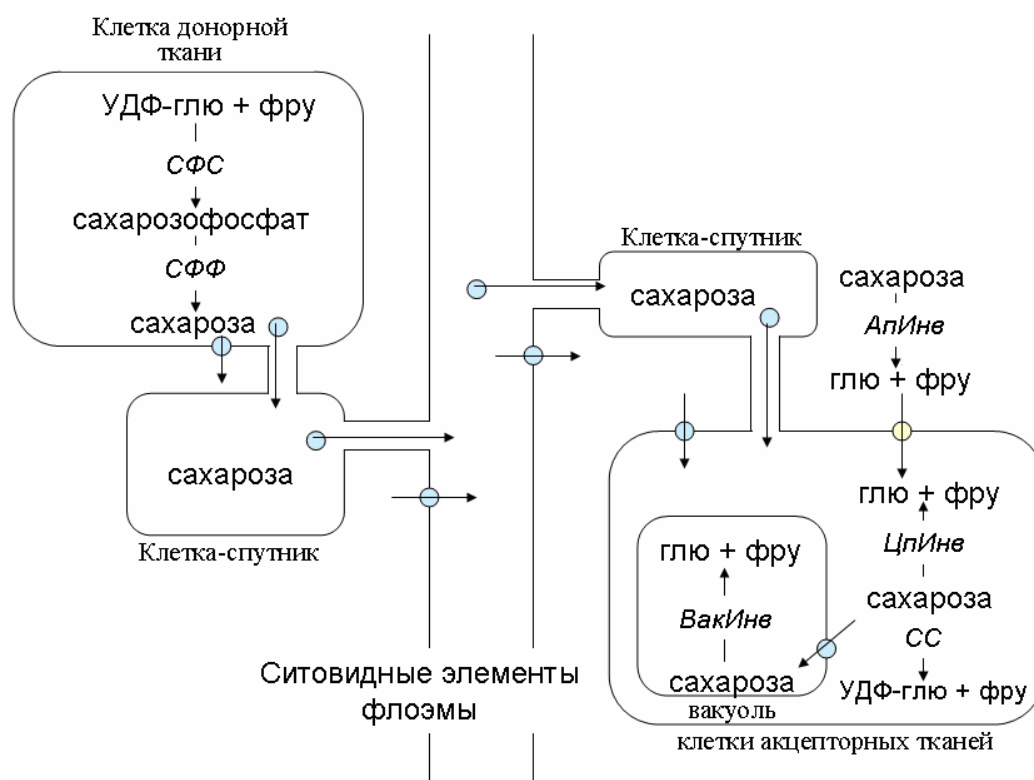


Рисунок 1. Схема биосинтеза и утилизации сахарозы в растительных тканях. *СФС* – сахарозофосфатсинтаза, *СФФ* – сахарозофосфатфосфатаза, *АпИнв* – апопластная инвертаза, *ВаКИнв* – вакуолярная инвертаза, *ЦпИнв* – цитоплазматическая инвертаза, *СС* – сахарозосинтаза.

Авторы многих работ указывают на то, что роль сахарозосинтазы состоит преимущественно в распаде сахарозы (Cobb, Hannah, 1988), эта направленность сахарозосинтазной реакции является физиологически более важной, чем синтез сахарозы (Delmer, Albersheim, 1970; Su, Preiss, 1977).

Сахарозосинтаза – цитоплазматический фермент, который может находиться в свободном или связанном с плазматической мембраной состоянии (Amor et al., 1995; Sturm, Tang, 1999, Koch, 2004; Титок и др., 2007; Brill et al., 2011). Несмотря на то, что сахарозосинтаза имеет неспецифическое сродство к клеточным мембранам (Hardin et al., 2004), некоторые авторы (Winter et al., 1997; Fukao, 2003) показали, что связывание сахарозосинтазы с мембраной зависит от статуса фосфорилирования фермента. Свободная цитоплазматическая сахарозосинтаза представляет собой фосфорилированную форму, а связанная с мембраной – дефосфорилированную (Amor et al., 1995). Мембраносвязанная форма сахарозосинтазы может образовывать комплексы с каллозосинтазой и целлюлозосинтазой. Полагают, что образование комплексов сахарозосинтазы с каллозосинтазой и целлюлозосинтазой дает возможность прямого использования УДФГ, образующейся в реакции распада сахарозы, для биосинтеза целлюлозы и каллозы и более быстрой утилизации уридиндифосфата (Delmer, Amor, 1995, Fennoy et al., 1998; Титок и др., 2007). Согласно некоторым данным УДФГ в биосинтезе целлюлозы используется для связывания активного центра ферментного комплекса с глюкановыми цепями (Brown, Saxena, 2000), которые при этом «продавливаются» внутрь клеточной стенки (Титок и др., 2007).

Таким образом, СС, активность которой, приводит к образованию субстрата для синтеза целлюлозы, является важным звеном регуляции ксилогенеза на этапе утолщения вторичных клеточных стенок древесины.

Локализация сахарозосинтазы в ситовидных трубках и клетках спутниках и образование сахарозосинтазных комплексов с каллозосинтазой имеет также большое значение при поранении. В данном случае УДФ-глюкоза, образующаяся в ходе расщепления сахарозы, расходуется на биосинтез каллозы (Subbaiah, Sachs, 2001; Salnikov et al., 2003; Wachter et al., 2003), необходимой для закупорки пор раневой древесины (Koch, 2004).

Помимо участия в синтезе целлюлозы и каллозы, УДФГ может переходить в глюкозо-1-фосфат, затем АДФ-глюкозу и расходоваться на синтез крахмала (Asano et al., 2002; Kladnik et al., 2005; Patrick et al., 2013). В некоторых гетеротрофных тканях вместо УДФ, сахарозосинтаза может использовать в качестве субстрата АДФ. В этом случае при распаде сахарозы образуется АДФ-глюкоза, которая также идет на синтез крахмала (Baroja- Fernandez et al., 2003). Участие сахарозосинтазы в синтезе крахмала

показано на корнеплодных растениях (Koch, Zeng, 2002): наименьшее содержание крахмала в запасающих органах наблюдается у растений, которые имеют более низкую активность сахарозосинтазы.

Наряду с синтезом полисахаридов клеточной стенки и запасного крахмала, сахарозосинтаза играет важную роль в функционировании дыхательной цепи растений (Xu et al., 1989) и участвует в ответных реакциях на анаэробные условия и холод (Sturm, Tang, 1999). Сахарозосинтаза может эффективно действовать в условиях нехватки кислорода (Zeng et al., 1999) и даже снижает его дефицит (Bologa et al., 2003). В тех же условиях деятельность инвертазы снижается, а ее активность наоборот усугубляет проблему недостатка кислорода (Zeng et al., 1999). Поддержание дыхания происходит за счет сохранения в клетке аденилатов путем синтеза УДФГ, вместо образования гексоз (как это происходит при расщеплении сахарозы инвертазой), требующих дополнительного количества АТФ для вступления их в реакции гликолиза (Koch, 2004).

Данные, полученные на трансгенных растениях картофеля (Bologa, 2003), свидетельствуют о том, что растения, у которых преобладает сахарозосинтазный путь расщепления сахарозы, имеют улучшенный аденилатный баланс, биосинтез крахмала, и эндогенный уровень кислорода, по сравнению с растениями, отличающимися высоким уровнем экспрессии генов, кодирующих альтернативные сахарозорасщепляющие ферменты (инвертазу, сахарозофосфорилазу). Возможно, высокая активность сахарозосинтазы у растений сводит к минимуму количество гексоз, образующихся при расщеплении сахарозы инвертазой и имеющих пагубное воздействие на процессы дифференциации тканей и развитие органов (Wobus, 1999).

На локализацию сахарозосинтазы оказывают влияние присутствие сахарозы и другие сигналы, которые обеспечивают возможность регулирования баланса между использованием сахарозосинтазы в реакциях дыхательной цепи и биосинтезе различных компонентов (Winter, Huber, 2000; Hardin et al., 2004).

Изучая активность сахарозосинтазы и инвертазы в трансгенных растениях томата, N'tchobo (1999) обнаружил, что активность сахарозосинтазы коррелирует со скоростью разгрузки флоэмы, а у растений, имеющих сходные значения активности сахарозосинтазы, но разные значения активности инвертазы, наблюдается сходная модель разгрузки.

Обобщение представленных выше данных позволяет сделать вывод о том, что сахарозосинтаза играет очень важную роль в разгрузке флоэмы, распределении сахаров и формировании древесины.

1.3.2 Гены, кодирующие сахарозосинтазу

У большинства растений присутствует несколько изоформ сахарозосинтазы, имеющих гомологичную последовательность аминокислот и сходные биохимические свойства, но кодируемых разными генами. Экспрессия генов, кодирующих сахарозосинтазу, органоспецифична, а также зависит от стадии развития растения (Sturm, Tang, 1999; Kladnik et al., 2005). Наиболее изучены изоформы сахарозосинтазы у травянистых растений (Ruan et al., 2003; Haigler et al., 2001; Barratt et al., 2009 и др.). Много работ по изучению генов сахарозосинтазы проведено на растении *Arabidopsis*, у которого выделено 6 изоформ фермента (*Sus1-6*), объединенных в 3 пары на основании филогенетического анализа (Baud et al., 2004; Bieniawska et al., 2007). Основное внимание авторы уделяют изоформам фермента, кодируемым генами *Sus1* и *Sus2*, и они изучаются в контексте синтеза крахмала в запасующих тканях (Echt, Chourey, 1985; Varoja-Fernandez et al., 2003, 2012). Участие сахарозосинтазы в синтезе целлюлозы показано на трансгенных растениях хлопка (Ruan et al., 2003): у особей с заниженной экспрессией генов сахарозосинтазы происходило снижение активности фермента и не образовывались целлюлозные волокна.

В некоторых работах (Chourey et al., 1998; Ruan et al., 2003) показано, что изоформы сахарозосинтазы в пределах одного растения могут иметь разное неперекрывающееся биологическое значение. У растений кукурузы изофермент SS1, кодируемый геном *Sh-1*, определяет синтез компонентов, необходимых для образования крахмала, в то время как изофермент SS2, кодируемый *sus1* геном, играет решающую роль в образовании предшественников биосинтеза целлюлозы (Chourey et al., 1998). У растений *Nicotiana tabacum* изоформы сахарозосинтазы SuSy1 и SuSy2, кодируемые генами *Sus1* и *Sus2* соответственно, имеют сходные биохимические свойства, однако включение той или иной изоформы в реакции метаболизма происходит в зависимости от энергетического статуса акцепторной ткани (Matic et al., 2004). Так, в случае, когда необходим синтез большого количества АТФ, доминирует активность изоформы SuSy1 (вследствие высокого сродства к УДФ), а при активном росте клеточной стенки

увеличивается активность SuSy2, поскольку накапливаются избытки фруктозы, высокие концентрации которой сильно ингибируют SuSy1.

Работ, посвященных изучению изоформ сахарозосинтазы у древесных растений очень мало, в основном такие исследования проводятся на растениях р. *Populus*.

В исследованиях по изучению экспрессии генов сахарозосинтазного семейства показано, что изменение уровня экспрессии генов сахарозосинтазы 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 and Magel, 1998; Salnikov et al., 2001; Andersson-Gunneras et al., 2006; Coleman, 2006; Coleman et al., 2009; Nilsson et al., 2010).

Участие сахарозосинтазы в образовании древесины показано на гибридных линиях тополя *P. alba*×*gradidentata* (Coleman et al., 2009), *P. deltoides*×*trichocarpa* (Song et al., 2010) и *P. tremula*×*tremuloides* (Gerber et al., 2014). Выявлено влияние сахарозосинтазы на содержание целлюлозы, гемицеллюлозы, лигнина на единицу объема древесины. Снижение экспрессии сахарозосинтазы приводит к изменению хемотипа клеточной стенки (в частности, происходит увеличение значения соотношения синригильный лигнин/гваяциловый лигнин (Gerber et al., 2014).

Результаты структурного анализа показали, что сахарозосинтазный ряд у растений тополя представлен семью генами, кодирующими разные изоформы, при этом гены сахарозосинтазы располагаются в 4 (из 19) хромосомах (Zhang, 2011). Высокая идентичность по аминокислотной и нуклеотидной последовательностям найдена между *Sus1* и *Sus2*, *Sus4* и *Sus5*, *Sus6* и *Sus7*. Ген *Sus3* выделяют в отдельную группу.

Показано, что изоформы сахарозосинтазы тополя *Sus1* и *Sus2* на 80,9–85,7% идентичны данным изоформам картофеля, томата, арабидопсиса по аминокислотной последовательности, и, в меньшей степени, изоформам однодольных (пшеница, кукуруза) (74,1-80,0%) (Zhang et al., 2011).

В работах по изучению сахарозосинтазы 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 сахарозосинтазы 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 значительной

степени в клетках лучей) (Zhang et al, 2011). Анализ экспрессии генов у трансгенных растений показал, что наибольший уровень корреляции между активностью сахарозосинтазы и экспрессией генов в развивающейся древесине характерен для *Sus1* и *Sus2* (Gerber et al., 2014). Авторы сделали вывод о том, что основная роль генов *Sus1* и *Sus2* состоит в поставке углерода для синтеза клеточной стенки. Для гена *Sus3* показан широкий диапазон экспрессии во всех органах и тканях древесных растений, из чего следует, что он относится к группе основных метаболических генов (Geisler-Lee et al., 2006).

У древесных растений гены *Sus 4-7* изучены слабо. Они имеют низкий уровень экспрессии в ксилеме, но, исходя из высокой экспрессии в зрелом листе (Geisler-Lee et al., 2006; Zhang et al., 2011), вероятно, обладают большим сродством к субстратам в направлении синтеза сахарозы.

В базе данных национального центра биотехнологической информации США (National Center for Biotechnological Information, NCBI) имеется информация по 3 генам, кодирующим сахарозосинтазу (*Sus1*, *Sus2*, *Sus3*), для видов р. *Betula* – *B. luminifera*, *B. platyphylla*. Сведения по генам сахарозосинтазы у березы повислой (*Betula pendula*) отсутствуют.

1.3.3 Регуляция активности и экспрессии генов сахарозосинтазы

Деятельность ферментов в клетке определяется их интенсивной и экстенсивной регуляцией (Basset, 2007). Интенсивная регуляция включается при необходимости быстрого реагирования клетки на меняющиеся условия и осуществляется путем модификации молекулы белка фермента или же изменения каталитической активности фермента. Экстенсивная регуляция – регуляция за счет изменения количества белка в клетке или регуляция на генетическом уровне. Решающее влияние на деятельность фермента оказывает второй тип регуляции, включающий контроль синтеза мРНК (индукция или репрессия синтеза фермента). Как внешние, так и внутренние факторы изменяют активность фермента, главным образом, через изменение количества белка фермента, т.е. через регуляцию экспрессии его генов (Wu et al., 2009).

Ф. Жакоб и Ж. Моно разработали теорию регуляции синтеза белка (Jacob, Monod, 1961). Сущность данной теории заключается во «включении» и «выключении» генов в процессе передачи закодированной в структурных генах генетической информации,

необходимой для синтеза специфических белков. «Включение» генов (индукция синтеза белка) происходит при появлении в среде субстрата фермента, «выключение» (репрессия синтеза белка) – при накоплении конечных продуктов реакции.

Разнообразие и количество белков в клетке определяются степенью их участия в метаболизме, а их синтез определяется внешними или внутренними факторами (Гилберт, 1994; Ашмарин, 1977; Basset, 2007; Стручкова и др., 2010). Из внешних факторов на экспрессию генов сахарозосинтазного ряда в большей степени влияют анаэробные условия, значение рН среды, температура (Ашмарин, 1977).

Сахарозосинтаза относится к ферментам, деятельность которых жестко обусловлена статусом углеводного обмена растения, в частности метаболизма сахарозы. Поскольку сахарозосинтаза участвует в реакциях синтеза и расщепления сахарозы, а также поставяет субстрат для биосинтеза крахмала, экспрессия кодирующих ее генов в значительной степени зависит от содержания этих углеводов в тканях растения, при этом разные изоформы сахарозосинтазы по-разному реагируют на изменение содержания углеводов в клетке (Koch, 1996). При этом на фоне индукции экспрессии одного изофермента, одна или несколько других изоформ фермента репрессируются (Xu et al., 1995).

Несмотря на большое количество статей, посвященных исследованию сахарозосинтазы в растениях, их функции в процессах формирования древесины, а также механизмы индукции и репрессии процесса транскрипции, кодирующих их генов до конца не выяснены.

1.4 Основные выводы по обзору литературы и перспективы исследований

Учитывая утилитарное значение древесины, исследования в указанном направлении важны с точки зрения получения древесных материалов с заданными свойствами.

Познание механизмов ксилогенеза перспективно проводить при сравнении процессов, протекающих в ходе формирования нормальной (типичной для вида) и аномальной древесины. В данной связи ценными опытными объектами являются обычная береза повислая с прямослойной древесиной, имеющей слабо выраженную текстуру («норма») и карельская береза со свилеватой узорчатой древесиной ствола («аномалия»).

Основной отличительной особенностью узорчатой древесины карельской березы является изменение процентного соотношения ее структурных элементов в сторону значительного увеличения доли паренхимных клеток. Это свидетельствует о нарушении дифференцировки производных камбия: вместо сосудов и волокнистых трахеид образуются клетки паренхимы.

Активность камбия и формирование структурных элементов ксилемы поддерживаются за счет притока в ствол фотоассимилятов – сахарозы. Вовлечение сахарозы в обмен веществ осуществляют два фермента – сахарозосинтаза и инвертаза. Сахарозосинтаза обеспечивает участие сахарозы в синтезе компонентов клеточной стенки, главным из которых является целлюлоза. Клеточные оболочки мертвых элементов древесины – волокон и сосудов, создают основную массу древесины обычной березы. Следовательно, сахарозосинтаза обеспечивает приоритетный путь метаболизации сахарозы в ходе нормального ксилогенеза березы повислой. Можно ожидать, что переориентация дифференцировки ксилемных производных камбия на формирование клеток паренхимы, важной функцией которых является запасание веществ, связана с изменением активности сахарозосинтазы.

Активность ферментов в значительной степени обусловлена экспрессией кодирующих их генов. Это позволяет предположить, что гены, кодирующие сахарозосинтазу по-разному экспрессируются в ксилеме древесных растений, различающихся по структурному составу древесины.

Наши исследования нацелены на выявление особенностей активности сахарозосинтазы и экспрессии кодирующих ее генов в ходе аномального ксилогенеза карельской березы.

Глава 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Объекты исследования

Для изучения роли сахарозосинтазы в процессе формирования тканей ствола древесных растений и при аномальном морфогенезе карельской березы были использованы разновозрастные деревья двух форм березы повислой: обычная береза повислая с нормальным строением древесины (*Betula pendula* Roth var. *pendula*) и карельская береза с узорчатой и безузорчатой древесиной ствола (*B. pendula* Roth var. *carelica* (Mercl.) Hämet-Ahti).

Отбор тканей осуществляли в пределах нижней трети ствола, поскольку узорчатость древесины у карельской березы в этой области выражена наиболее ярко. Отделяли кору от древесины. С внутренней стороны коры вырезали слой тканей, включающий проводящую флоэму и камбиальную зону. Для удобства изложения в дальнейшем этот слой обозначали как «флоэма». С обнаженной поверхности древесины вырезали слой тканей, включающий зону деления, роста и дифференциации клеток ксилемы. В дальнейшем его обозначали как «ксилема». Отбор тканей контролировали под микроскопом. Все растения, взятые для анализа, произрастали в одинаковых почвенно-климатических условиях на Агробиологической станции КарНЦ РАН в 2 км от г. Петрозаводска (61° 45' с.ш., 34° 20' в.д.).

Наряду со взрослыми деревьями, активность сахарозосинтазы изучали на сеянцах обычной березы повислой и карельской березы. В данном случае, для анализа брали стебли и корни молодых растений.

Растения выращены из семян, полученных от контролируемого опыления (Forelia OY, Финляндия). Семена карельской березы получены от родительских деревьев с ярко выраженными признаками узорчатости древесины.

Отбор растений для анализа проводили в соответствии с поставленными в работе задачами:

1. для определения активности сахарозосинтазы в период камбиального роста использовали:
 - а. 6-летние деревья березы повислой и карельской березы. Формирование узорчатой древесины у карельской березы обычно начинается в возрасте 6-8 лет. У наших опытных деревьев этот процесс наблюдался уже в шестилетнем возрасте. Отбор

тканей для анализа проводили в период активного камбиального роста (03.07). Активность сахарозосинтазы определяли в ксилеме и флоэме, а также проводили анализ содержания растворимых сахаров (сахароза, глюкоза, фруктоза) в тканях с разной активностью сахарозосинтазы;

б. Ксилему 10-летних растений, которые включали деревья обычной березы повислой, деревья карельской березы без признаков формирования узорчатой древесины и деревья карельской березы с хорошо выраженной узорчатой древесиной. У последних образцы отбирали как в зоне формирования структурных аномалий (нижняя треть ствола), так и в зоне с обычным строением проводящих тканей (участок ствола под кроной). Активность сахарозосинтазы определяли в ксилеме. У деревьев с разной активностью фермента в данной ткани определяли содержание некоторых запасных и структурных углеводов (целлюлоза, крахмал). Взятие образцов осуществляли в период активной деятельности камбия (29.06);

2. *для определения активности сахарозосинтазы на разных этапах вегетационного периода:*

а. 8-летние растения карельской березы уже приступившие к формированию структурных аномалий ствола (узорчатые деревья) и еще не имеющие видимых отклонений от нормального роста и развития (безузорчатые деревья);

б. 40-летние деревья обычной березы повислой и узорчатые деревья карельской березы (для анализа отбирали ткани с узорчатой части ствола).

Наряду с изучением активности сахарозосинтазы, в тканях ствола данной группы растений изучали содержание растворимых сахаров (сахароза, глюкоза, фруктоза) и запасного полисахарида – крахмала.

Отбор растительного материала для анализа проводили в мае (19.05), июне (20.06), июле (20.07) и октябре (12.10) 2010 года (Рисунок 2).

Особенностью условий отбора растительного материала в течение вегетационного периода 2010 года было отсутствие осадков более 10 дней в период предшествующий отбору растительного материала. Максимальная температура воздуха днем достигала 28°C, среднесуточная температура превысила 25°C (Рисунок 2);

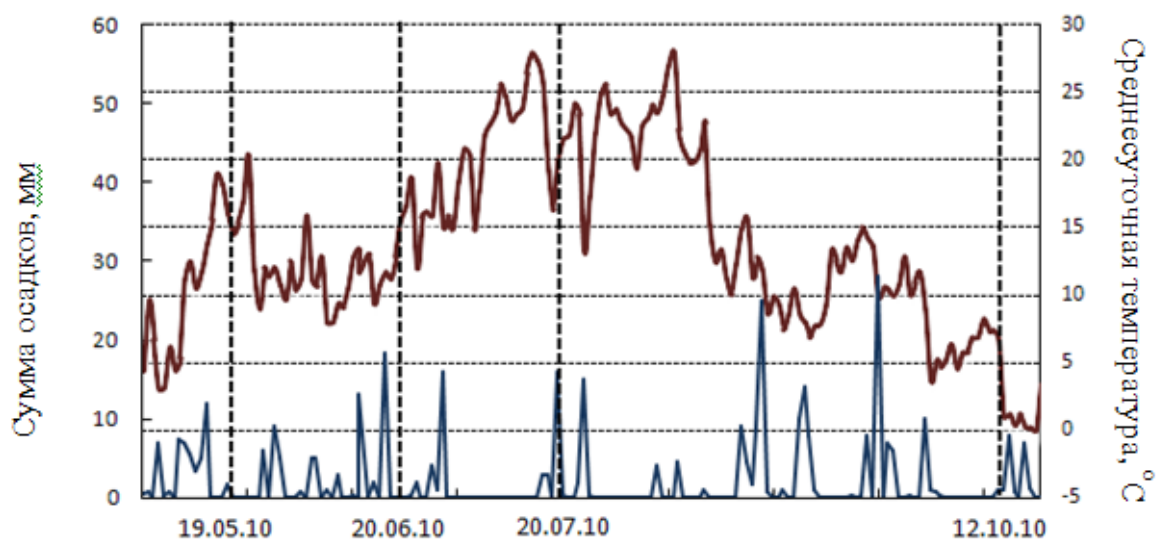


Рисунок 2. Значения среднесуточной температуры и количества осадков в течение вегетационного периода (май-октябрь 2010 года) в г. Петрозаводск. Данные взяты с сервера «Погода России» (<http://meteo.infospace.ru>). (Вертикальными пунктирными линиями обозначены даты взятия образцов). — среднесуточная температура, — сумма осадков.

3. для определения активности сахарозосинтазы в раннем онтогенезе березы повислой:

- а. 1,5-месячные сеянцы обычной березы повислой и карельской березы. Растения выращивали примерно до 3-5 см в высоту;
- б. 5-месячные сеянцы обычной и карельской березы. Высота надземной части растений данной группы была ~ 25 см.

Растения 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%.

в. 5-месячные растения обычной березы повислой и карельской березы, выращенные в условиях недостатка азотного питания на естественном почвогрунте (почвенный горизонт Vf), состава N – 0,095%, P – 0,051%, K – 0,065%. Данную группу растений использовали для определения влияния дефицита азота на активность сахарозосинтазы;

4. для изучения уровня экспрессии генов, кодирующих изоформы сахарозосинтазы, использовали:

а. 10-летние деревья разных форм березы повислой (см. пункт 1-б). В ксилеме данной группы растений исследовали экспрессию генов *SUS1*, *SUS2*, *SUS3*;

б. 1,5-месячные сеянцы обычной березы повислой и карельской березы (см. пункт 3-а). В стебле растений изучали уровень экспрессии генов *SUS1* и *SUS2*.

2.2 Методы исследования

Для проведения биохимических исследований и проведения ПЦР ткани, взятые для анализа, сразу замораживали, а затем растирали в жидком азоте.

2.2.1 Определение активности сахарозосинтазы

Для определения активности сахарозосинтазы ткани гомогенизировали при 4°C в буфере следующего состава: 50 мМ Hepes (pH 7,5), 1 мМ ЭДТА, 1 мМ ЭГТА, 3 мМ DTT, 5 мМ MgCl₂, 0,5 мМ PMSF. После 20-минутной экстракции гомогенат центрифугировали при 10000 g в течение 20 минут. 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. Для определения активности сахарозосинтазы использовали супернатант. Активность фермента определяли после инкубации полученного препарата при 30°C в течение 30 минут.

Инкубационная среда для определения активности сахарозосинтазы в направлении распада сахарозы содержала: 200 мМ Hepes (pH 7,8), 65 мМ УДФ, 50 мМ НАДФ, 50 мМ PP, 210 мМ MgCl₂, 1 М сахарозу, 8U фосфоглюкомутазы, 4U глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы; для определения активности сахарозосинтазы в направлении синтеза сахарозы: 73 мМ трис-HCl (pH 7,5), 2,5 мМ УДФ-глюкоза, 20 мМ фруктоза, 5 мМ MgCl₂, 3 мМ DTT.

Активность фермента определяли спектрофотометрически, выражали в мкмоль сахарозы на мг белка за 30 мин (мкмоль сахарозы/мг белка·30мин). Содержание белка для пересчета активности фермента определяли по методу Бредфорда (Bradford, 1976) с использованием красителя Coomassie G250.

2.2.2 Определение содержания растворимых углеводов

Для определения сахаров весь растительный материал лиофильно высушивали. Углеводы дважды экстрагировали 80% этиловым спиртом при 50°C в течение 30 минут (Галибина и др., 2012). Спиртовые экстракты объединяли и упаривали на водяной бане при температуре 35–40°C. Полученный сухой остаток, содержащий моно-, ди- и олигосахариды растворяли в 3–5 мл (в зависимости от предполагаемого количества

углеводов) бидистиллированной воды и фильтровали через бумажные фильтры. Полученный фильтрат подвергали очистке методом твердофазной экстракции (ТФЭ), для освобождения от мешающих компонентов, таких как пигменты, полисахариды, различные соли и органические кислоты. Для этого растворы образцов пропускали через мембранные фильтры ($d=25$ мм, $0,45$ мкм, Nylon) (ProFill, Германия), а потом через картриджи для ТФЭ (NH_2 , $500\text{mg}/6\text{ml}$, $55\mu\text{m}$, 70A) (Phenomemex Strata, США). Содержание растворимых углеводов в экстракте анализировали на системе высокоэффективной жидкостной хроматографии серии «Стайер» (Аквилон, Россия) при следующих условиях: колонка – Rezex RCM-Monosaccharide (Phenomenex, США), элюент – бидистиллированная вода, скорость потока элюента – $0,6$ мл/мин, детектор – рефрактометр. Критерием идентификации пиков служило время удерживания стандартных веществ: сахарозы, глюкозы, фруктозы (Panreac, Испания). Содержание углеводов выражали в мг на г сырой ткани (мг/г сырой ткани).

2.2.3 Определение содержания крахмала

Крахмал экстрагировали из растительных тканей хлорной кислотой по методу Пьючера (Pucher et al., 1948). Содержание крахмала определяли глюкозооксидазным методом по количеству глюкозы, образовавшейся в результате кислотного гидролиза (Плешков, 1985) и выражали в мг/г сухого ткани.

2.2.4 Определение содержания целлюлозы

Целлюлозу выделяли по методу Кюршнера-Хоффера смесью концентрированной азотной кислоты и этилового спирта (Оболенская и др., 1991) в соотношении 1:4 (по объему). Содержание целлюлозы определяли гравиметрическим методом.

2.2.5 Определение уровня экспрессии генов

Накопление транскриптов генов анализировали при помощи полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени. Для анализа были выбраны 3 гена, кодирующие разные изоформы сахарозосинтазы – *SUS1*, *SUS2*, *SUS3*, которые по литературным данным являются тканеспецифичными для ксилемы (Zhang et al., 2015).

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 КСl; 30 mM MgCl₂). Количество и качество выделенной РНК и синтезированной кДНК проверяли спектрофотометрически с помощью прибора SmartSpecPlus («Bio-Rad», США).

ПЦР в режиме реального времени

Аmplification 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 °С, далее 45 циклов 15с при 95 °С, 15с при 48-60 °С. 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). Специфические праймеры для амплификации участков исследуемых генов *SUS1*, *SUS2*, *SUS3* (Таблица 2) (Евроген, Россия) конструировали с помощью программного обеспечения Primer Express Software (Applied Biosystems).

В качестве референсного гена для расчета относительной экспрессии *SUS* использовали ген α -тубулина (Таблица 2). Для оценки пригодности данного транскрипта в качестве референсного определяли стабильность экспрессии гена при помощи прикладной программы для Microsoft Excel – BestKeeper (Pfaffl et al., 2004; Ребриков и др., 2011).

Эффективность ПЦР для праймеров для референсного и целевых генов определяли путем проведения ПЦР с последовательными разбавлениями исследуемого образца кДНК (Рисунок 3) (Ребриков и др., 2011).

Таблица 2. Нуклеотидная последовательность праймеров для проведения ПЦР в режиме реального времени.

Ген	Номер доступа NCBI	Прямой праймер (5'→3')	Обратный праймер (5'→3')
<i>α-TUBULIN</i>	FJ228477.1	CTACCCCAGAATCCACTT	TAGGCACAACATCACCAC
<i>SUS1</i>	KC204973.1	GTTCCTCAACCGTCACCT	GCATCAACCCCTGTCCCT
<i>SUS2</i>	KC204974.1	CTGCTAACCGCAACGAAAT	ACCGCCAAGGCAACCCAC
<i>SUS3</i>	KC204975.1	CAGTGGGTTTCTCGTTTC	AGCGTGAGCAATAGTTCC

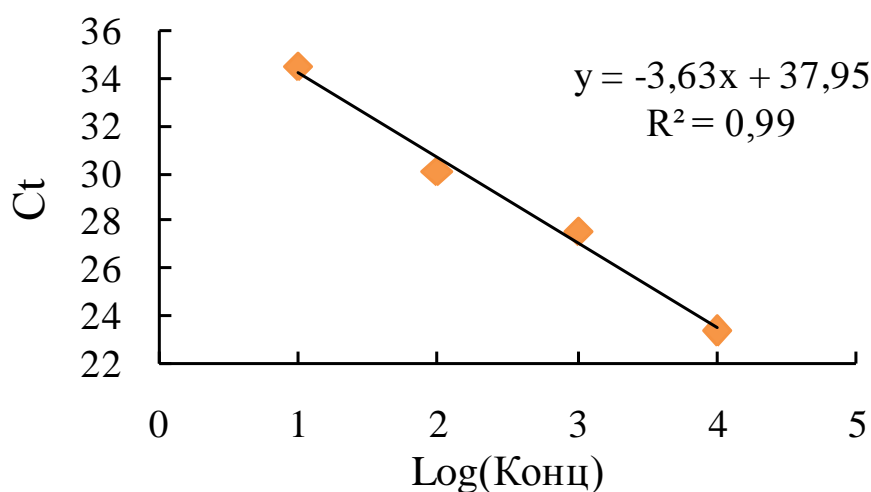


Рисунок 3. График зависимости порогового цикла (C_t) референсного гена (*α-TUBULIN*) от логарифма исходной концентрации ДНК-матриц (log Конц.).

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.

Исследования выполнены на оборудовании ЦКП «Аналитическая лаборатория» ИЛ КарНЦ РАН.

2.2.6 Статистическая обработка данных

Статистическую обработку результатов исследования проводили общепринятыми методами с использованием пакетов программ Microsoft Excel и StatGraphics для Windows.

Данные представлены в виде средних арифметических значений по биологической повторности в количестве 5-10 деревьев каждой группы. Аналитическая повторность трехкратная. Различия в распределении показателей между группами растений определяли методом оценки значимости различий средних величин (t-критерий Стьюдента). Статистически значимыми считались различия при $p < 0,05$.

Взаимосвязь показателей активности сахарозсинтазы и экспрессии кодирующих ее генов оценивали при помощи регрессионного и корреляционного анализа.

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1 Активность сахарозосинтазы в период камбиального роста

3.1.1 Ксилема и флоэма ствола обычной березы повислой и карельской березы с признаками развития структурных аномалий

Исследования проводили на тканях ствола 6-летних деревьев обычной березы повислой (Рисунок 4А) и карельской березы (Рисунок 4Б) в период камбиального роста.

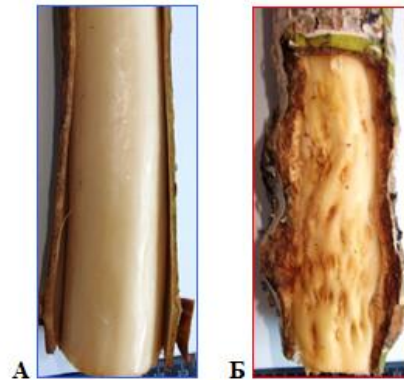


Рисунок 4. Окоренная поверхность ствола 6-летних деревьев обычной березы повислой (*Betula pendula* var. *pendula*) (А) и карельской березы (*B. pendula* var. *carelica*) (Б).

У обычной березы активность фермента преобладала в ксилеме (151,7 мкмоль сахарозы/мг белка·30 мин) (Рисунок 5). Ее значения превышали активность во флоэме в 40 раз.

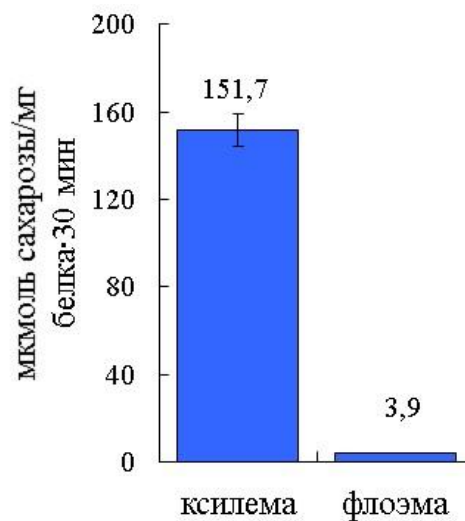


Рисунок 5. Активность сахарозосинтазы в тканях ствола 6-летних деревьев обычной березы повислой. Бары – стандартное отклонение.

Такое различие активности сахарозосинтазы в ксилеме и флоэме соответствовало высокому градиенту концентрации сахарозы между флоэмой и ксилемой – 79,9 мг сахарозы/г сырой ткани (Рисунок 6).

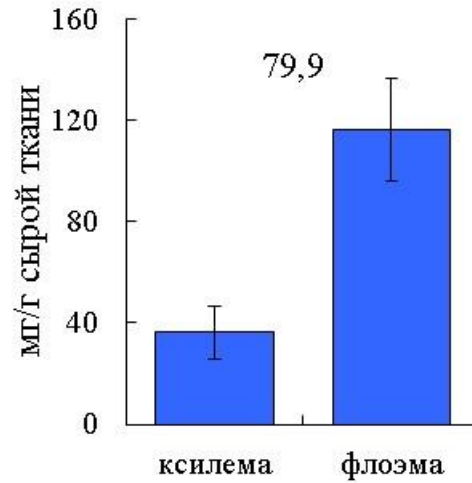


Рисунок 6. Содержание сахарозы в тканях ствола 6-летних деревьев обычной березы повислой. Сверху указан градиент концентрации сахарозы между флоэмой и ксилемой. Бары – стандартное отклонение.

Представленные данные предполагают интенсивный отток сахарозы из флоэмы в ксилему, где она расходуется на ростовые процессы. В ксилеме обычной березы повислой значение отношения содержания фруктозы и глюкозы (фру/глю) составило 3,3, а во флоэме – 1,1 (Рисунок 7).

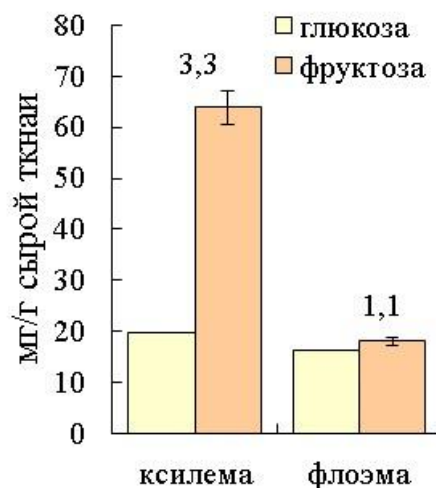


Рисунок 7. Содержание гексоз в тканях ствола 6-летних деревьев обычной березы повислой. Сверху указаны значения отношения фру/глю. Бары – стандартное отклонение.

У 6-летних деревьев карельской березы активность сахарозосинтазы в ксилеме (Рисунок 8) значимо не отличалась от деревьев обычной березы повислой (139,4 и 151,7 мкмоль сахарозы/мг белка·30 мин соответственно). В то же время активность сахарозосинтазы во флоэме деревьев карельской березы (Рисунок 8) превышала данный показатель у обычной березы повислой в 5 раз (20,8 и 3,9 мкмоль сахарозы/мг белка·30 мин соответственно).

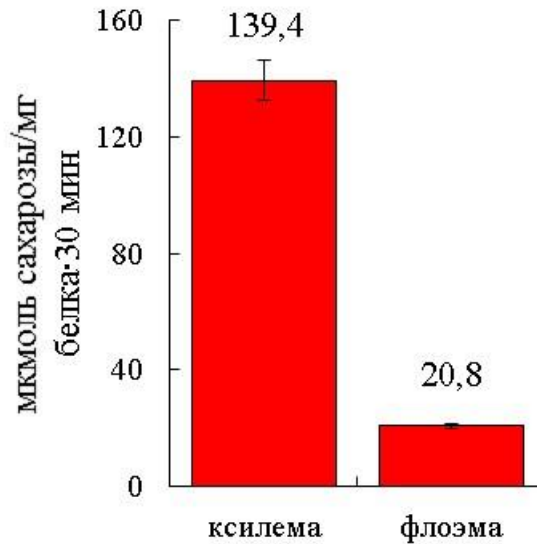


Рисунок 8. Активность сахарозосинтазы в тканях ствола 6-летних деревьев карельской березы. Бары – стандартное отклонение.

Градиент концентрации сахарозы между флоэмой и ксилемой у карельской березы был очень низким и составил 2,9 мг сахарозы/г сырой ткани (Рисунок 9). Отношение фру/глю в ксилеме карельской березы было равно 2,8 (Рисунок 10) (у обычной березы – 3,3), во флоэме – 1 (Рисунок 10) (у обычной березы – 1,1). Представленные данные указывают на некоторое ослабление ростовых процессов в ксилеме карельской березы, что коррелирует с замедлением оттока сахарозы из флоэмы в ксилему. Кроме того, они позволяют предположить более слабое использование сахарозы в формировании клеточных стенок ксилемы карельской березы, по сравнению с обычной березой повислой, и активизацию этих процессов во флоэме.

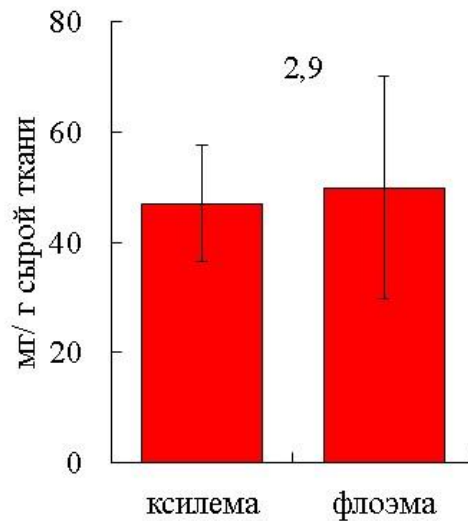


Рисунок 9. Содержание сахарозы в тканях ствола 6-летних деревьев карельской березы. Сверху указан градиент концентрации сахарозы между флоэмой и ксилемой. Бары – стандартное отклонение.

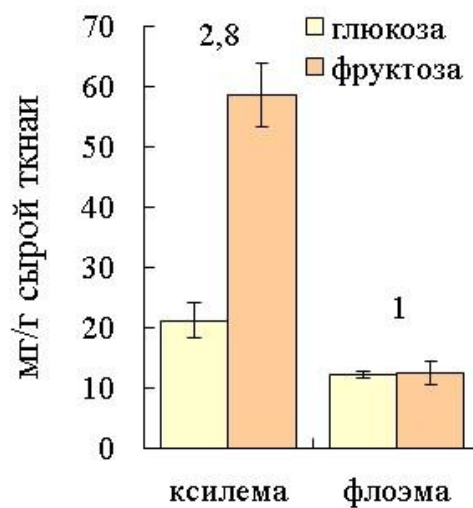


Рисунок 10. Содержание гексоз в тканях ствола 6-летних деревьев карельской березы. Сверху указаны значения отношения фру/глю. Бары – стандартное отклонение.

3.1.2 Ксилема ствола деревьев обычной березы повислой и деревьев карельской березы с разной степенью развития структурных аномалий

Исследования проводили на 10-летних деревьях в период интенсивного камбиального роста. Материал для анализа отбирали со стволов обычной березы повислой, стволов карельской березы без признаков аномального строения тканей и с "узорчатых" деревьев карельской березы в узорчатых и безузорчатых зонах ствола.

Активность сахарозосинтазы

У обычной березы повислой (Рисунок 11А-1) в конце июня наблюдали высокую активность сахарозосинтазы в ксилеме (Рисунок 11Б-1). Ее значения достигали 128,8 мкмоль сахарозы/мг белка·30 мин.

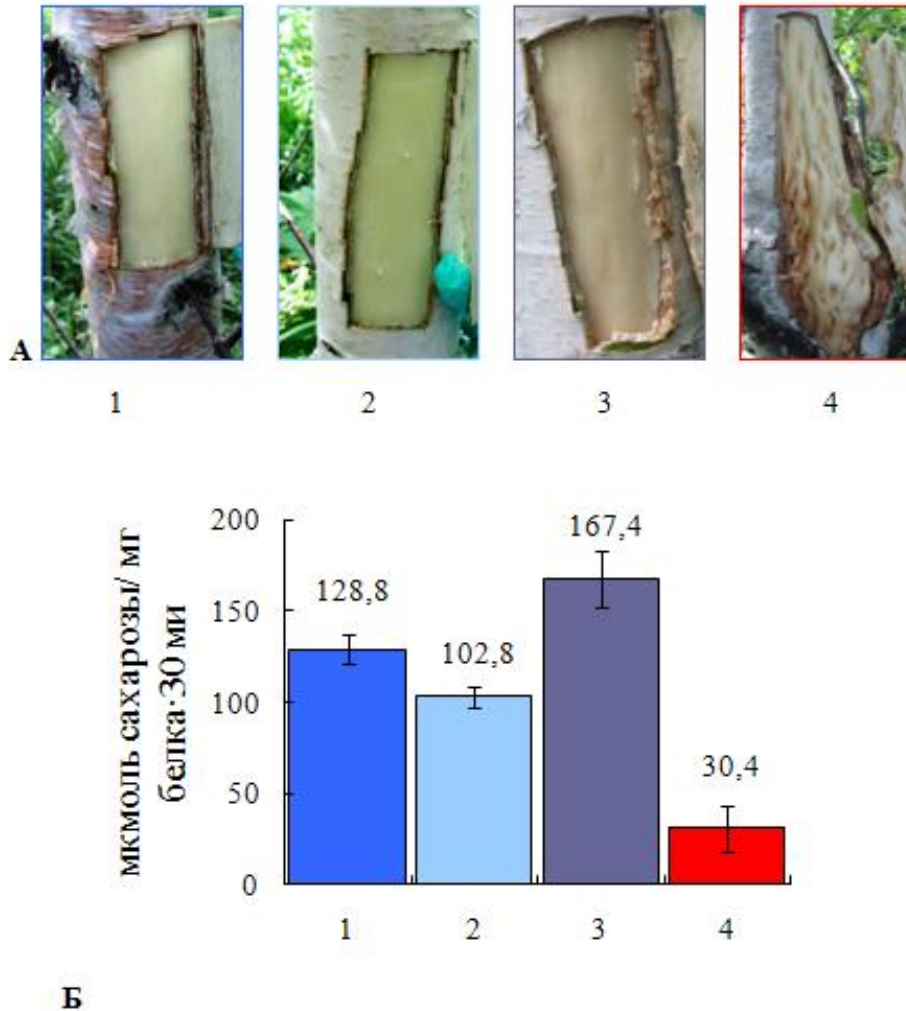


Рисунок 11. Окоренная поверхность древесины (А) и активность сахарозосинтазы в ксилеме (Б) у 10-летних деревьев березы повислой: 1 – обычная береза повислая; 2-4 – карельская береза (2 – безузорчатые деревья; 3,4 – узорчатые деревья: 3 – безузорчатая часть ствола, 4 – узорчатая часть ствола). Бары – стандартное отклонение.

У карельской березы в вариантах с обычным строением древесины (безузорчатые деревья и безузорчатая часть ствола узорчатых деревьев) (Рисунок 11А-2, 11А-3) активность фермента также была высокой. В ксилеме безузорчатых деревьев этот показатель был в 1,3 раза ниже (102,8 мкмоль сахарозы/мг белка·30 мин) (Рисунок 11Б-

2), а в безузорчатой части ствола узорчатых деревьев в 1,3 раза выше (167,4 мкмоль сахарозы/мг белка·30 мин) (Рисунок 11Б-3), чем у обычной березы. В узорчатых участках ствола карельской березы (Рисунок 11А-4) активность сахарозосинтазы в ксилеме была низкой и составила всего 30,4 мкмоль сахарозы/мг белка·30 мин (Рисунок 11Б-4).

Содержание крахмала

Одним из наиболее лабильных способов регуляции концентрации сахарозы в клетках растений является образование крахмала. В период камбиального роста у обычной березы и безузорчатых растений карельской березы запасание крахмала в ксилеме происходит слабо (до 0,3 мг/г сухой ткани соответственно) (Рисунок 12-1, 12-2). Низкие значения содержания крахмала в ксилеме растений с нормальным строением древесины ствола наблюдаются на фоне высокой активности сахарозосинтазы (Рисунок 11Б-1, 11Б-2).

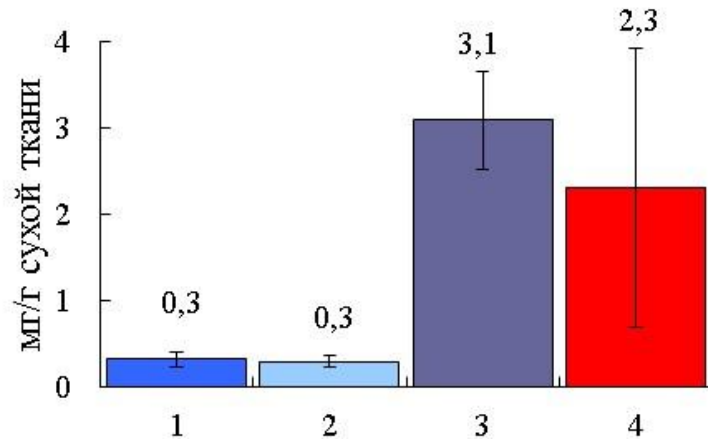


Рисунок 12. Содержание крахмала в зоне формирования ксилемы в стволах деревьев обычной березы повислой и карельской березы. Обозначения как на рисунке 11.

В ксилеме узорчатых деревьев карельской березы накапливалось большое количество крахмала (3,1 и 2,3 мг/г сухой ткани в безузорчатой и узорчатой частях ствола соответственно) (Рисунок 12-3, 12-4). Накопление крахмала в безузорчатой части ствола узорчатых деревьев карельской березы происходит на фоне высоких значений

активности сахарозосинтазы; в узорчатой части, напротив, на фоне низкой активности фермента.

Содержание целлюлозы

Содержание целлюлозы в ксилеме исследуемых растений варьировало от 38% до 42% (Рисунок 13).

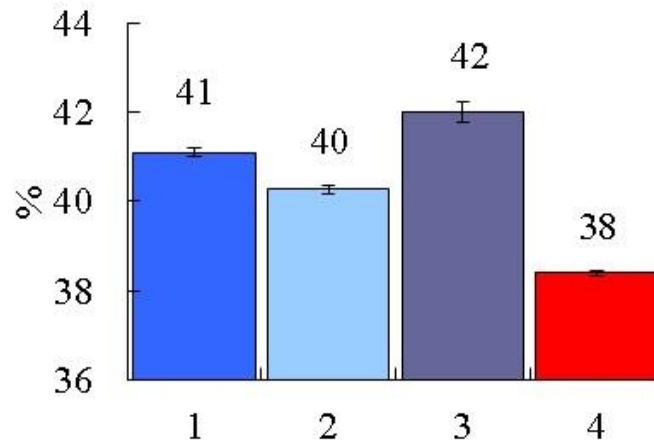


Рисунок 13. Содержание целлюлозы в зоне формирования ксилемы в стволах деревьев обычной березы повислой и карельской березы. Обозначения как на рисунке 11.

В ксилеме деревьев обычной березы содержание целлюлозы составило 41% (Рисунок 13-1). У карельской березы в вариантах с обычной текстурой древесины (безузорчатые растения и безузорчатая часть ствола узорчатых растений) значения этого показателя отличались от обычной березы незначительно и составили 40% и 42% (Рисунок 13-2, 12-3). Самые низкие значения (38%) были у карельской березы в ксилеме узорчатой части ствола (Рисунок 13-4). Следует отметить, что характер изменений содержания целлюлозы в ксилеме исследованных групп растений (Рисунок 13) полностью повторяет характер изменений активности сахарозосинтазы в этой ткани (Рисунок 11Б), что подтверждает важную роль указанного фермента в синтезе целлюлозы.

3.2 Активность сахарозосинтазы на разных этапах вегетационного периода

3.2.1 Ксилема и флоэма ствола безузорчатых и узорчатых деревьев карельской березы

На разных этапах вегетационного периода была исследована активность сахарозосинтазы в тканях ствола 8-летних деревьев карельской березы не имеющих признаков узорчатости древесины (Рисунок 14) и узорчатых деревьев карельской березы (Рисунок 15). Отбор образцов проводили до начала камбиального роста (май, период распускания листьев), во время активной деятельности камбия (июнь, июль) и во время затухания всех ростовых процессов (октябрь, подготовка растений к состоянию покоя).

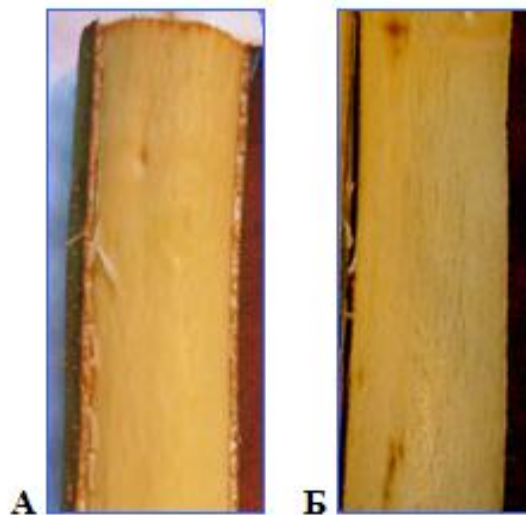


Рисунок 14. (А) Окоренная поверхность древесины («ксилема») и внутренняя поверхность коры («флоэма») (Б) 8-летних безузорчатых деревьев карельской березы.

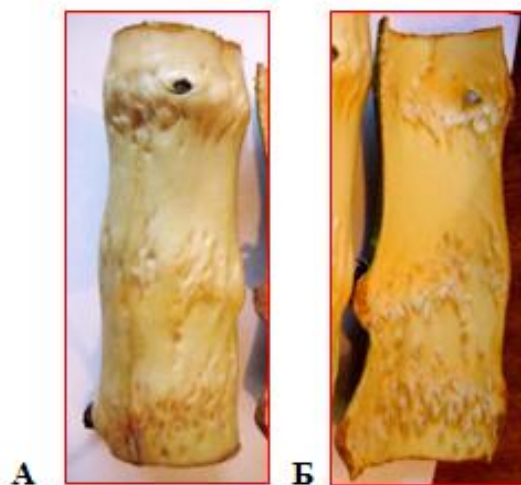


Рисунок 15. (А) Окоренная поверхность древесины («ксилема») и внутренняя поверхность коры («флоэма») (Б) 8-летних узорчатых деревьев карельской березы.

Безузорчатые деревья

В мае активность сахарозосинтазы в ксилеме и флоэме ствола безузорчатых деревьев карельской березы практически отсутствует. Очень низкие значения активности фермента были отмечены в октябре. Максимальные значения приходились на период камбиального роста: в ксилеме они наблюдались в июле, во флоэме – в июне.

В июне в ксилеме абсолютные значения активности сахарозосинтазы были низкими и составили 2,0 мкмоль сахарозы/мг белка·30 мин (Рисунок 16А). Содержание крахмала в ксилеме в этот период было 0,2 мг/г сухой ткани (Рисунок 17А).

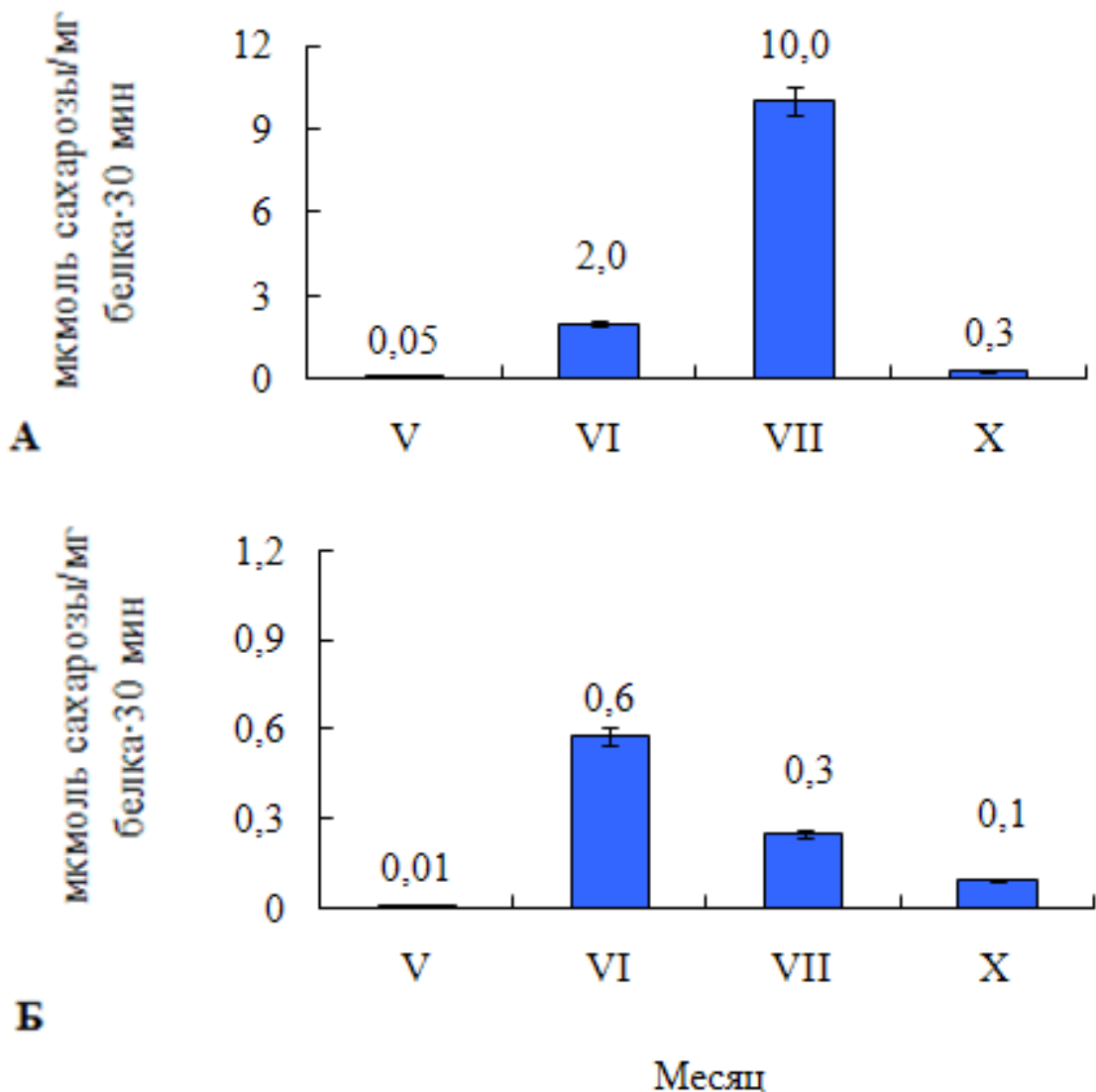


Рисунок 16. Активность сахарозосинтазы в ксилеме (А) и флоэме (Б) 8-летних безузорчатых деревьев карельской березы на разных этапах вегетационного периода. Бары – стандартное отклонение.

В июне во флоэме активность фермента была в 3,4 раза ниже, чем в ксилеме, в то же время для флоэмы это значение активности было самым высоким за весь исследуемый период (0,6 мкмоль сахарозы/мг белка·30 мин) (Рис 16Б). Сравнительно высокая активность сахарозосинтазы во флоэме коррелировала с интенсивным накоплением крахмала, содержание которого достигало 97,1 мг/г сухой ткани (Рисунок 17Б).

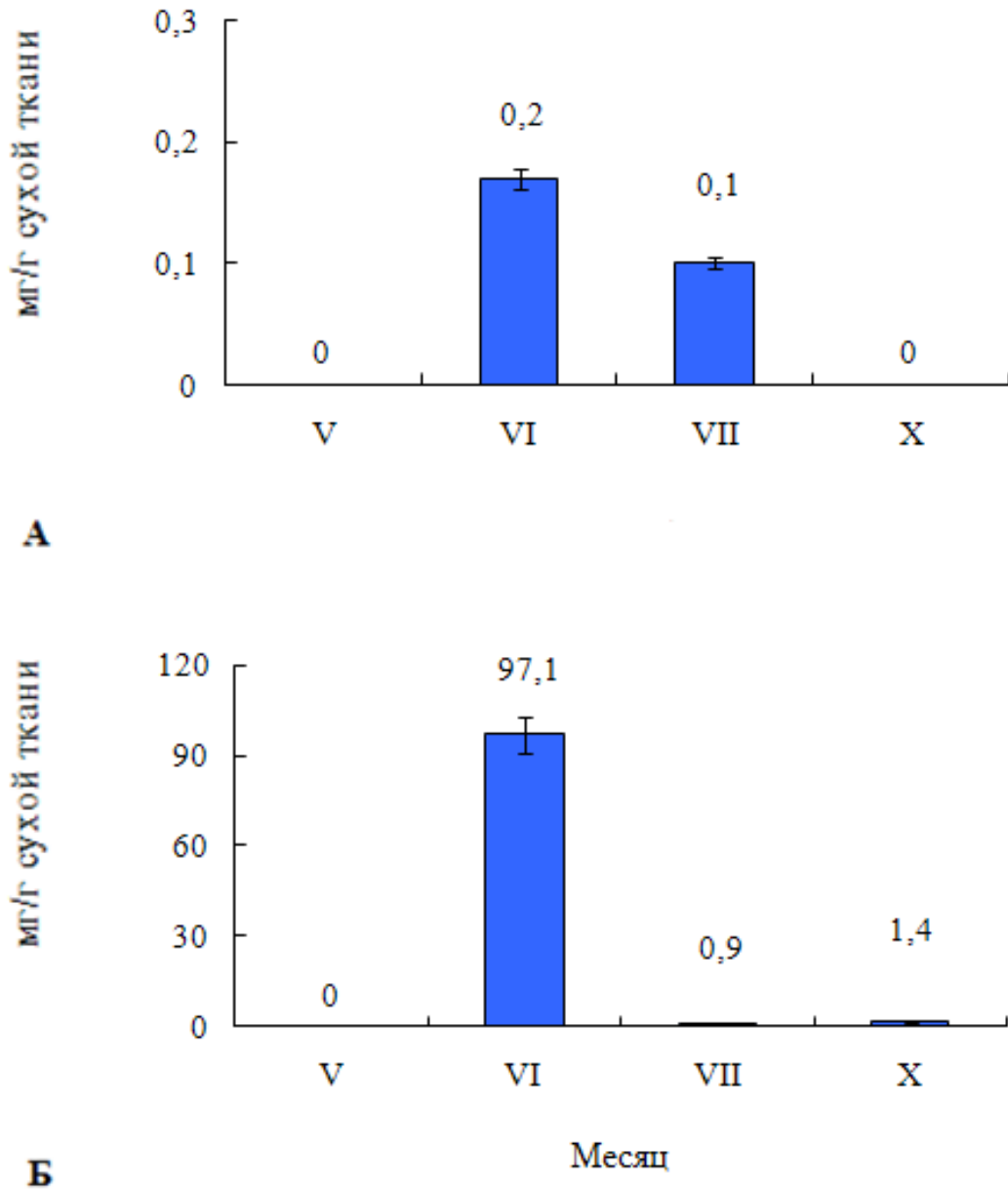


Рисунок 17. Содержание крахмала в ксилеме (А) и флоэме (Б) 8-летних безузорчатых деревьев карельской березы на разных этапах вегетационного периода. Бары – стандартное отклонение.

В июле активность сахарозосинтазы в ксилеме возросла в 5 раз и достигла своего максимального значения за весь исследуемый период (10,0 мкмоль сахарозы/мг белка·30 мин) (Рисунок 16А). Увеличение активности сахарозосинтазы сопровождалось снижением содержания крахмала до 0,1 мг/г сухой ткани (Рисунок 17А). Сильное увеличение в июле в ксилеме активности фермента сопровождалось снижением его активности во флоэме (0,3 мкмоль сахарозы/мг белка·30 мин) (Рисунок 16Б) и резким падением здесь содержания крахмала (Рисунок 17Б).

В октябре активность сахарозосинтазы в ксилеме и флоэме безузорчатых растений карельской березы была очень низкая – 0,3 мкмоль/мг белка·30 мин и 0,1 мкмоль/мг белка·30 мин соответственно (Рисунок 16). В ксилеме в этот период крахмал полностью отсутствовал (Рисунок 17А), его содержание во флоэме составило 1,4 мг/г сухой ткани (Рисунок 17Б).

Узорчатые деревья

В мае активность сахарозосинтазы в ксилеме и флоэме узорчатых деревьев практически отсутствовала (Рисунок 18). В июне активность фермента в ксилеме узорчатых растений (Рисунок 18А) была такой же, как у безузорчатой карельской березы (Рисунок 16А) (2,1 и 2,0 мкмоль сахарозы/мг белка·30 мин соответственно). Во флоэме активность сахарозосинтазы у узорчатых растений (Рисунок 18Б) была в 2 раза ниже по сравнению с безузорчатыми (Рисунок 16Б) (0,3 и 0,6 мкмоль сахарозы/мг белка·30 мин соответственно).

В июле активность сахарозосинтазы в тканях ствола узорчатых деревьев (Рисунок 18) была ниже, чем у безузорчатых (Рисунок 16): в ксилеме в 10 раз (10,0 и 1,0 мкмоль сахарозы/мг белка·30 мин соответственно), во флоэме в 5 раз (0,3 и 0,05 мкмоль сахарозы/мг белка·30 мин соответственно). В ксилеме узорчатых растений активность сахарозосинтазы в июле, по сравнению с июнем, была ниже в 2 раза (1,0 мкмоль сахарозы/мг белка·30 мин) (Рисунок 18А), что сопровождалось снижением количества крахмала в 3 раза (0,2 мг/г сухой ткани) (Рисунок 19А). Во флоэме у данной группы растений падение активности сахарозосинтазы с 0,3 мкмоль сахарозы/мг белка·30 мин в июне до 0,05 мкмоль сахарозы/мг белка·30 мин в июле (Рисунок 18Б) сопровождалось снижением содержания крахмала в паренхимных клетках флоэмы в 7,6 раза (с 6,1 до 0,8 мг/г сухой ткани) (Рисунок 19Б).

В октябре в ксилеме узорчатых деревьев активность сахарозосинтазы полностью отсутствовала (Рисунок 18А), крахмал здесь также не обнаруживался (Рисунок 19А). Во флоэме в этот период активность фермента, как и в июле, была очень низкой (0,05 мкмоль сахарозы/мг белка·30 мин) (Рисунок 18Б), и содержание крахмала тоже оставалось на низком уровне (1,8 мг/г сухой ткани) (Рисунок 19Б).

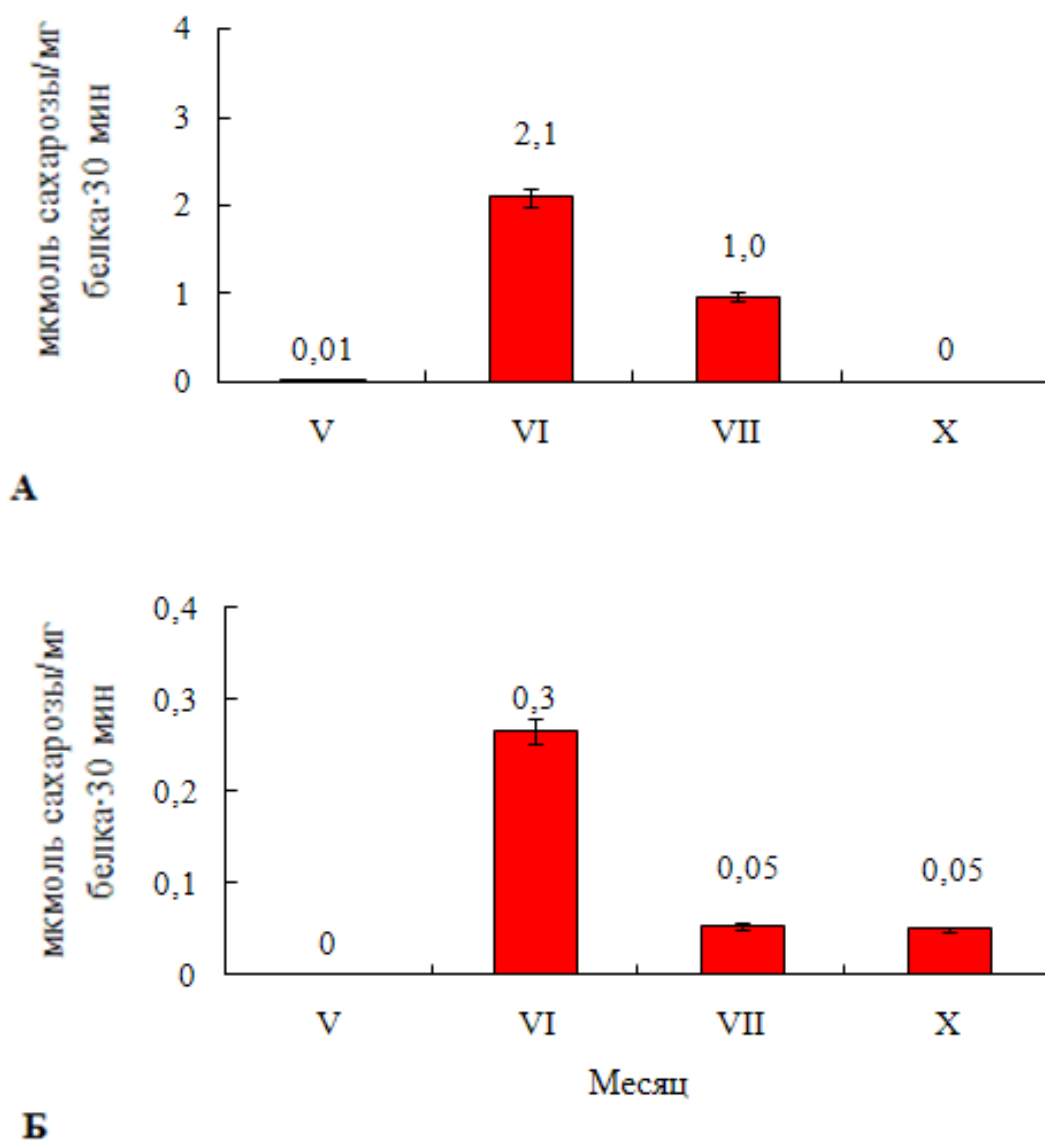


Рисунок 18. Активность сахарозосинтазы в ксилеме (А) и флоэме (Б) ствола 8-летних узорчатых деревьев карельской березы на разных этапах вегетационного периода. Бары – стандартное отклонение.

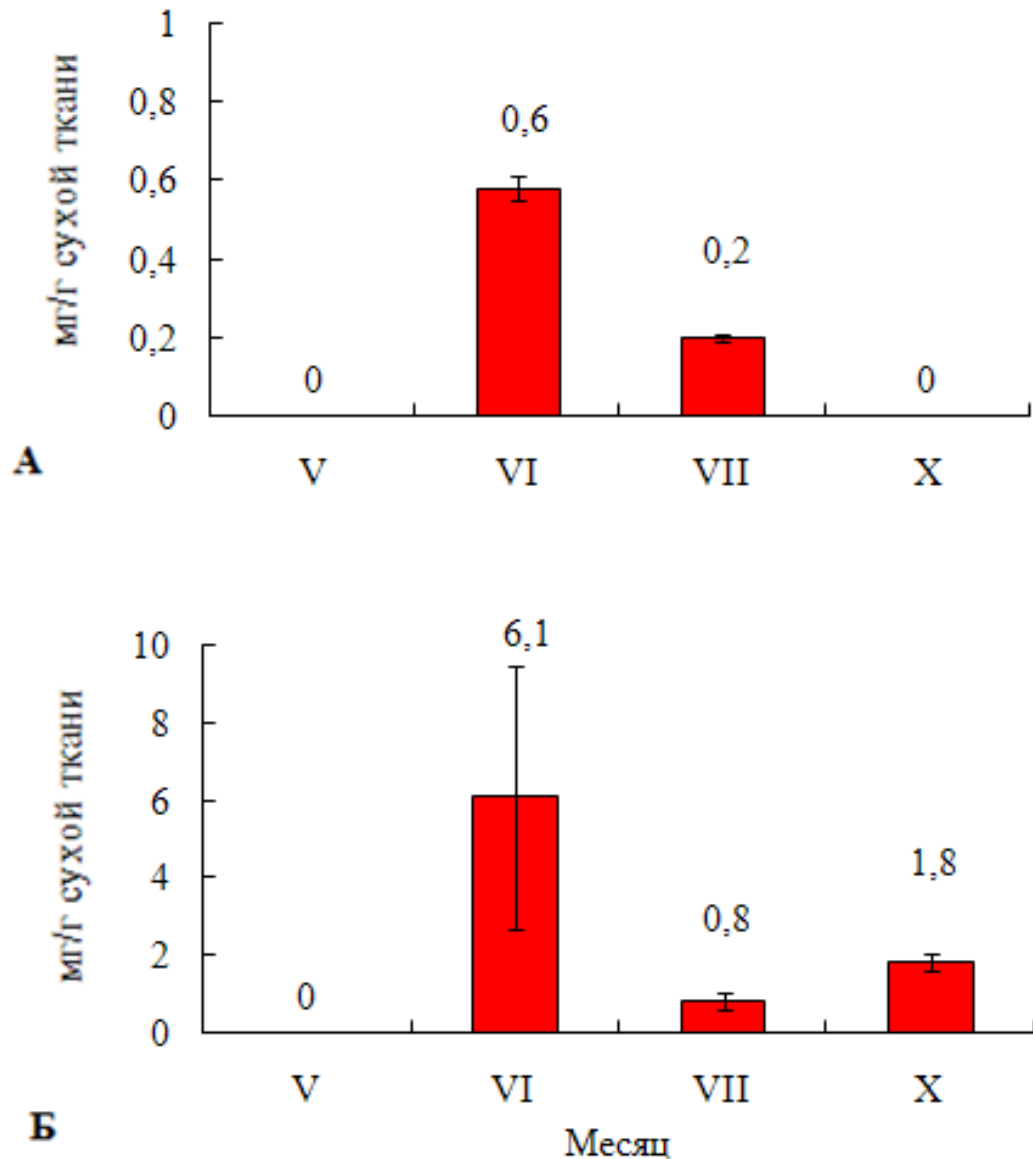


Рисунок 19. Содержание крахмала в ксилеме (А) и флоэме (Б) ствола 8-летних узорчатых деревьев карельской березы на разных этапах вегетационного периода. Бары – стандартное отклонение.

3.2.2 Ксилема и флоэма ствола деревьев обычной березы повислой и узорчатых деревьев карельской березы

Активность сахарозосинтазы исследовали в ксилеме и флоэме 40-летних деревьев обычной березы повислой (Рисунок 20) и узорчатых деревьев карельской березы (Рисунок 21) в те же сроки, что и у 8-летних растений (май, июнь, июль, октябрь).

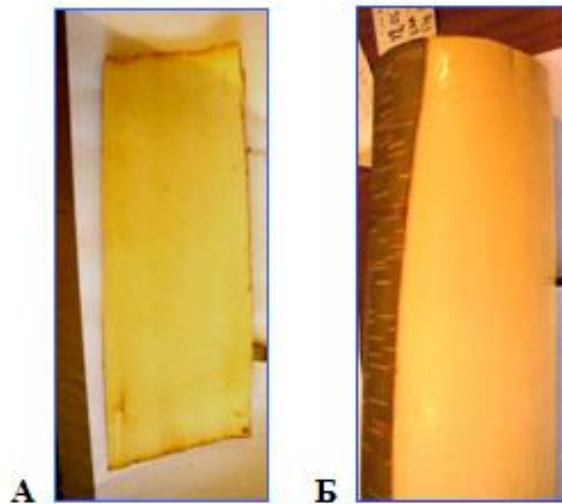


Рисунок 20. Внутренняя поверхность коры («флоэма») (А) и окоренная поверхность древесины («ксилема») (Б) 40-летних деревьев обычной березы повислой.

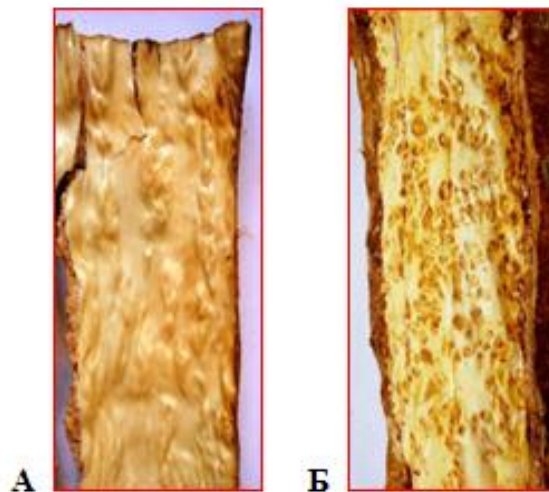


Рисунок 21. Внутренняя поверхность коры («флоэма») (А) и окоренная поверхность древесины («ксилема») (Б) 40-летних узорчатых деревьев карельской березы.

Обычная береза повислая

В мае у деревьев обычной березы активность сахарозсинтазы в ксилеме полностью отсутствует (Рисунок 22А), во флоэме ее значения составили 0,1 мкмоль сахарозы/мг белка 30 мин (Рисунок 22Б).

По сравнению с 8-летними безузорчатыми растениями карельской березы, у 40-летних деревьев обычной березы повислой в конце июня активность сахарозсинтазы в ксилеме существенно выше. Значения ее достигали 11,3 мкмоль сахарозы/мг белка·30

мин (Рисунок 22А). На фоне более высокой активности в ксилеме, во флоэме активность фермента была в 19 раз ниже (0,03 мкмоль сахарозы/мг белка·30 мин) (Рисунок 22Б), по сравнению с 8-летними безузорчатыми деревьями (0,6 мкмоль сахарозы/мг белка·30 мин) (Рисунок 16Б).

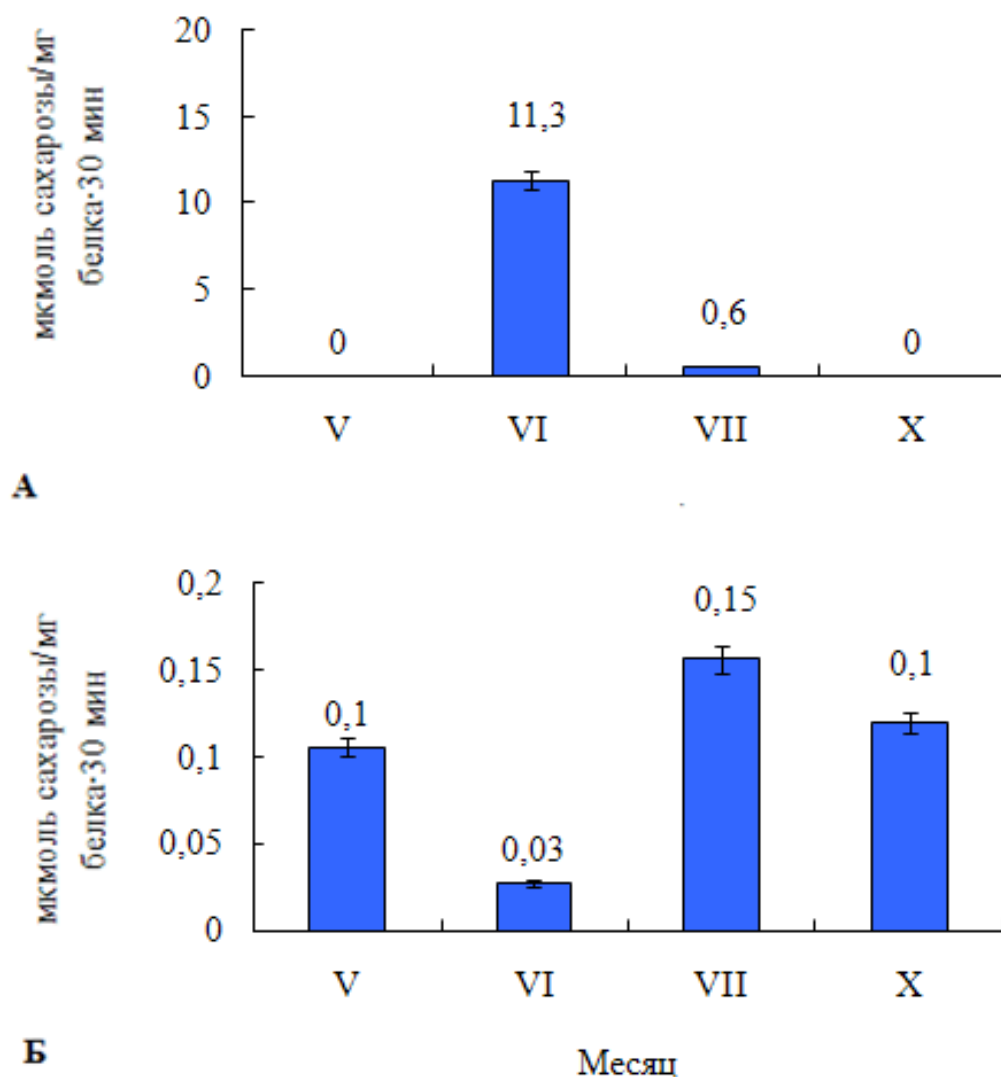


Рисунок 22. Активность сахарозосинтазы в ксилеме (А) и флоэме (Б) 40-летних деревьев обычной березы повислой на разных этапах вегетационного периода. Бары – стандартное отклонение.

В июле активность сахарозосинтазы в ксилеме не только не увеличилась, как это наблюдали у 8-летних растений, но резко, в 21 раз, снизилась (до 0,6 мкмоль сахарозы/мг белка·30 мин) (Рисунок 22А). Во флоэме ее активность возросла в 5 раз (до 0,15 мкмоль сахарозы/мг белка·30 мин) (Рисунок 22Б).

В октябрьский срок фиксации растительного материала активность сахарозосинтазы в ксилеме не наблюдалась (Рисунок 22А), во флоэме этот показатель существенно не изменился (0,1 мкмоль сахарозы/мг белка·30 мин) (Рисунок 22Б).

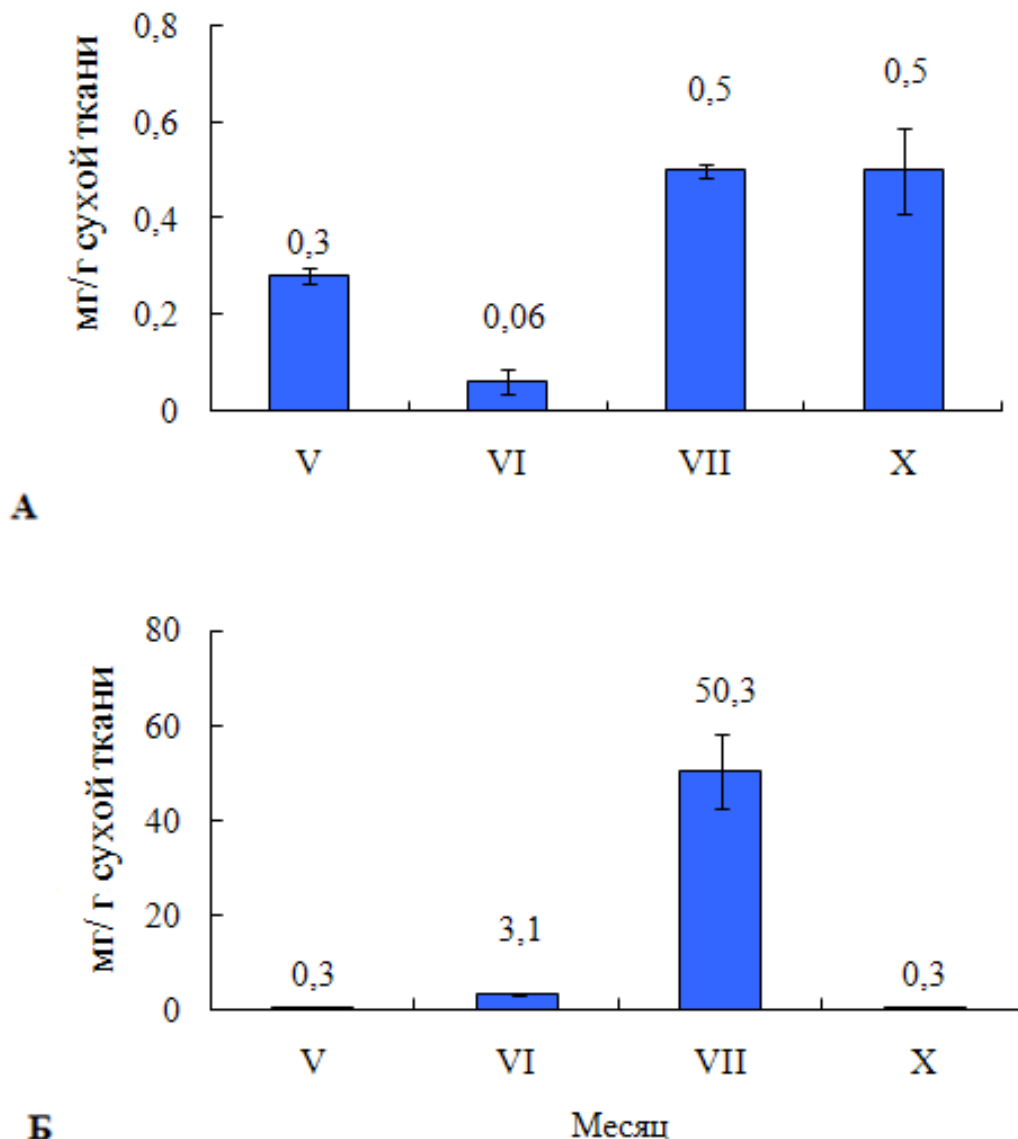


Рисунок 23. Содержание крахмала в ксилеме (А) и флоэме (Б) 40-летних деревьев обычной березы повислой на разных этапах вегетационного периода. Бары – стандартное отклонение.

Содержание крахмала в июне, при высокой активности сахарозосинтазы в ксилеме и низкой во флоэме, было низким в обеих тканях (ксилема – 0,06 мг/г сухой ткани, флоэма – 3,1 мг/г сухой ткани) (Рисунок 23), что в 2,8 и 31 раз ниже по сравнению с 8-летними безузорчатыми деревьями.

В июле в ксилеме на фоне низкой активности сахарозсинтазы наблюдалось повышение содержания крахмала в 8 раз (0,5 мг/г сухой ткани) (Рисунок 23А), во флоэме при возрастании активности фермента содержание крахмала увеличилось в 16 раз (50,3 мг/г сухой ткани) (Рисунок 23Б). Таким образом, во флоэме накопление крахмала происходило намного интенсивнее.

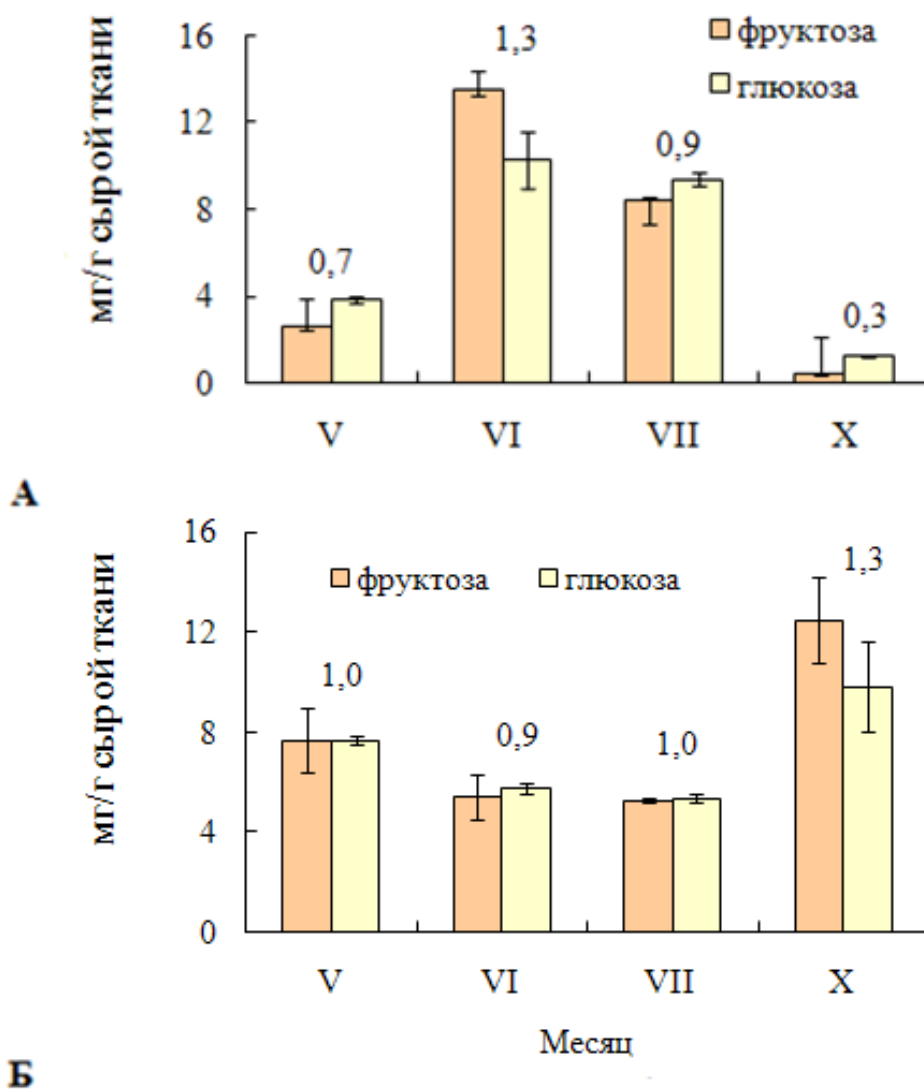


Рисунок 24. Содержание гексоз в ксилеме (А) и флоэме (Б) 40-летних деревьев обычной березы повислой на разных этапах вегетационного периода. Сверху указаны значения отношения фру/глю. Бары – стандартное отклонение.

Анализ содержания гексоз в тканях ствола обычной березы показал, что максимальное значение отношения фру/глю наблюдается в июне в ксилеме (1,3) (Рисунок 24А). Что касается флоэмы, то здесь в июне было отмечено минимальное для этой ткани отношение фру/глю (0,9) (Рисунок 24Б). В целом, это дает основание предположить концентрацию ростовых процессов в ксилеме в данный период и их

отсутствие или очень низкий уровень во флоэме. Данное предположение согласуется с высоким градиентом концентрации сахарозы между флоэмой и ксилемой в июне (74,5 мг/г сырой ткани) (Рисунок 25), который свидетельствует об активном расщеплении сахарозы в ксилеме.

В июле в ксилеме наблюдается существенное снижение отношения фру/глю (1,3 → 0,9) (Рисунок 24А). Во флоэме этот показатель, по сравнению с июнем, практически не меняется (0,9 → 1,0) (Рисунок 24Б).

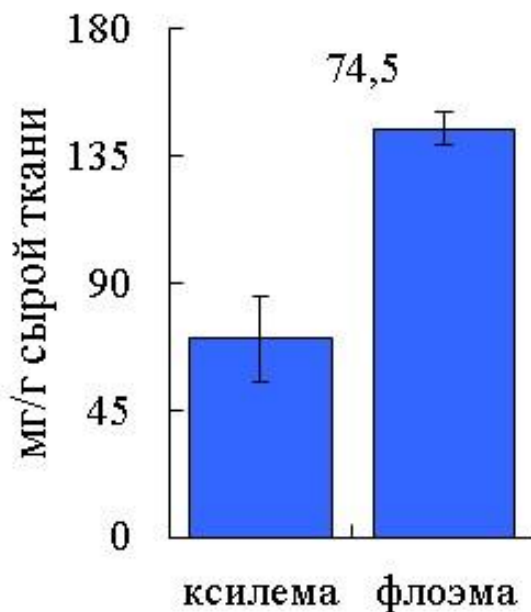


Рисунок 25. Содержание сахарозы в тканях ствола 40-летних деревьев березы повислой в период активного камбиального роста (июнь). Сверху указан градиент концентрации сахарозы между флоэмой и ксилемой. Бары – стандартное отклонение.

В мае и октябре значения отношения фру/глю в ксилеме самые низкие за все сроки взятия образцов (0,7 и 0,3 соответственно) (Рисунок 24А). Это наблюдается на фоне полного отсутствия активности сахарозосинтазы (Рисунок 23А), высокого содержания крахмала (Рисунок 23А) и низкого уровня гексоз (Рисунок 24А) в ткани. Во флоэме значение отношения фру/глю в мае равно 1,0 и в октябре 1,3 (Рисунок 24Б).

Карельская береза

В ксилеме 40-летних деревьев карельской березы в мае активность сахарозосинтазы, так же как и у обычной березы, полностью отсутствует (Рисунок 26А).

Во флоэме в этот период активность фермента едва обнаруживается (0,005 мкмоль сахаразы/мг белка·30 мин) (Рисунок 26Б).

В июне в ксилеме активность сахарозосинтазы составила 3,8 мкмоль сахаразы/мг белка·30 мин, что в 3 раза ниже, чем у обычной березы повислой. В июле ее активность снизилась в 2,4 раза (до 1,6 мкмоль сахаразы/мг белка·30 мин) (Рисунок 26А).

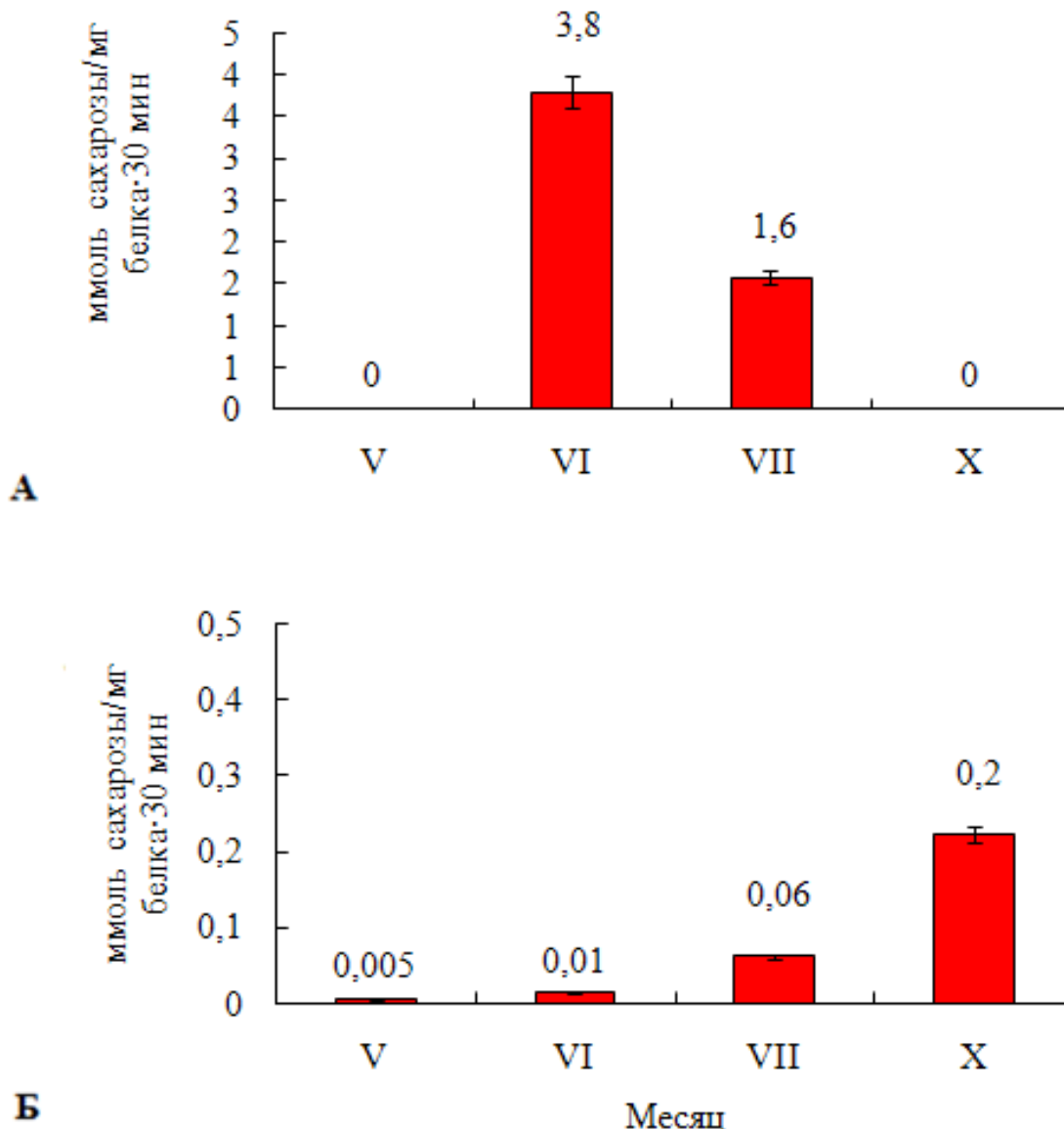


Рисунок 26. Активность сахарозосинтазы в ксилеме (А) и флоэме (Б) 40-летних узорчатых деревьев карельской березы на разных этапах вегетационного периода. Бары – стандартное отклонение.

Также как у 8-летних деревьев карельской березы и 40-летних деревьев обычной березы, у 40-летней узорчатой карельской березы в июне активность сахарозосинтазы во флоэме была намного ниже, чем в ксилеме. По сравнению с обычной березой, в июне

активность фермента во флоэме карельской березы была в 2 раза ниже и составила 0,01 мкмоль сахарозы/мг белка·30 мин. В июле во флоэме активность сахарозосинтазы возросла до 0,06 мкмоль сахарозы/мг белка·30 мин (Рисунок 26Б).

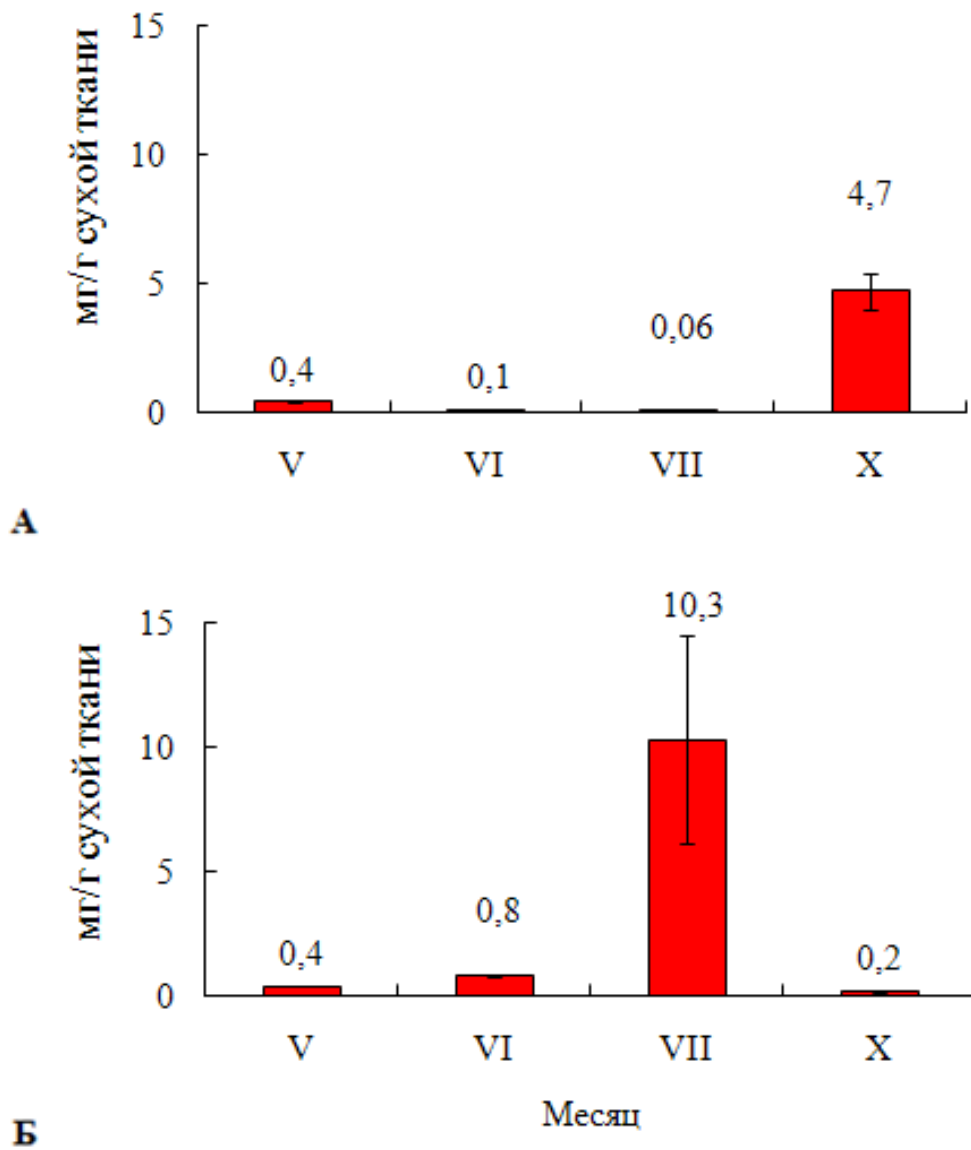


Рисунок 27. Содержание крахмала в ксилеме (А) и флоэме (Б) 40-летних деревьев карельской березы на разных этапах вегетационного периода. Бары – стандартное отклонение.

В октябре активность сахарозосинтазы в ксилеме карельской березы отсутствует (Рисунок 26А), так же, как это наблюдалось у обычной березы повислой (Рисунок 22А). Во флоэме в этот период у узорчатых растений активность сахарозосинтазы была в два раза выше, по сравнению с обычной березой повислой, и составила 0,2 мкмоль сахарозы/мг белка·30 мин (Рисунок 26Б).

В мае у карельской березы так же, как у обычной березы повислой, было низкое содержание крахмала: во флоэме и ксилеме его значение составило 0,4 мг/г сухой ткани (Рисунок 27).

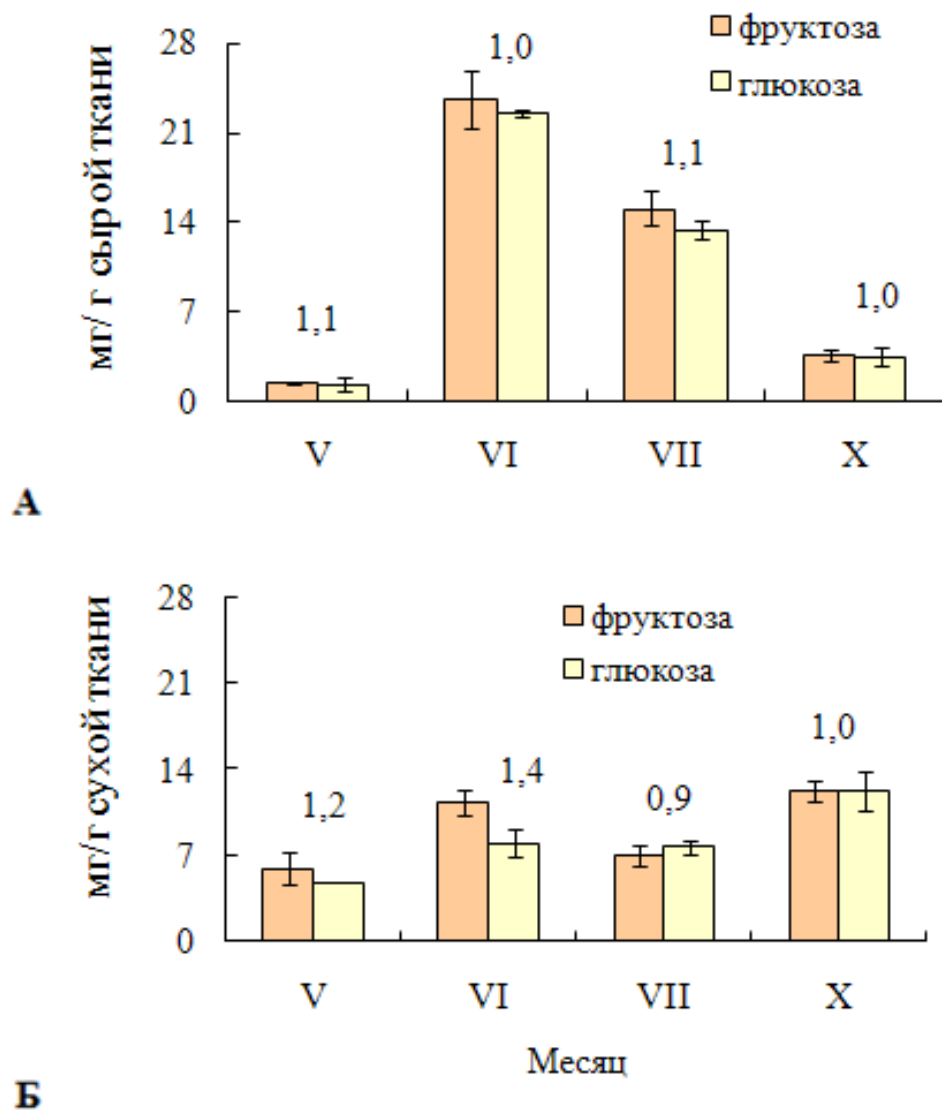


Рисунок 28. Содержание гексоз в ксилеме (А) и флоэме (Б) 40-летних деревьев карельской березы на разных этапах вегетационного периода. Сверху указаны значения отношения фру/глю. Бары – стандартное отклонение.

В июле при снижении метаболизма сахарозы сахарозсинтазой содержание крахмала в ксилеме карельской березы не увеличилось, как у обычной березы, а, наоборот, снизилось (июнь – 0,1 мг/г сухой ткани, июль – 0,06 мг/г сухой ткани) (Рисунок 27А). Во флоэме содержание крахмала в июне было ниже, по сравнению с обычной березой повислой (0,8 мг/г сухой ткани и 3,1 мг/г сухой ткани соответственно).

В июле повышение активности сахарозосинтазы во флоэме сопровождалось накоплением крахмала, его содержание в этот период увеличилось до 10,3 мг/г сухой ткани (Рисунок 27Б). Однако у карельской березы накопление крахмала во флоэме происходило менее интенсивно, чем это наблюдалось у растений обычной березы (у последних содержание крахмала в июле достигало 50,3 мг/г сухой ткани) (Рисунок 23Б).

Анализ содержания растворимых углеводов в тканях ствола карельской березы показал низкие значения отношения фру/глю в ксилеме ($\leq 1,1$). Наиболее высокие значения отношения фру/глю наблюдаются во флоэме в мае (1,2) и в июне (1,4) (Рисунок 28Б). У обычной березы повислой отношение фру/глю в июне было больше в ксилеме (Рисунок 24). Величина градиента концентрации сахарозы между флоэмой и ксилемой у карельской березы в июне (23,1 мг/г сырой ткани) (Рисунок 29) в 3 раза ниже, чем у обычной березы повислой (74,5 мг/г сырой ткани).

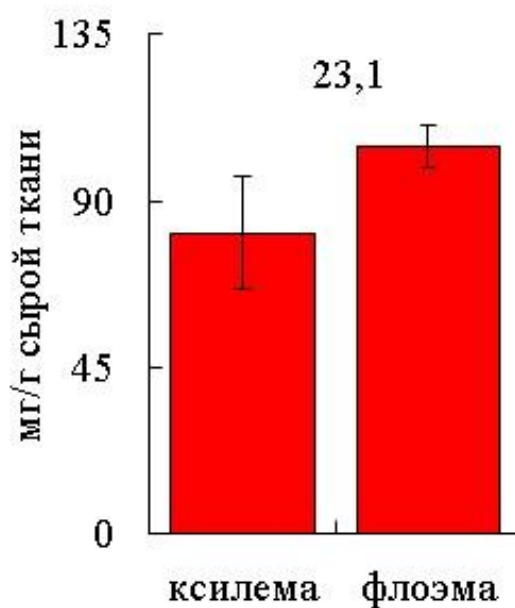


Рисунок 29. Содержание сахарозы в тканях ствола 40-летних деревьев карельской березы в июне. Сверху указан градиент концентрации сахарозы между флоэмой и ксилемой. Бары – стандартное отклонение.

3.3 Активность сахарозосинтазы в раннем онтогенезе обычной березы повислой и карельской березы

3.3.1 Сеянцы в возрасте 1,5 месяцев

Для анализа брали стебли и корни молодых растений обычной березы повислой (Рисунок 30А) и карельской березы (Рисунок 30Б).



Рисунок 30. Внешний вид 1,5-месячных сеянцев обычной березы повислой (А) и карельской березы (Б).

Обращает на себя внимание то, что в 1,5-месячном возрасте, как в стебле, так и в корне активность сахарозосинтазы выше у сеянцев карельской березы: в стебле в 1,5 раза, в корне в 2 раза (Рисунок 31). Важным является то, что у обеих форм березы активность фермента в корне выше, чем в стебле. У обычной березы эта разница составила 1,8 раза (12,3 мкмоль сахарозы/мг белка·30 мин и 22,1 мкмоль сахарозы/мг белка·30 мин соответственно), у карельской березы – 2,4 раза (17,6 мкмоль сахарозы/мг белка·30 мин и 41,6 мкмоль сахарозы/мг белка·30 мин соответственно). Из этого можно заключить, что у 1,5-месячных сеянцев корни обладают более высокой акцепторной силой, по сравнению со стеблем, что предполагает более интенсивные ростовые процессы. Причем, развитие корневой системы карельской березы протекает более активно.

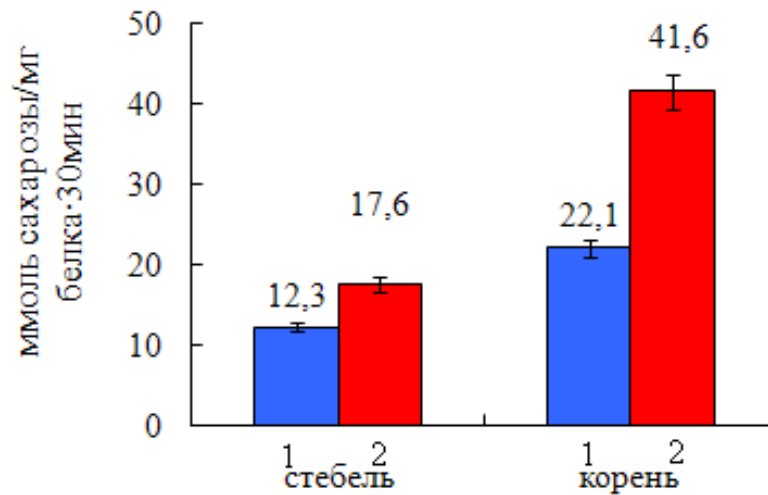


Рисунок 31. Активность сахарозосинтазы в акцепторных органах 1,5-месячных сеянцев двух форм березы повислой: 1 – обычная береза повислая, 2 – карельская береза. Бары – стандартное отклонение.

3.3.2 Сеянцы в возрасте 5 месяцев

Как и у более молодых сеянцев, для анализа брали стебли и корни опытных растений (Рисунок 32).

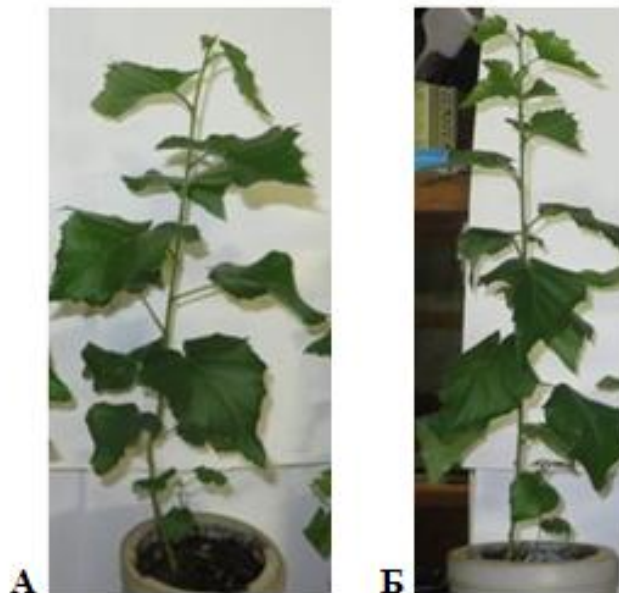


Рисунок 32. Внешний вид 5-месячных сеянцев обычной березы повислой (А) и карельской березы (Б).

У 5-месячных сеянцев обычной березы повислой, по сравнению с 1,5-месячными сеянцами, метаболизация сахарозы по сахарозосинтазному пути усиливается, особенно

в надземной части (Рисунок 33). Так, в стебле активность сахарозосинтазы (78,0 мкмоль сахарозы/мг белка·30 мин) выросла в 6,3 раза. В корне активность фермента увеличилась в 2,9 раза, ее значение здесь достигло 63,4 мкмоль сахарозы/мг белка·30 мин (Рисунок 33). Сопоставление корня и стебля демонстрирует более интенсивное расщепление сахарозы с участием сахарозосинтазы в стебле.

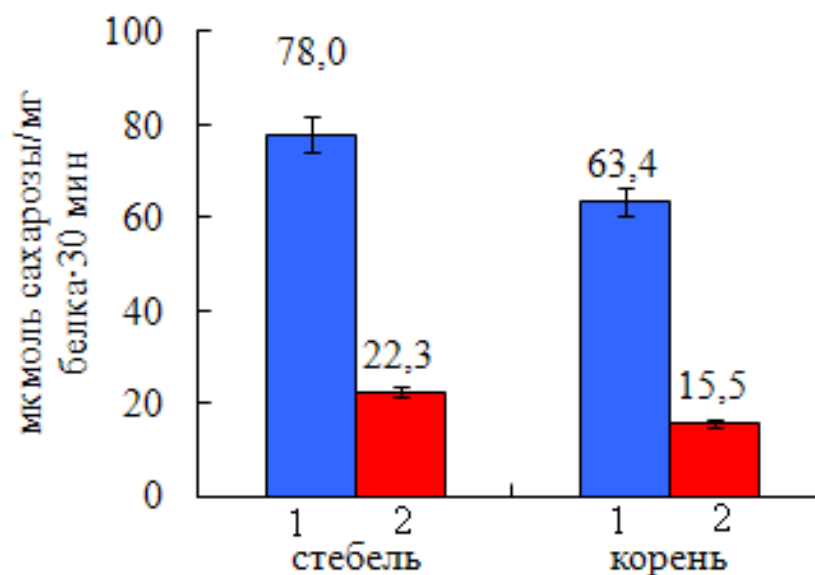


Рисунок 33. Активность сахарозосинтазы в акцепторных органах 5-месячных сеянцев обычной березы повислой (1) и карельской березы (2). Бары – стандартное отклонение.

Преобладание активности сахарозосинтазы в стебле, по сравнению с корнем, наблюдается и у 5-месячных сеянцев карельской березы (Рисунок 33). Однако в данном случае это вызвано не столько увеличением активности фермента в стебле (она выросла всего в 1,3 раза), сколько ее сильным снижением в корне (в 2,7 раза) – до 15,5 мкмоль сахарозы/мг белка·30 мин (Рисунок 33).

Сравнение между собой обычной березы повислой и карельской березы показывает, что у 5-месячных сеянцев обычной березы активность сахарозосинтазы в стебле намного выше (в 3,5 раза). Таким образом, уже в столь молодом возрасте исследуемые формы березы демонстрируют различия в активности сахарозосинтазы, которые ранее были нами показаны на взрослых деревьях.

3.3.3 Пятимесячные сеянцы, выращенные при дефиците азота

Исследовали влияние низкой обеспеченности азотом на активность сахарозсинтазы и морфометрические показатели у сеянцев двух форм березы повислой. Контролем служили сеянцы, растущие в условиях нормального азотного питания (Рисунок 32, 34А, Б). В предыдущем подразделе (п. 3.3.2) мы рассмотрели активность сахарозсинтазы в органах контрольных растений.

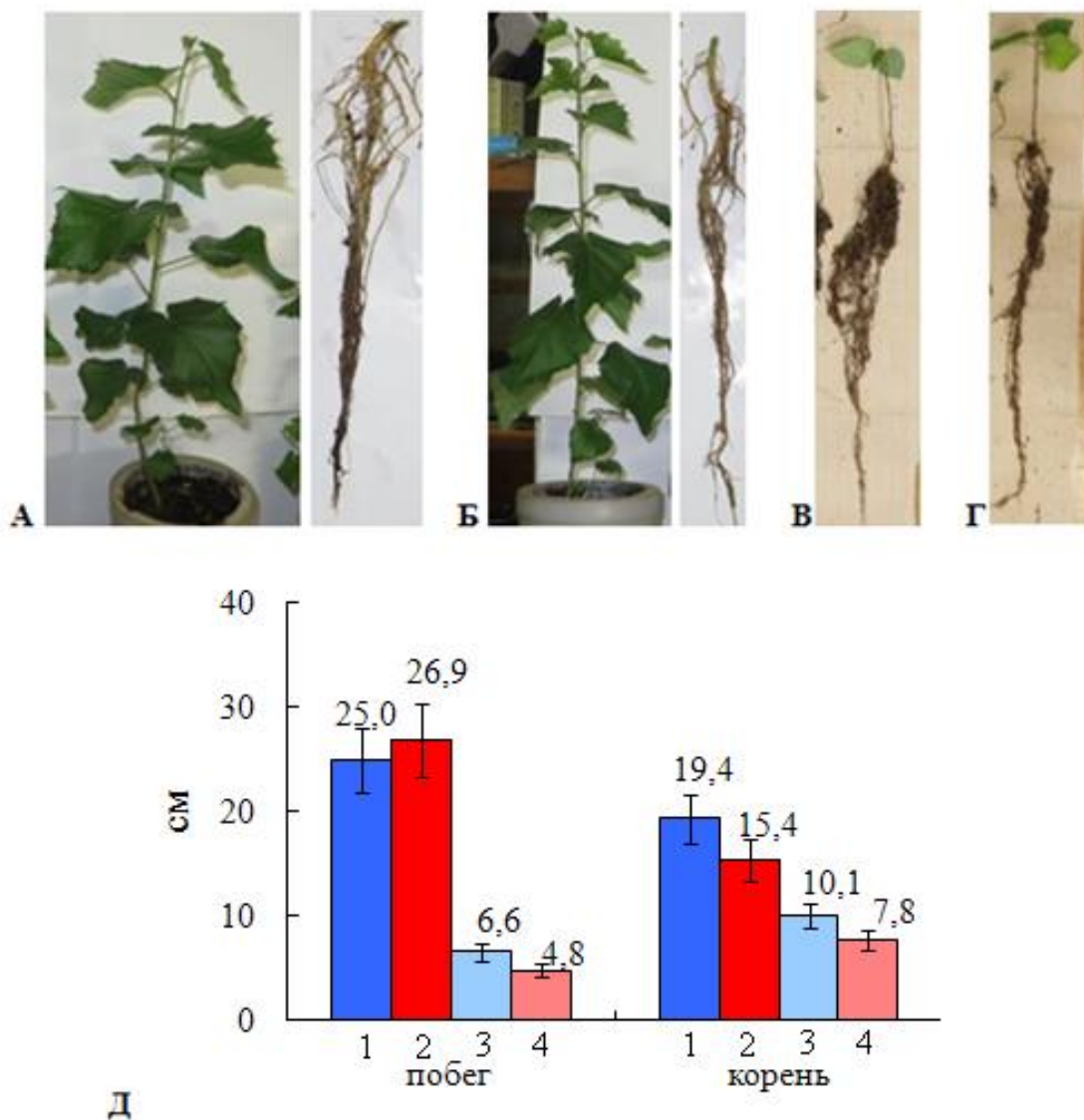


Рисунок 34. А – Г – Внешний вид 5-месячных сеянцев обычной (А, В) и карельской (Б, Г) березы, выращенных при нормальном уровне азота (А, Б) и недостатке азотного питания (В, Г); Д – длина побега и главного корня 5-месячных сеянцев обычной (1,3) и карельской (2, 4) березы, выращенных при нормальном уровне азота (1, 2) и недостатке азотного питания (3, 4). Бары – стандартное отклонение.

По сравнению с контролем, у растений, выращенных при дефиците азота (Рисунок 34В, Г), существенно снизилась длина побега: у обычной березы – в 4 раза и у карельской березы – в 6 раз. При этом длина главного корня, и в том и в другом случае, уменьшилась всего в 2 раза (Рисунок 34Д).

У сеянцев обычной березы, выращенных на субстрате с низким содержанием доступного азота, метаболизация сахарозы с участием сахарозосинтазы, по сравнению с контролем, снизилась как в стебле, так и в корнях: в стебле – в 20 раз, в корне – в 4 раза (Рисунок 35–1, 35-3). По сравнению с обычной березой, у сеянцев карельской березы активность сахарозосинтазы в стебле снизилась незначительно (в 1,7 раза), в корне изменения этого показателя практически не наблюдали (Рисунок 35–2, 35-4). В итоге, у растений карельской березы, выращенных при дефиците азота, активность сахарозосинтазы в стебле была в 3,3 раза выше, чем у аналогичных растений обычной березы.

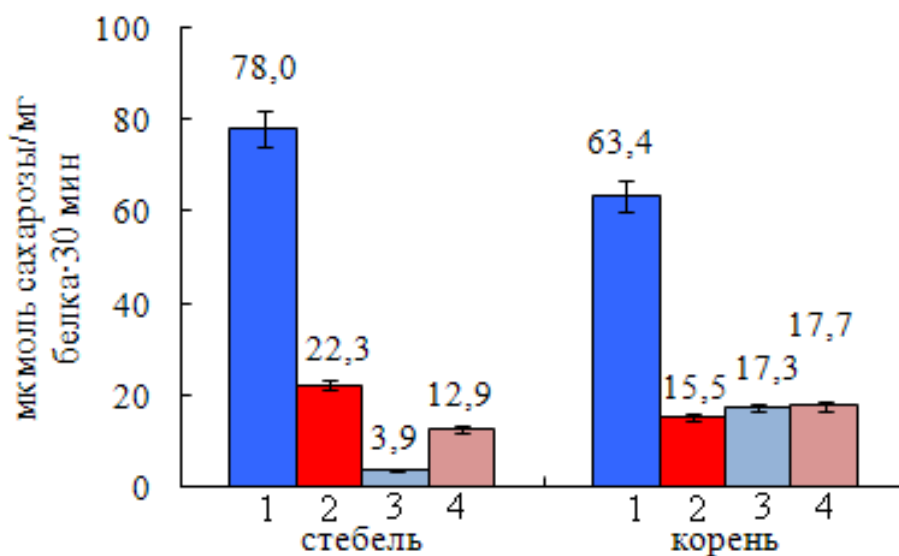


Рисунок 35. Активность сахарозосинтазы в акцепторных органах 5-месячных сеянцев обычной (1,3) и карельской (2, 4) березы, выращенных при нормальном уровне азота (1, 2) и недостатке азотного питания (3, 4). Бары – стандартное отклонение.

3.4 Экспрессия генов, кодирующих изоформы сахарозосинтазы, в ходе ксилогенеза обычной березы повислой и карельской березы

3.4.1 Ксилема ствола 10-летних деревьев обычной березы повислой и деревьев карельской березы с разной степенью развития структурных аномалий

Исследования проводили в период активного камбиального роста.

В ксилеме деревьев обычной березы повислой (см. Рисунок 11А-1) содержание транскрипта гена *SUS1* составило 0,6 отн. ед., что более чем в 10 раз выше, по сравнению с уровнем транскриптов генов *SUS2* и *SUS3* (0,06 и 0,04 отн. ед. соответственно) (Рисунок 36-1). Отличия в экспрессии генов *SUS2* и *SUS3* у данной формы березы не достоверны.

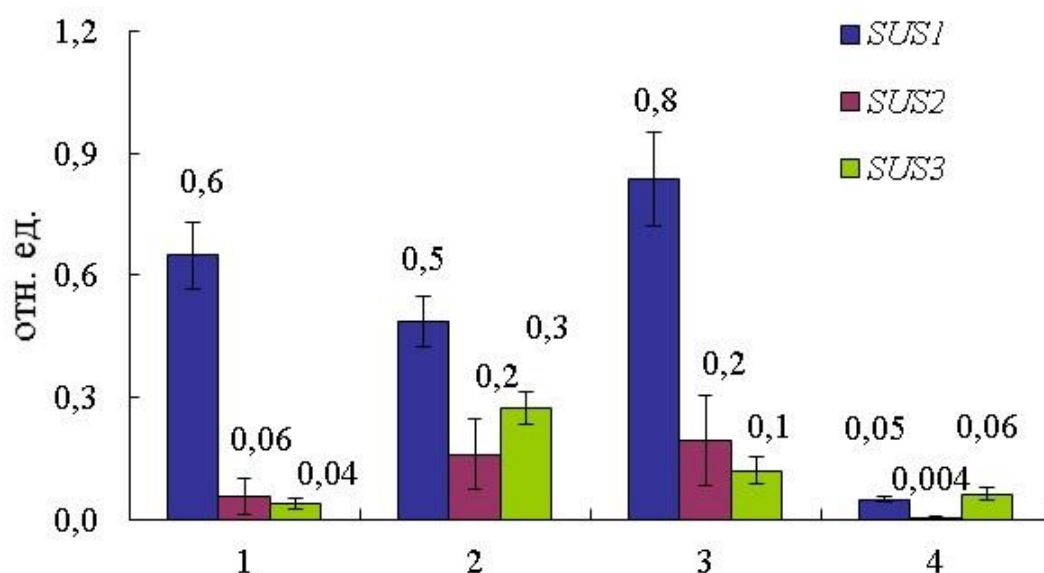


Рисунок 36. Относительный уровень экспрессии генов, кодирующих сахарозосинтазу, в ксилеме 10-летних деревьев березы повислой в период активного камбиального роста. 1 – деревья обычной березы повислой; 2 – деревья безузорчатой карельской березы; 3 – безузорчатая часть ствола узорчатых деревьев карельской березы; 4 – узорчатая часть ствола карельской березы. Бары – стандартное отклонение.

У деревьев безузорчатой карельской березы (см. Рисунок 11А-2), по сравнению с обычной березой, наблюдали более низкий уровень мРНК гена *SUS1* (0,5 отн. ед.) и более высокий – генов *SUS2* и *SUS3* (0,2 и 0,3 отн. ед. соответственно). У безузорчатых

растений, как и у обычной березы, в дифференцирующей ксилеме содержание транскрипта *SUS1* было выше, чем *SUS2* и *SUS3* (Рисунок 36-2).

Появление узорчатой древесины у карельской березы (см. Рисунок 11А-4) сопровождалось резким снижением количества транскриптов генов *SUS1* и *SUS2* до 0,05 и 0,004 отн. ед. соответственно (Рисунок 36-4). При этом содержание транскрипта гена *SUS3* (0,06 отн. ед.) достоверно не отличалось от такового у обычной березы.

Снижение уровня экспрессии генов *SUS1* и *SUS2* у карельской березы наблюдалось только в части ствола с узорчатой древесиной. В безузорчатой части ствола (см. Рисунок 11А-3) 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* (0,8 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* (0,2 отн. ед.) – в 90 раз выше, чем в узорчатой части, и в 3 раза выше, чем у обычной березы. Количество мРНК гена *SUS3* (0,1 отн. ед.) – в 2 раза выше, чем в узорчатой части и в 3 раза выше, чем у обычной березы (Рисунок 36-3).

В подразделе 3.1.2 мы рассматривали активность сахарозосинтазы в ксилеме 10-летних деревьев исследуемых форм березы в период камбиального роста (см. Рисунок 11Б). Сопоставление этих показателей с экспрессией генов свидетельствует о том, что наиболее высокие значения активности фермента (167,4 мкмоль сахарозы/мг белка·30 мин) соответствуют наиболее высокой экспрессии *SUS1* и *SUS2* (0,8 и 0,2 отн. ед.) (Рисунок 36). Из этого можно заключить, что в период деятельности камбия активность сахарозосинтазы в зоне формирования ксилемы зависит от уровня мРНК этих генов. Данный вывод подтвердили результаты корреляционного анализа, согласно которому активность фермента в наибольшей степени коррелирует с уровнем экспрессии гена *SUS1* ($R= 0,89$) (Рисунок 37А), в меньшей степени – с экспрессией гена *SUS2* ($R= 0,75$) (Рисунок 37Б), в случае гена *SUS3* (Рисунок 37В) корреляции не наблюдается.

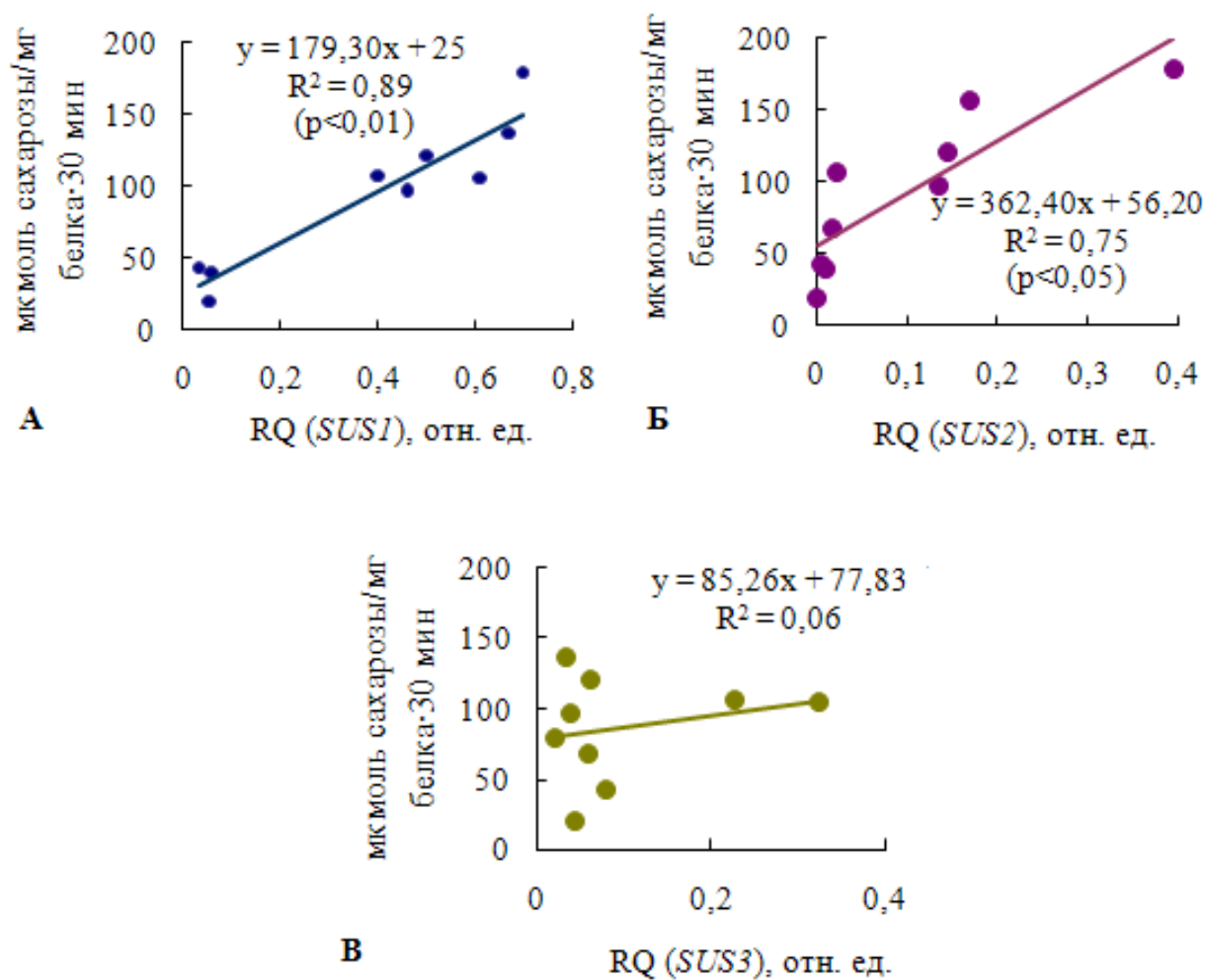


Рисунок 37. Зависимость активности сахарозосинтазы от уровня экспрессии генов *SUS1* (А), *SUS2* (Б) и *SUS3* (В) в ксилеме березы повислой. На графике указано уравнение зависимости, коэффициент корреляции (R^2) и уровень значимости (p). Бары – стандартное отклонение.

3.4.2 Стебель сеянцев обычной березы повислой и карельской березы

У 1,5-месячных растений, выращенных из семян обычной березы повислой (см. Рисунок 27), экспрессия генов *SUS1* и *SUS2* в стебле была очень низкой (0,004 и 0,003 отн. ед. соответственно) (Рисунок 39-1). У сеянцев карельской березы (см. Рисунок 30) значения экспрессии были выше, чем у обычной березы повислой: уровень транскрипции гена *SUS1* составил 0,015 отн. ед., гена *SUS2* 0,011 отн. ед. (Рисунок 39-2). Выявленные различия по уровню экспрессии изучаемых генов согласуются с данными по активности сахарозосинтазы. Более высокая активность фермента на ранних этапах онтогенеза была показана для растений, выращенных из семян карельской березы (17,6

мкмоль сахарозы/мг белка·30 мин), по сравнению с обычной березой повислой (12,3 мкмоль сахарозы/мг белка·30 мин) (см. Рисунок 31).

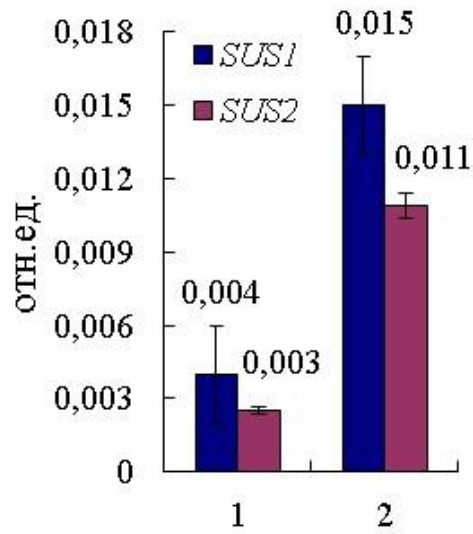


Рисунок 39. Относительная экспрессия генов, кодирующих сахарозосинтазу, в стебле 1,5-месячных сеянцев обычной березы повислой (1) и карельской березы (2). Бары – стандартное отклонение.

4.1 Активность сахарозосинтазы на разных этапах вегетационного периода

Изучение активности сахарозосинтазы в тканях ствола березы повислой на разных этапах вегетационного периода было проведено на 8-летних (Рисунки 16, 18) и 40-летних (Рисунки 22, 26) деревьях обычной березы повислой и узорчатой карельской березы. Установлено, что в течение вегетационного периода активность фермента сильно изменяется.

У древесных растений рост и развитие тканей ствола осуществляются за счет притока фотоассимилятов из листьев. У березы повислой основной транспортной формой фотоассимилятов является сахароза (Колесниченко, 1985; Новицкая и др., 2015). В данной связи активность сахарозосинтазы в тканях ствола березы, с одной стороны, может дать информацию о снабжении тканей сахарозой, с другой – об интенсивности утилизации дисахарида.

Исследования Ю.Л. Цельникер и И.С. Малкиной (1986), выполненные на березе повислой, показали, что экспорт ассимилятов из ее листьев начинается, когда лист достигает 50% своего конечного размера. У березы повислой в условиях Карелии листовой аппарат становится донором ассимилятов со второй половины июня (Николаева, Новицкая, 2007). В мае основная масса сахарозы расходуется на рост и развитие листьев, ее отток в ствол не происходит. Это согласуется с практическим отсутствием активности сахарозосинтазы в мае, как в ксилеме, так и во флоэме исследованных растений (Рисунки 16, 18, 22, 26). В третьей декаде июня и июле фотосинтезирующие листья деревьев березы являлись донорами ассимилятов – сахарозы, которая по проводящей флоэме оттекала в ствол и обеспечивала рост и развитие ксилемы и флоэмы. В этот период мы обнаружили наибольшие для каждой из указанных тканей значения активности сахарозосинтазы. Октябрьский срок взятия образцов приходился на период подготовки растений к состоянию покоя. Среднесуточная температура воздуха в этот день приблизилась к нулю градусов (Рисунки 2), поэтому метаболические процессы в тканях были сильно заторможены. Это соответствует отсутствию или низкой активности сахарозосинтазы в ксилеме и флоэме ствола деревьев березы повислой (Рисунки 16, 18, 22, 26).

Полученные данные свидетельствуют о том, что из всех сроков взятия образцов наибольшая активность сахарозосинтазы в тканях ствола деревьев березы повислой

наблюдалась во время камбиального роста. Из этого следует, что в стволе березы работа фермента связана с деятельностью камбия, а значит, формированием проводящих тканей – ксилемы и флоэмы.

4.2 Различия в активности сахарозосинтазы между ксилемой и флоэмой ствола деревьев березы повислой

Мы провели сравнительный анализ активности сахарозосинтазы в ксилеме и флоэме ствола деревьев березы повислой в период деятельности камбия. У обычной березы повислой активность фермента в ксилеме превосходила данный показатель во флоэме у 6-летних деревьев в 39 раз, 8-летних (июнь) в 3 раза, 8-летних (июль) в 40 раз, 40-летних (июнь) в 377 раз. У узорчатых растений карельской березы сахарозосинтазная активность в ксилеме превышала активность фермента во флоэме у 6-летних деревьев – в 7 раз, 8-летних (июнь) – в 8 раз, 8-летних (июль) – в 19 раз, 40-летних (июнь) – в 379 раз (Рисунки 5, 8, 16, 18, 22, 26).

Таким образом, во всех исследованных вариантах активность сахарозосинтазы была намного выше в ксилеме, по сравнению с флоэмой.

4.3 Различия в активности сахарозосинтазы при нормальном и аномальном ксилогенезе у деревьев березы повислой

Сопоставление активности сахарозосинтазы в ходе формирования древесины нормального строения и древесины с хорошо выраженными структурными аномалиями выявило существенную разницу между ними.

Среди изученных групп деревьев наиболее насыщенная узорчатая текстура древесины наблюдалась у 10-ти и 40-летних деревьев карельской березы. У 10-летних деревьев образцы древесины нормального строения были взяты со стволов обычной березы, безузорчатой карельской березы и в безузорчатых участках ствола узорчатых деревьев карельской березы. Во всех этих вариантах активность сахарозосинтазы была в 3,4–5,5 раз выше, чем в древесине узорчатых участков ствола карельской березы (Рисунки 11Б). У 40-летних деревьев в нормальной по строению древесине обычной березы активность сахарозосинтазы в период деятельности камбия (июнь) была в 3 раза выше, чем в узорчатой древесине карельской березы (Рисунки 22А, 26А).

На основе представленных данных можно заключить, что у березы повислой формирование древесины нормального строения происходит на фоне высокой

активности сахарозосинтазы, а рост и развитие древесины с насыщенной узорчатой текстурой связано с резким снижением активности фермента.

В связи с выявленными особенностями представляют интерес молодые деревья карельской березы, которые находятся на начальных стадиях формирования структурных аномалий тканей ствола (6-ти и 8-летние растения). Биохимический анализ показал, что у 6-летних узорчатых деревьев карельской березы активность сахарозосинтазы в ксилеме, по сравнению с обычной березой, также снижена, но незначительно (139,4 и 151,7 мкмоль сахарозы/мг белка·30 мин у карельской и обычной березы соответственно) (Рисунки 5, 8).

Отдельного внимания заслуживают 8-летние деревья, поскольку, в данном случае, мы имеем возможность сравнить результаты, полученные на разных этапах деятельности камбия – в первую и последнюю декады его активности (20.06 и 20.07). Начало камбиального роста характеризовалось близкими значениями активности сахарозосинтазы в ксилеме обычной и карельской березы (2,0 и 2,1 мкмоль сахарозы/мг белка·30 мин у обычной и карельской березы соответственно) (Рисунки 16, 18). В конце июля активность фермента в ксилеме карельской березы была в 10,4 раза ниже, по сравнению с обычной березой. Данное явление можно объяснить следующим образом. В работах авторов, занимающихся изучением карельской березы, указывается, что развитие структурных аномалий ксилемы у этого древесного растения имеет пульсирующий характер: обычно в начале вегетационного периода камбий откладывает древесину нормального строения, а во второй половине вегетации возобновляется развитие аномалий (Любавская, 1978; Новицкая, 2008; Novitskaya et al., 2016). С этой точки зрения резкое снижение активности сахарозосинтазы в ксилеме карельской березы во второй половине июля находится в соответствии с нашим выводом о взаимосвязи между падением активности фермента и формированием узорчатой древесины.

Следует отметить, что прерывание развития структурных аномалий при формировании узорчатой древесины карельской березы происходит в начале каждого вегетационного периода, однако ширина слоя нормальной древесины, откладываемой после весеннего пробуждения камбия, у разных деревьев может сильно различаться. Важную роль в этом играют погодные условия, местопроизрастание деревьев и их физиологическое состояние. В нашем случае у 10-ти и 40-летних деревьев карельской

березы слой нормальной древесины был очень узким, и на момент взятия образцов развитие структурных аномалий у них уже возобновилось. У молодых деревьев (6 и 8 лет) в начале сезона период нормального камбиального роста был более продолжительным. Это, по нашему мнению, явилось причиной близких значений активности сахарозосинтазы в ксилеме молодых деревьев обычной и карельской березы при фиксации образцов 20.06 (8-летние деревья) и 03.07 (6-летние деревья). Во второй половине вегетации (20.07) у 8-летних деревьев развитие структурных аномалий древесины возобновилось, и это коррелировало с 10-кратным снижением активности сахарозосинтазы.

4.4 Участие сахарозосинтазы в синтезе целлюлозы

Образование ксилемы (ксилогенез) у древесных растений происходит поэтапно и включает деление ксилемных производных камбия, их рост и дифференциацию, которые сопровождаются отложением вторичной клеточной стенки, ее лигнификацией и отмиранием протопласта (Savidge, 2000; Plomion et al., 2001; Du, Groover, 2010; Ye, Zhong, 2015). В ходе ксилогенеза активное включение сахарозосинтазы 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).

Известно, что в клетке сахарозосинтаза может находиться в свободном (фосфорилированная форма) или связанном с цитоплазматической мембраной состоянии. Участие сахарозосинтазы в формировании клеточной стенки обеспечивается за счет образования комплексов из ее мембраносвязанной формы с целлюлозосинтазой (Amor et al., 1995; Sturm, Tang, 1999, Koch, 2004). Считается, что УДФ-глюкоза, образующаяся в ходе сахарозосинтазного расщепления сахарозы, служит субстратом для синтеза микрофибрилл целлюлозы – основного структурного компонента клеточных стенок (Amor et al, 1995; Coleman, 2006; Coleman et al., 2009; Ruan, 2014). Наши данные также показывают важную роль сахарозосинтазы в синтезе целлюлозы клеточных стенок ксилемы. На 10-летних деревьях обычной березы повислой и карельской березы выявлена четкая корреляция между активностью фермента и содержанием этого структурного полисахарида: чем выше активность сахарозосинтазы, тем выше содержание целлюлозы, и наоборот (Рисунки 11Б, 13).

В последнее время появляется все больше работ, в которых участие сахарозосинтазы 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). На взрослых деревьях тополя (*Populus tremula*) (Andersson-Gunneras et al., 2006) и сеянцах его гибридных линий *P. alba*×*P. gradidentata* (Hertzberg et al., 2001), *P. deltoides*×*P. trichocarpa* (Song et al., 2010), *P. tremula*×*P. tremuloides* (Gerber et al., 2014) выявлена корреляция между уровнем экспрессии генов, кодирующих сахарозосинтазу, и количеством содержащейся в древесине целлюлозы. Наиболее высокая экспрессия в ксилеме тополя установлена для гена *SUS1*. Известно, что гены *SUS1* и *SUS2* кодируют изоформы сахарозосинтазы SuSy1 и SuSy2, которые у древесных растений имеют перекрывающиеся биологические функции, основной из которых является поставка углерода к месту синтеза клеточных стенок ксилемы (Geisler-Lee et al., 2006).

Наши исследования древесины ствола деревьев березы повислой в период камбиального роста, наряду с корреляцией между активностью сахарозосинтазы и содержанием целлюлозы (Рисунки 11Б, 13), выявили высокий коэффициент корреляции между активностью сахарозосинтазы и уровнем экспрессии гена *SUS1* (Рисунки 11Б, 36, 37А). Из этого можно заключить, что в ходе ксилогенеза березы повислой сахарозосинтаза участвует в синтезе целлюлозы, причем обеспечение субстратом синтеза целлюлозы является одной из главных функций фермента.

4.5 Активность сахарозосинтазы и структурные особенности ксилемы березы повислой

Представленные выше данные свидетельствуют о том, что у березы повислой (а) активность сахарозосинтазы намного выше в ксилеме, по сравнению с флоэмой, (б) активность сахарозосинтазы в ксилеме тесно связана с синтезом целлюлозы, (в) среди исследованных образцов ксилемы более высокие значения активности фермента характерны для древесины нормального (типичного для вида) строения. Структурную основу нормальной древесины березы повислой составляют волокна и сосуды, на долю которых, по данным А.Я. Любавской (1978), приходится около 80% всех структурных

элементов. Зрелые волокна и сосуды березы повислой лишены протопласта и представлены исключительно клеточными оболочками, основную массу которых образуют микрофибриллы целлюлозы (Барильская, 1978 а, б). Сопоставление структурных особенностей нормальной древесины березы повислой и результатов наших исследований позволяет заключить, что формирование древесины березы повислой, в которой преобладают волокна и сосуды, связано с высокой активностью сахарозосинтазы.

По сравнению с нормальной древесиной, в зонах структурных аномалий древесины карельской березы содержание волокон меньше в 3 раза, сосудов меньше в 12 раз, а клеток паренхимы больше в 5 раз (Любавская, 1978). Исследования Л.А. Барильской (Барильская, 1978б) показали, что в ксилеме березы повислой толщина клеточных стенок у клеток паренхимы в 1,5 раза меньше, чем у сосудов и в 2 раза меньше, чем у волокнистых элементов. Из этого следует, что массовая дифференцировка клеток паренхимы в древесине березы должна коррелировать со снижением в ткани активности сахарозосинтазы и содержания целлюлозы. Данный вывод согласуется с результатами наших исследований. Взаимосвязь между аномальным ксилогенезом карельской березы и падением активности сахарозосинтазы была нами рассмотрена в п. 3 Обсуждения. На Рисунке 13 можно видеть, что в узорчатой древесине карельской березы содержание целлюлозы существенно меньше, чем в древесине нормального строения. Следовательно, развитие структурных аномалий древесины карельской березы сопровождается уменьшением содержания целлюлозы.

Полученные данные указывают на то, что при проведении сравнительного анализа образцов древесины березы повислой, различающихся по насыщенности текстуры древесины, значения активности сахарозосинтазы могут служить показателем степени аномальности строения древесины.

4.6 Деятельность камбия в сторону ксилемы и флоэмы

У древесных растений активность камбия, как правило, в большей степени направлена в сторону формирования ксилемы, что объясняет большую ее массовую и объемную долю, по сравнению с флоэмой (Plomion et al., 2001).

Мы провели сравнительный анализ деятельности камбия в сторону ксилемы и флоэмы у 6-ти и 40-летних деревьев обычной березы повислой и карельской березы с

узорчатой древесиной ствола. В качестве показателя интенсивности ростовых процессов использовали значение отношения фруктоза/глюкоза. Данный подход основан на том, что глюкоза быстро включается в метаболические реакции, в то время как фруктоза медленнее вовлекается в метаболизм, поэтому в активно растущих тканях при расщеплении сахарозы наблюдается увеличение концентрации фруктозы (Курсанов, 1976; Софронова, 1985; Ugglä et al., 2001; Magel et al., 2006; Новицкая, Галибина, 2011; Новицкая и др., 2015).

У 6-летних растений обычной березы повислой отношение фру/глю в ксилеме в период камбиального роста (03.07) составило 3,3, во флоэме – 1,1, у 40-летних деревьев (20.06) – 1,3 в ксилеме и 0,9 во флоэме (Рисунки 7, 24). Таким образом, у обычной березы повислой отношение фру/глю свидетельствует о преобладании ростовых процессов со стороны ксилемы, по сравнению с флоэмой.

У растений карельской березы, которые находились на начальных этапах формирования узорчатой древесины (6 лет), ростовые процессы со стороны ксилемы также протекали интенсивнее, чем во флоэме (отношение фру/глю в ксилеме 2,8, во флоэме – 1,0) (см. Рисунок 10). В то же время, сравнение с одновозрастными растениями обычной березы указывает на то, что у карельской березы рост ксилемы несколько замедлился.

Что касается 40-летних деревьев карельской березы с ярко выраженной узорчатой древесиной, в их ксилеме отношение фру/глю приблизилось к единице (1,0). При этом следует подчеркнуть, что во флоэме этих деревьев отношение фру/глю составило 1,4, т.е. было существенно выше, чем в ксилеме. Следовательно, у узорчатых деревьев карельской березы ростовые процессы более активно шли со стороны флоэмы, чем со стороны ксилемы.

В целом, представленные данные указывают на важное отличие деятельности камбия у исследованных деревьев обычной березы повислой и карельской березы: у обычной березы активность камбия была направлена, главным образом, на формирование ксилемы, тогда как у узорчатых деревьев карельской березы имела место переориентация камбиального роста в сторону флоэмы. Данный вывод согласуется с известным фактом, что деревья карельской березы с насыщенной текстурой древесины имеют меньший диаметр ствола, по сравнению с одновозрастными деревьями обычной

березы повислой, и толщина коры у них в 4-6 и более раз больше, чем у обычной березы повислой (Ермаков, 1986; Novitskaya, Kushnir, 2006; Новицкая, 2008).

4.7 Роль сахарозосинтазы в создании акцепторной силы ксилемы

Основную массу нормальной древесины березы повислой составляют целлюлозные клеточные стенки. Сахарозосинтаза расщепляет молекулу сахарозы с образованием УДФ-глюкозы, которая служит субстратом для синтеза мономера целлюлозы – глюкозы. Поэтому активность сахарозосинтазы должна играть важную роль в создании акцепторной силы ксилемы. В качестве показателя этой силы можно рассматривать градиент концентрации сахарозы между ксилемой и флоэмой. Мы провели анализ содержания сахарозы в проводящих тканях ствола 6-летних и 40-летних деревьев березы повислой в период активности камбия.

У 40-летней обычной березы повислой градиент сахарозы между проводящими тканями в июне составил 74,5 мг/г сырой ткани (Рисунок 25), при этом активность сахарозосинтазы в ткани была высокой (11,3 мкмоль сахарозы/мг белка·30 мин) (Рисунок 22А). У узорчатой карельской березы градиент дисахарида между ксилемой и флоэмой был 23,1 мг/г сырой ткани (Рисунок 29), т.е. в 3 раза меньше, чем у обычной березы, и активность сахарозосинтазы в ксилеме карельской березы была меньше, чем у обычной березы, также в 3 раза (Рисунок 26). Эти данные указывают на то, что (1) в период формирования ксилемы активность сахарозосинтазы в ткани является одним из основных факторов, создающих ее акцепторную силу, (2) падение активности сахарозосинтазы при формировании узорчатой древесины карельской березы ведет к сильному ослаблению потока сахарозы из флоэмы в ксилему, т.е. оказывает негативное влияние на разгрузку флоэмы.

Разгрузка флоэмы – процесс, исключительно важный для поддержания нормального функционирования всего растительного организма (Курсанов, 1976; Гамалей, 2004). Поэтому ослабление запроса на сахарозу со стороны ксилемы у карельской березы должно компенсироваться другими механизмами поддержания градиента концентрации дисахарида между донорными (мезофилл листа) и акцепторными (ткани ствола) тканями древесного растения. Исследования, проведенные в лаборатории физиологии и цитологии древесных растений Института леса КарНЦ РАН, показали, что у узорчатых деревьев карельской березы ослабление активности

сахарозосинтазы в ксилеме происходит на фоне многократного увеличения активности апопластной инвертазы во флоэме (Галибина и др., 2015). Интенсивное инвертазное расщепление сахарозы в данном случае рассматривается как эффективный механизм утилизации избытка дисахарида во флоэме узорчатых растений. Образующиеся в ходе инвертазной реакции глюкоза и фруктоза активно используются на новообразование клеток флоэмы и синтез в них запасных метаболитов. На первое указывает сильное увеличение толщины коры, на второе – накопление в паренхимных клетках флоэмы узорчатой карельской березы больших количеств крахмала, липидов и танинов (Новицкая, 1997, 1999, 2008, Novitskaya, Kushnir, 2006).

Наши данные также свидетельствуют об активных ростовых процессах со стороны флоэмы у узорчатых деревьев карельской березы. В п. 6 Обсуждения мы показали, что у 40-летних узорчатых деревьев карельской березы ростовые процессы со стороны флоэмы шли намного активнее, чем со стороны ксилемы.

В связи с рассматриваемым кругом вопросов представляют интерес данные, полученные на 6-летних растениях карельской березы. В случае обычной березы повислой 6-летние растения продемонстрировали картину, аналогичную 40-летним деревьям: высокая активность сахарозосинтазы в ксилеме (151,7 мкмоль сахарозы/мг белка·30 мин) (Рисунок 5) соответствовала высокому градиенту концентрации сахарозы между ксилемой и флоэмой (79,9 мг/г сырой ткани) (Рисунок 6).

У 6-летней карельской березы наблюдалось незначительное снижение активности сахарозосинтазы в ксилеме (139,4 мкмоль сахарозы/мг белка·30 мин) (Рисунок 8), которое сопровождалось небольшим ослаблением ростовых процессов в ткани (отношение фру/глю 3,3 и 2,8 в ксилеме обычной березы и карельской березы соответственно) (Рисунки 7, 10). В то же время градиент концентрации сахарозы между проводящими тканями составил всего 2,9 мг/г сырой ткани (Рисунок 9). В этой ситуации обращает на себя внимание 5-кратный рост активности фермента во флоэме карельской березы (3,9 и 20,8 мкмоль сахарозы/мг белка·30 мин у обычной и карельской березы соответственно) (Рисунки 5, 8). Можно предположить, что у молодых деревьев карельской березы мы застали перестройку метаболизма ксилемы и флоэмы, связанную с самым началом сезонного возобновления развития структурных аномалий тканей ствола. Как мы указывали ранее, аномальный рост сопровождается ослаблением прироста ксилемы (снижение отношения фру/глю в ксилеме), уменьшением в ткани

доли волокон и сосудов и увеличением доли паренхимы (снижение активности сахарозосинтазы в ксилеме), активизацией ростовых процессов со стороны флоэмы (рост активности сахарозосинтазы во флоэме). Практическое отсутствие градиента концентрации сахарозы между ксилемой и флоэмой, по нашему мнению, подчеркивает «переходное» состояние тканей ствола.

4.8 Активность сахарозосинтазы и содержание крахмала

Накопление крахмала является одним из наиболее лабильных способов утилизации излишка сахарозы в тканях растения (Курсанов, 1976).

В наших исследованиях, высокая активность сахарозосинтазы в ксилеме деревьев обычной березы повислой в период камбиального роста (Рисунки 5, 11, 16А, 22А) способствует активному расщеплению сахарозы в ксилеме, при этом продукты реакции расходуются на образование клеточных стенок сосудов и волокнистых трахеид, о чем свидетельствует высокое содержание целлюлозы в ксилеме обычной березы повислой (Рисунок 13). Запасание крахмала в ксилеме деревьев березы повислой в период камбиального роста происходит слабо: у 8-летних деревьев обычной березы это значение составило 0,2 мг/г сухой ткани (июнь) и 0,1 мг/г сухой ткани (июль); у 10-летних – 0,3 мг/г сухой ткани (июнь); у 40-летних – 0,06 мг/г сухой ткани (июнь). (Рисунки 12, 17А, 23А).

Обращает на себя внимание, что наибольшие уровни крахмала в исследованных нами образцах были отмечены во флоэме обычной и карельской березы (Рисунки 17Б, 23Б, 27Б). Причем, у обычной березы уровень крахмала во флоэме был выше по сравнению с карельской березой: у 8-летних растений – в 16 раз, у 40-летних – в 5 раз. На примере сахарной свеклы показано, что после повышения содержания сахарозы выше некоего уровня, в клетках вместо крахмала начинается синтез более энергоемких соединений – липидов (Курсанов, 1976). Высокая активность инвертазы во флоэме карельской березы (Галибина и др, 2015) свидетельствует о появлении в ткани большого количества сахарозы. В этой связи можно ожидать, что синтез крахмала здесь будет замещаться синтезом липидов. И действительно, имеющиеся данные свидетельствуют о том, что во флоэме карельской березы, в отличие от флоэмы обычной березы повислой, накапливается большое количество липидных соединений (Novitskaya, Kushnir, 2006; Новицкая, 2008). Таким образом, результаты наших исследований, показавшие меньшее

количество крахмала во флоэме карельской березы, очевидно, отражают переключение обменных процессов на синтез липидных соединений. С другой стороны, наличие большого количества крахмала во флоэме обычной березы повислой свидетельствует о том, что содержание сахарозы в ткани, по-видимому, не достигло критического уровня, и находится в пределах, позволяющих утилизировать излишки дисахарида через крахмалонакопление.

Отдельного внимания заслуживают данные, полученные в период торможения камбиального роста погодными условиями. Данное явление наблюдалось в июле у 40-летних деревьев. Исследования Г.Ф. Антоновой (1999) показывают, что в наиболее теплом месяце вегетационного сезона (в наших условиях – июль) имеется некий максимум среднесуточных температур, выше которого интенсивность деления клеток камбия падает. Ведущий ограничивающий фактор в этот период – количество атмосферных осадков, являющихся основным источником влаги в почве.

Период длительного отсутствия осадков на фоне высоких температур, предшествовавший взятию нами образцов в июле (Рисунок 2), способствовал развитию водного дефицита тканей ствола, результатом чего стало подавление активности камбия. Торможение камбиальной активности у 40-летних деревьев обычной березы повислой коррелировало с резким (в 21 раз) падением активности сахарозосинтазы в ксилеме (Рисунок 22А). Следствием снижения использования сахарозы в ксилеме должно быть торможение ее притока из флоэмы и необходимость утилизации во флоэме большого количества "лишней" сахарозы. Это подтверждается накоплением запасного полисахарида – крахмала, особенно большое его количество показано во флоэме (50,3 мг/г сухой ткани) (Рисунок 23Б). С другой стороны, высокий уровень запасного полисахарида свидетельствует о том, что у обычной березы содержание сахарозы во флоэме не превысило предел, соответствующий утилизации сахарозы через синтез крахмала. Следует также подчеркнуть, что данные по 40-летним деревьям обычной березы в условиях торможения камбиального роста подтверждают наш вывод, сделанный для узорчатых деревьев карельской березы в период деятельности камбия, а именно, что снижение активности сахарозосинтазы в ксилеме коррелирует с ростом содержания сахарозы во флоэме. Во флоэме 40-летних деревьев обычной березы повислой, в отличие от ксилемы, увеличение содержания крахмала в июле (Рисунок 23 Б) сопровождалось увеличением активности СС (Рисунок 22Б). В литературе имеются

многочисленные данные о том, что помимо формирования вторичной клеточной стенки сахарозосинтаза участвует в биосинтезе крахмала (Asano et al., 2002; Koch, Zeng, 2002; Baroja- Fernandez et al., 2003; Kladnik, 2005; Patrick et al., 2013), а так же в реакциях дыхательной цепи (Xu et al., 1989; Sturm, Tang, 1999; Zeng et al., 1999; Bologna et al., 2003). Приоритетным путем образования крахмала в акцепторных тканях двудольных растений являются реакции, катализируемые сахарозосинтазой – образование УДФ-глюкозы при расщеплении сахарозы в присутствии УДФ; УДФГ-пирофосфорилазой – образование глюкозо-1-фосфата из УДФГ; фосфоглюкомутазой – образование глюкозо-6-фосфата и вторичное образование глюкозо-1-фосфата в амилопластах; АДФГ-пирофосфорилазой – образование из глюкозо-1-фосфата АДФ-глюкозы – предшественника синтеза крахмала и крахмал-синтазой (Müller-Röber et al. 1992, Tauberger et al. 2000, Tiessen et al. 2002; Baroja- Fernandez et al., 2003). Несмотря на то, что УДФ является преимущественным субстратом для сахарозосинтазной реакции, многочисленные исследования показали, что АДФ также может вступать в катализируемую сахарозосинтазой реакцию, в результате которой образуется АДФ-глюкоза (Pozueta-Romero et al. 1991, 1999; Naeem et al. 1997, Shannon et al. 1998, Baroja- Fernández et al. 2001, 2003).

У 40-летних узорчатых деревьев карельской березы активность сахарозосинтазы в ксилеме в июле упала в 2,4 раза, при этом ее значения во флоэме значимо возросли, это также сопровождалось накоплением крахмала во флоэме (Рисунок 26, 27). Однако содержание крахмала здесь было существенно ниже, чем во флоэме обычной березы.

Стоит отметить, что у деревьев обычной березы повислой и безузорчатой карельской березы в июле увеличение содержания крахмала в ксилеме происходило на фоне снижения сахарозосинтазной активности (40 лет), а его снижение – на фоне увеличения активности фермента (8 лет). У узорчатых растений карельской березы, напротив, снижение содержания крахмала сопровождалось снижением активности сахарозосинтазы. Таким образом, у безузорчатых растений березы повислой положительная корреляция активности сахарозосинтазы и содержания крахмала наблюдалась только во флоэме, у узорчатой карельской березы – как в ксилеме, так и во флоэме.

Представляет интерес сопоставление активности сахарозосинтазы и содержания целлюлозы и крахмала в образцах ксилемы 10-летних деревьев обычной березы,

безузорчатой карельской березы и узорчатых и безузорчатых участков ствола узорчатых деревьев карельской березы (Рисунок 11, 12). Среди перечисленных вариантов наибольшая активность фермента (167,4 мкмоль сахарозы/мг белка·30 мин) и наибольшие уровни крахмала и целлюлозы (3,1 мг/г сухой ткани, 42%) были характерны для ксилемы безузорчатых участков ствола узорчатых деревьев (Рисунки 12, 13). Накопление крахмала в этих условиях указывает на следующее: несмотря на то, что сахарозосинтаза очень активно вовлекает сахарозу в синтез целлюлозы, в ткани остается избыток дисахарида, который утилизируется через синтез крахмала. Это дает основание заключить, что поддержание нормальной структуры древесины в безузорчатой части ствола карельской березы осуществляется на границе верхнего предела активности сахарозосинтазы. В пользу данного вывода свидетельствует факт, что переход к аномальному ксилогенезу в соседних участках ствола связан с резким падением активности сахарозосинтазы и заменой ее другим ферментом – инвертазой (Галибина и др., 2015).

4.9 Изоформы сахарозосинтазы при нормальном и аномальном ксилогенезе березы повислой

В ксилеме обычной березы повислой и карельской березы мы исследовали уровень экспрессии генов *SUS1*, *SUS2* и *SUS3*, кодирующих три изоформы сахарозосинтазы – SuSy1, SuSy2, SuSy3. Установлено, что по составу экспрессируемых генов различий между формами березы повислой не наблюдается: во всех исследованных образцах ксилемы были обнаружены транскрипты всех трех генов (Рисунок 36). В то же время уровень экспрессии генов существенно различался. Главной отличительной чертой является высокий уровень экспрессии гена *SUS1* в древесине нормального строения (ксилема обычной березы, безузорчатой карельской березы, безузорчатых участков ствола узорчатой карельской березы) и его резкое падение в узорчатой древесине карельской березы. В п.п. 4 и 5 мы показали тесную корреляцию между экспрессией гена *SUS1*, синтезом целлюлозы и дифференцировкой волокон и сосудов ксилемы. В данной связи резкое снижение уровня транскриптов этого гена в узорчатой древесине, для которой характерно уменьшение доли волокон и сосудов и увеличение содержания клеток паренхимы, вполне объяснимо.

Необходимо отметить сравнительно высокий уровень экспрессии генов *SUS2* и *SUS3* в нормальной древесине карельской березы. 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 безузорчатых участках ствола высокий уровень экспрессии был показан как для гена *SUS1*, так и для гена *SUS2*. Следует отметить, что эти данные находятся в соответствии с нашим предположением о том, что в ксилеме безузорчатой части ствола узорчатой карельской березы сахарозосинтаза работает на верхнем пределе своего ресурса по поддержанию нормального строения древесины, т.е. поддержанию дифференцировки ее механических и водопроводящих элементов (см. п. 8).

Ген *SUS3* имеет широкий диапазон транскрипции в органах и тканях древесных растений и рассматривается как ген общего метаболизма, он практически не экспрессируется в формирующихся клетках ксилемы (Geisler-Lee et al., 2006). Повышение экспрессии гена *SUS3* в нормальной древесине карельской березы можно объяснить ее структурными особенностями. Если в древесине обычной березы преобладают лучи шириной в 1-3 клетки, то в нормальной по строению древесине карельской березы ширина лучей обычно составляет 3-4 клетки, т.е. в ней несколько возрастает доля лучевой паренхимы. Клетки лучевой паренхимы выполняют важную функцию транспортировки веществ в зону роста и дифференциации структурных элементов ксилемы, поэтому для них характерна высокая интенсивность метаболизма. Исходя из сказанного, несколько повышенная экспрессия гена *SUS3* в нормальной древесине карельской березы может быть связана с увеличением в ее составе количества паренхимных клеток лучей.

В узорчатой древесине карельской березы мы наблюдали очень низкие уровни экспрессии всех исследованных генов сахарозосинтазного семейства (Рисунки 3б-4). Это хорошо согласуется с данными о резком снижении активности сахарозосинтазы при переходе к формированию ее характерных структурных аномалий.

4.10 Активность сахарозосинтазы на ранних этапах онтогенеза березы повислой

В ходе исследования было показано, что активность сахарозосинтазы в ксилеме безузорчатых растений карельской березы отличается от активности фермента в ксилеме обычной березы повислой (Рисунок 11Б). Мы выдвинули предположение, что нарушения функционирования ферментных систем углеводного обмена у карельской

березы начинаются еще в ходе раннего онтогенеза, до начала формирования аномальной древесины. В связи с этим была изучена активность сахарозосинтазы в акцепторных органах сеянцев обычной березы повислой и карельской березы, еще не имеющих видимых отклонений в структуре древесины.

На 1,5-месячных растениях березы повислой показано, что основным потребляющим органом в данном возрасте является корень, о чем свидетельствует преобладание активности сахарозосинтазы в корне, по сравнению со стеблем, как у растений обычной березы повислой, так и у карельской березы. В молодых растущих тканях интенсивно протекает биосинтез целлюлозы и основного предшественника гемицеллюлоз и пектинов – УДФ-глюкуроновой кислоты. Субстратом этих процессов является УДФ-глюкоза, наработка, которой обеспечивается за счет деятельности сахарозосинтазы (Никитин, Измайлов, 2016).

У 1,5-месячных сеянцев карельской березы, по сравнению с растениями обычной березы, активность сахарозосинтазы выше, как в корне, так и в стебле, что может свидетельствовать о более интенсивном протекании у нее на ранних этапах развития процессов структурообразования (на взрослых растениях березы было показано, что наибольшая активность сахарозосинтазы на фоне интенсивного протекания ксилогенеза наблюдается в ксилеме безузорчатых участков ствола узорчатых растений карельской березы (Рисунок 11Б-3)).

В ходе исследования показано, что различия в активности сахарозосинтазы сеянцев обычной березы повислой и карельской березы, также как и у взрослых растений, обусловлены разным уровнем экспрессии генов *SUS1*, *SUS2* (Рисунок 39). Более высокая активность сахарозосинтазы в стебле сеянцев карельской березы обусловлена изоформой SuSy1, о чем говорит высокий уровень экспрессии кодирующего ее гена *SUS1* (Рисунок 39-2).

У 5-месячных растений, по сравнению с 1,5-месячными, основным акцептором ассимилятов становится стебель (Рисунок 33). Атрагирующая способность ксилемы стебля возрастает по мере роста и развития древесных растений, при этом клеточные стенки ксилемы становятся основными аккумуляторами биомассы (Антонова, 2011). Преимущественное развитие стебля или корня (двух конкурирующих акцепторных органов) регулируется в растении сигнальными процессами, опосредованными растительными гормонами (ауксины, цитокинины). В недавнее время появились работы,

указывающие также на участие сахаров в реакциях быстрого ответа, необходимых для поддержания координации развития корня и стебля в условиях действия эндогенных и экзогенных факторов (Wang, Ruan, 2016). У 5-месячных растений обычной березы повислой в акцепторных органах было показано преобладание активности сахарозосинтазы, по сравнению с карельской березой. Таким образом, растений разных форм березы повислой в возрасте 5-ти месяцев имели различия в распределении активности сахарозосинтазы, характерные для взрослых деревьев березы.

Таким образом, уже на ранних этапах развития между двумя формами березы повислой закладываются различия в путях метаболизации дисахарида.

4.11 Особенности активности сахарозосинтазы на фоне дефицита азота

Наряду с эндогенными механизмами, определяющими преимущественное использование ассимилятов в растении, баланс между развитием различных акцепторных органов определяется внешними факторами среды, плодородием почвы. Выращивание растений двух форм березы повислой на субстрате с низким содержанием доступного азота привело к сокращению темпов роста надземной биомассы, при этом они имели тонкие, но длинные корни (Рисунок 34).

У сеянцев обычной березы, выращенных при дефиците минеральных элементов, наблюдалось резкое снижение ферментативной активности сахарозосинтазы (Рисунок 35). Особенно сильно снизилась активность сахарозосинтазы в стебле (в 20 раз) (в корне активность фермента снизилась в 4 раза) Больше падение сахарозосинтазной активности в стебле, по сравнению с корнем, привело и к большей потере надземной биомассы. На горохе посевном показано, что даже низкие (1 мМ) концентрации нитратов могут увеличивать активность сахарозосинтазы и приводить к накоплению вегетативной биомассы растений (Никитин, Измайлов, 2016). Таким образом, при недостатке азотного питания у сеянцев березы повислой происходит подавление ксилогенеза, и все ресурсы тратятся на поддержание биомассы корней.

У растений карельской березы при недостаточном азотном питании активность сахарозосинтазы в стебле снижается всего в 2 раза. Более высокая активность сахарозосинтазы в стебле карельской березы, по сравнению с обычной березой повислой, на фоне снижения морфометрических показателей говорит о том, что у растений карельской березы в условиях недостатка азота снижение метаболизации

сахарозы в акцепторных тканях обусловлено подавлением активности других сахарозорасщепляющих ферментов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное исследование показало, что наибольшая активность сахарозосинтазы в тканях ствола березы повислой наблюдается в период камбиального роста и связана с формированием проводящих тканей – ксилемы и флоэмы. В период деятельности камбия активность сахарозосинтазы в ксилеме значительно превышала данный показатель во флоэме. Известно, что в ходе ксилогенеза сахарозосинтаза играет существенную роль в отложении вторичной клеточной стенки, поставляя субстрат для синтеза ее структурных элементов. Полученные нами данные свидетельствуют о том, что формирование нормальной по строению древесины обычной березы повислой, в составе которой преобладают проводящие элементы ксилемы – сосуды и волокна происходит на фоне высокой активности сахарозосинтазы под контролем гена *SUS1* и сопровождается активным синтезом структурных элементов клеточных стенок.

Установлено, что у растений карельской березы дифференциация производных камбия в паренхимные клетки, являющиеся основными анатомическими элементами структурных аномалий древесины карельской березы, происходит на фоне низкой активности сахарозосинтазы в связи со снижением экспрессии генов *SUS1* и *SUS2* и сопровождается уменьшением содержания целлюлозы на единицу массы ксилемы. В этом случае высокая акцепторная сила ксилемы поддерживается за счет синтеза запасных метаболитов, в частности крахмала.

Снижение по сравнению с обычной березой повислой значений активности сахарозосинтазы, экспрессии гена *SUS1* и содержания целлюлозы у безузорчатых растений карельской березы говорит о том, что уменьшение утилизации углерода через синтез компонентов клеточных стенок ксилемы у карельской березы происходит еще до начала формирования аномальной по строению древесины. В нашей работе впервые были показаны различия в активности сахарозосинтазы у растений обычной березы повислой и карельской березы на ранних этапах онтогенеза: более низкая активность сахарозосинтазы у 5-месячных сеянцев карельской березы обусловлена снижением уровня экспрессии генов *SUS1* и *SUS2*.

Существенной особенностью безузорчатой древесины карельской березы является значимое увеличение уровня экспрессии гена *SUS3*, который, согласно литературным данным практически не экспрессируется в формирующихся клетках

ксилемы древесных растений, а является геном общего метаболизма (Geisler-Lee et al., 2006).

Таким образом, в ходе проведенной работы установлена важная роль сахарозосинтазы в ксилогенезе древесных растений и выявлена обратная корреляция активности изучаемого фермента и уровня транскрипции некоторых генов сахарозосинтазного ряда (*SUS1*, *SUS2*) с проявлением признаков аномального ксилогенеза карельской березы.

Полученные в ходе проведения работы данные могут быть использованы в поиске путей управления ксилогенезом древесных растений и получения высокодекоративной древесины карельской березы.

ВЫВОДЫ

1. Активность сахарозосинтазы в тканях ствола *Betula pendula* Roth изменяется в течение вегетационного периода и имеет возрастную динамику. Наиболее высокие значения активности сахарозосинтазы наблюдаются в ксилеме в период активного камбиального роста.
2. Активность сахарозосинтазы при формировании нормальной (типичной для вида) древесины *B. pendula* в 3-5 раз выше, чем при формировании аномальной узорчатой древесины. Падение активности фермента в зонах формирования узорчатой древесины обусловлено снижением экспрессии генов сахарозосинтазного семейства.
3. Основной функцией сахарозосинтазы в ходе ксилогенеза *B. pendula* является ее участие в синтезе целлюлозы. Об этом свидетельствует корреляция между активностью фермента, уровнями экспрессии генов *SUS1*, *SUS2* и содержанием целлюлозы при разных сценариях ксилогенеза.
4. Основную роль в поддержании высокой активности сахарозосинтазы у *B. pendula* var. *pendula* играет высокая экспрессия гена *SUS1*. У *B. pendula* var. *carelica* заметное участие в этом принимают также гены *SUS2* и *SUS3*.
5. Различия в активности сахарозосинтазы у *B. pendula* var. *pendula* и *B. pendula* var. *carelica* начинают проявляться на ранних стадиях онтогенеза.
6. Низкий уровень доступного азота приводит к снижению активности сахарозосинтазы в акцепторных органах сенцев *B. pendula*.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Антонова Г.Ф. Рост клеток хвойных. Новосибирск: Наука, 1999. 232 с.
2. Антонова Г.Ф. Формирование ксилемы хвойных // Структурные и функциональные отклонения от нормального роста и развития растений под воздействием факторов среды. Материалы международной конференции. Петрозаводск. 2011. С. 6–11.
3. Атрохин В.Г., Калущюш К.К., Тюриков Ф.Т. Древесные породы СССР. Древесные породы мира-е изд. Т. III. Москва: Лесн. пром-ть, 1982. 264 с.
4. Ашмарин И.П. Молекулярная биология. Л.: Издательство ЛГУ, 1977. 220 с.
5. Барильская Л.А. Структурный анализ узорчатой древесины карельской березы // Ботанический журнал. 1978а. Т. 63. С. 805–811.
6. Барильская Л.А. Сравнительный структурный анализ древесины березы повислой и карельской березы // дисс. на соискание уч.ст. к.б.н. Петрозаводск, 1978б. 157 с.
7. Галибина Н.А., Новицкая Л.Л., Софронова И.Н. Динамика сахаров в тканях ствола *Betula pendula* (*Betulaceae*) при выходе из зимнего покоя // Растительные ресурсы. Т. 48. № 4. 2012. С. 554-564
8. Галибина Н.А., Новицкая Л.Л., Красавина М.С., Мощенская Ю.Л. Активность инвертазы в тканях ствола карельской березы // Физиология растений. 2015. Т. 62. С. 804–813.
9. Гилберт С. Биология развития. Т. 2. Москва: Мир, 1994. 235 с.
10. Гамалей Ю.В. Транспортная система сосудистых растений. С-Пб.: Изд-во Санкт-Петербургского государственного университета, 2004. 422 с.
11. Ермаков В.И. Механизмы адаптации березы к условиям севера. Л.: Наука, 1986. 144 с.
12. Касесалу А. Об анатомическом строении березовой древесины // Лесоводственные исследования. 1968. Т. 7. С. 187–198.
13. Кедров Г.Б. О значении неярусного расположения камбиальных клеток у растений с трахеидальной вторичной древесиной // Международный ботанический конгресс. Тезисы докладов. Ленинград. 1975. Р. 252.

14. Кедров Г.Б. Строение и формирование водопроводящей системы ясеня обыкновенного (*Fraxinus excelsior*) и некоторые вопросы структурной эволюции древесины древесных двудольных, Автореф. канд. дис. 1965. 17 с.
15. Козьмин А.В. Об анатомии каповой древесины березы // Доклад ВАСХНИЛ. 1969. № 10. С. 20–23.
16. Колесниченко В.М. Динамика содержания и превращения ассимилятов у древесных растений. Автореф. дис. ...канд.биол. наук. Воронеж. 1985. 22 с.
17. Коровин В.В., Новицкая Л.Л., Курносоев Г.А. Структурные аномалии стебля древесных растений. М.: МГУЛ, 2003. 280 с.
18. Крамер П.Д., Козловский Т.Т. Физиология древесных растений. Москва: Лесная промышленность, 1983. 462 с.
19. Кретович В.Л. Биохимия растений. Москва: Высшая школа, 1986. 254 с.
20. Курсанов А.Л., Прасолова М.Ф., Павлинова О.А. Пути ферментативного расщепления сахарозы в корне сахарной свеклы в связи с аттрагирующей функцией // Физиология растений. 1989. Т. 36. С. 629–641.
21. Курсанов А.Л. Транспорт ассимилятов в растениях. Москва: Наука, 1976. 647 с.
22. Любавская А.Я. Карельская береза. Москва: Лесная промышленность, 1978. 158 с.
23. Медведев С.С. Физиология растений. С-Пб.: Издательство С.-Петербургского Университета, 2004. 337 с.
24. Никитин А. В., Измайлов С. Ф. Ферменты диссимилиации сахарозы как мишени действия нитрата в раннем онтогенезе гороха посевного // Физиология растений. 2016. Т. 63. С. 159–164.
25. Никишов В. Д. Комплексное использование древесины. Москва: Лесная промышленность, 1985. 264 с.
26. Николаева Н.Н., Новицкая Л.Л. Структурные особенности ассимиляционного аппарата и формирование аномальной древесины карельской березы // Лесоведение. 2007. № 1. С. 70–73.
27. 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. Т. 11. С. 35–47.

28. Новицкая Л.Л., Галибина Н.А. Транспортная и запасная формы сахаров у березы повислой (*Betula pendula* Roth.) // Структурные и функциональные отклонения от нормального роста и развития растений под воздействием факторов среды: Материалы международной конференции. Петрозаводск. 2011. С. 84–89.

29. Новицкая Л.Л. Карельская береза: механизмы роста и развития структурных аномалий. Петрозаводск: Verso, 2008. 144 с.

30. Новицкая Л.Л. О возможной причине формирования структурных аномалий ствола карельской березы // Бот. журнал. 1997. № 82. С. 61–66.

31. Новицкая Л.Л. О механизмах формирования аномальной древесины карельской березы // Лесоведение. 1999. № 4. С. 77–80.

32. Оболенская А.В., Ельницкая Э.П., Леонович А.А. Лабораторные работы по химии древесины и целлюлозы. М.: Экология, 1991. 320 с.

33. Плешков Б.П. Колориметрический метод определения крахмала в листьях. Практикум по биохимии растений. М.: Колос, 1985. 129–131 с.

34. Ребриков Д.В., Саматов Г.А., Трофимов Д.Ю. и др. ПЦР «в реальном времени». М.: БИНОМ.Лаборатория знаний., 2011. 223 с.

35. Софронова Г.И. Углеводный обмен // В кн.: Физиолого-биохимические основы роста и адаптации сосны на севере. Л. 1985. С. 30–57.

36. Стручкова И.В., Брилкина А.А., Веселов А.П. Регуляция биосинтеза белка. Учебно-методическое пособие. Нижний Новгород: Нижегородский госуниверситет, 2010. 100 с.

37. Технеряднов А.В., Данченко А.М. Изменчивость длины волокон в связи с формовым разнообразием березы бородавчатой и пушистой в Северном Казахстане // В кн.: Лесная селекция, семеноводство и интродукция в Казахстане. Алма-Ата. 1969. С. 33–35.

38. Титок В. В., Леонтьев В. Н., Федоренко И. В., Кубрак С. В., Юренкова С. И., Грушецкая З. Е. Биосинтез целлюлозы: современный взгляд и концепции // Труды Белорусского государственного университета. 2007. Т. 2. С. 54–56.

39. Цельникер Ю.Л., Малкина И.С. Баланс органического вещества в онтогенезе листа у лиственных деревьев // Физиология растений. 1986. Т. 33. С. 935–943.
40. Эверт Р.Ф. Анатомия растений Эзау. Меристемы, клетки и ткани растений : строение, функции и развитие. Москва: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2015. 600 с.
41. Akashi T., Kawasaki S., Shibaoka H.. Stabilization of cortical microtubules by the cell wall in cultured tobacco cells. Effects of extensin on the cold-stability of cortical microtubules. // *Planta*. 1990. Vol. 182. pp. 363–369.
42. Amor Y., Haigler C.H., Johnson S., Wainscott M., Delmer D.P. A membrane-associated form of sucrose synthase and its potential role in synthesis of cellulose and callose in plants // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1995. Vol. 92. pp. 53–57.
43. 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.
44. Andersson M. Subcellular localization of a neutral invertase from hybrid aspen (*Populus tremula* x *tremuloides*). Department of Forest Genetics and Plant Physiology. Master's thesis. Ume, 2014. 49 pp.
45. 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*, Vol. 45, 2006. pp. 144–165.
46. Asano T., Kunieda N., Omura Yu., Ibe H., Kawasaki T., Takano M., Sato M., Furuhashi H., Mujin T., Takaiwa F., Wu Ch., Tada Yu., Satozawa T., Sakamoto M., Shimada H. Rice SPK, a calmodulin-like domain protein kinase, is required for storage product accumulation during seed development: Phosphorylation of sucrose synthase is a possible factor // *Plant Cell*, Vol. 14(3), 2002. pp. 619–628.
47. Baroja-Fernández E., Muñoz F.J., Akazawa T., Pozueta-Romero J. Reappraisal of the currently prevailing model of starch biosynthesis in photosynthetic tissues: a proposal involving the cytosolic production of ADP-glucose by sucrose synthase and occurrence of cyclic turnover of starch in the chloroplast // *Plant Cell Physiology*. 2001. Vol. 42. pp. 1311–

1320.

48. Baroja-Fernández E., Muñoz F. J., Saikusa T., Rodríguez-López M., Akazawa T., Pozueta-Romero J. Sucrose synthase catalyzes the de novo production of ADPglucose linked to starch biosynthesis in heterotrophic tissues of plants // *Plant Cell Physiol.* 2003. Vol. 44. pp. 500–509.
49. Baroja-Fernández E., Muñoz 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 // *PNAS.* 2012. Vol. 109. pp. 321–326.
50. 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*, Vol. 106, 2009. pp. 13124–13129.
51. Basset C.L. Regulation of gene expression in plants. The role of transcript structure and processing. United States Department of Agriculture Kearneysville. Springer, 2007. 195 pp.
52. Baud S., Vaultier M.-N., Rochat C. Structure and expression profile of the sucrose synthase // *Journal of Experimental Botany.* 2004. Vol. 55. pp. 397–409.
53. Baum S. Abbau-und Ausbreitungsstrategien holzzersetzender und endophytischer Pilze in Buche und anderen Laubbäumen. Dr rer. nat. thesis University of Freiburg, Germany, 2001.
54. 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 // *The Plant Journal.* 2007. Vol. 49. pp. 810–828.
55. Blackman L.M., Overall R.L. Structure and function of plasmodesmata // *Australian Journal of Plant Physiology*, Vol. 28(7), 2001. pp. 711–727.
56. Bologa K.L., Fernie A.R., Lisse A., Loureiro M.E., Geigenberger P.A. Bypass of sucrose synthase leads to low internal oxygen and impaired metabolic performance in growing potato tubers // *Plant Physiol.* 2003. Vol. 132. pp. 2058–2072.
57. Boudet A.M., Lapierre C., Grima-Pettenat J. Biochemistry and molecular biology of lignification // *New Phytol.* 1995. Vol. 129. pp. 203–236.

58. Bowen I.D. Apoptosis or programmed cell death? // *Cell biology international*. 1993. Vol. 17. pp. 365–380.
59. 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. pp. 248–254.
60. Brill E., Thournout M., White R.G., Llewellyn D., Campbell P.M., Engelen S., Ruan Y.L., Arioli T., Furbank R.T. A novel isoform of sucrose synthase is targeted to the cell wall during secondary cell wall synthesis in cotton fiber // *Plant Physiology*. 2011. Vol. 157. pp. 40–54.
61. Brown R.M.Jr., Saxena I.M. Cellulose biosynthesis: A model for understanding the assembly of biopolymers // *Plant Physiol. Biochem.* 2000. Vol. 38. pp. 57–67.
62. Cassab G.I. Plant cell wall proteins // *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*. 1998. Vol. 49. pp. 281–309.
63. Catesson A.M. Cambial ultrastructure and biochemistry: changes in relation to vascular tissue differentiation and the seasonal cycle // *International Journal of Plant Sciences*. 1994. Vol. 155. pp. 251–261.
64. Cheng W.H., Taliercio E.W., Chourey P.S. The Miniature seed locus of maize encodes a cell wall invertase required for normal development of endosperm and maternal cells in the pedice // *The Plant Cell*. 1996. Vol. 8. pp. 971–983.
65. Chourey P.S., Taliercio E.W., Carlson S.J., Ruan Y.L. Genetic evidence that the two isozymes of sucrose synthase present in developing maize endosperm are critical, one for cell wall integrity and the other for starch biosynthesis // *Mol Gen Genet*. 1998. Vol. 259. pp. 88–96.
66. Cobb B.G., Hannah L.C. Shrunken-1 encoded sucrose synthase is not required for sucrose synthesis in the maize endosperm // *Plant physiology*. 1988. Vol. 88. pp. 1219–1221.
67. Coleman H.D., Beamish L., Reid A., Park J.Y., Mansfield S.D. Altered sucrose metabolism impacts plant biomass production and flower development // *Transgenic Res*. 2010. Vol. 19. pp. 269–283.
68. Coleman H.D., Samuels A. L., Guy R.D., Mansfield S.D. Perturbed lignification impacts tree growth in hybrid poplar- a function of sink strength, vascular integrity, and

photosynthetic assimilation // *Plant Physiology*. 2008. Vol. 148. pp. 1229–1237.

69. Coleman H.D., Yan J., Mansfield S.D. Sucrose synthase affects carbon partitioning to increase cellulose production and altered cell wall ultrastructure // *PNAS*. 2009. Vol. 106. pp. 13118–13123.

70. Coleman H.D. Up-regulation of sucrose synthase and UDP-glucose pyrophosphorylase impacts plant growth and metabolism // *Plant Biotechnology Journal*. 2006. Vol. 4. pp. 87–101.

71. Courtois-Moreau C.L., Pesquet E., Sjödin A., Muñoz L., Bollhoner B., Kaneda M. et al. A unique program for cell death in xylem fibers of *Populus* stem // *Plant Journal*. 2009. Vol. 58. pp. 260–274.

72. Delmer D.P., Albersheim P. The biosynthesis of sucrose and nucleoside diphosphate glucoses in *Phaseolus aureus* // *Plant physiology*. 1970. Vol. 45. pp. 782–786.

73. Delmer D.P., Amor Y. Cellulose biosynthesis // *The Plant Cell*. 1995. Vol. 7. pp. 987–1000.

74. Dinwoodie J.M. Timber—a review of the structure-mechanical property relationship // *Journal of microscopy*. 1975. Vol. 104. pp. 3–32.

75. Du J., Groover A. Transcriptional regulation of secondary growth and wood formation // *Journal of Integrative Plant Biology*. 2010. Vol. 52. pp. 17–27.

76. Durme M.V., Nowack M.K. Mechanisms of developmentally controlled cell death in plants // *Current opinion in plant biology*. 2016. Vol. 29. pp. 29–37.

77. Echt C.S., Chourey P. S. A Comparison of two sucrose synthetase isozymes from // *Plant Physiol*. 1985. Vol. 79. pp. 530–536.

78. Escamez S., Tuominen H. Programmes of cell death and autolysis in tracheary elements: when a suicidal cell arranges its own corpse removal // *Journal of Experimental Botany*. 2014. Vol. 65. pp. 1313–1321.

79. Fahn A. *Plant anatomy*. Oxford: Pergamon Press, 1982. P. 544.

80. Fennoy S.L., Nong T., Bailey-Serres J.E. Transcriptional and post-transcriptional processes regulate gene expression in oxygen-deprived roots of maize // *The Plant Journal*. 1998. Vol. 15. pp. 727–735.

81. Fergus B.J., Goring D.A.I. The location of guaiacyl and syringyl lignins in birch

xylem tissue // International journal of the biology, chemistry, physics and technology of wood. 1970. Vol. 24. pp. 113–117.

82. Frey-Wyssling A. The plant cell wall. Vol 3. Berlin-Stuttgart: Gebriider Borntriger, 1976. 294 pp.

83. Fukao T., Kennedy R.A., Yamasue Y., Rumpho M.E. Genetic and biochemical analysis of anaerobically induced enzymes during seed germination of *Echinochloa crus-galli* varieties tolerant and intolerant of anoxia // J. Exp. Bot. 2003. Vol. 54. pp. 1421–1429.

84. Fukuda H., Watanabe Y., Kuriyama H., Aoyagi S., Sugiyama M., Yamamoto R., Demura T., Minami A. Programming of cell death during xylogenesis. // Journal of Plant Research. 1998. Vol. 111. pp. 253–256.

85. Fukuda H. Xylogenesis: initiation, progression, and cell death // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 1996. Vol. 47. pp. 299–325.

86. Geisler-Lee J., M.Geisler, Coutinho P.M., Segerman B., Nishikubo N. Poplar carbohydrate-active enzymes. Gene identification and expression analyses // Plant Physiology. 2006. Vol. 140. pp. 946–962.

87. 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 Phytologist. 2014. Vol. 203. pp. 1220–1230.

88. 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. pp. 656–665.

89. Gourlay I.D. The Definition of Seasonal Growth Zones in Some African Acacia Species // IAWA Journal. 1995. Vol. 16. pp. 353–359.

90. Gritsch C.S., Murphy R.J. Ultrastructure of fibre and parenchyma cell walls during early stages of culm development in *Dendrocalamus asper* // Annals of Botany Volume. 2005. Vol. 95. pp. 619–629.

91. Groover A., Jones A.M. Tracheary element differentiation uses a novel mechanism coordinating programmed cell death and secondary cell wall synthesis // Plant Physiology. 1999. Vol. 119. pp. 2375–2384.

92. Gunning B.E.S., Hardham A.R. Microtubules // *Ann. Rev. Plant Physiol.* 1982. Vol. 33. pp. 651–698.
93. Hagqvist R. M.A. *Visakoivun kasvatus ja käyttö*. Hämeenlinna: Paino Karisto Oy, 2008. 168 pp.
94. Haigler C.H., Ivanova-Datcheva M., Hogan P.S., Salnikov V.V., Hwang S., Martin K., Delmer D.P. Carbon partitioning to cellulose synthesis // *Plant Molecular Biology*. 2001. Vol. 47. pp. 29–51.
95. 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 Physiology*. 2004. Vol. 134. pp. 1427–1438.
96. 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. pp. 266–274.
97. Heräjärvi H. Static bending properties of Finnish birch wood // *Wood Science and Technology*. 2004. Vol. 37. pp. 523–530.
98. Herbers K., Sonnewald U. Molecular determinants of sink strength // *Current opinion in plant biology*. 1998. Vol. 1. pp. 207–216.
99. Hertzberg M., Aspeborg H., Schrader J., Andersson A., Erlandsson R., Blomqvist K., Bhalerao R., Uhlén M., Teeri T.T., Lundeberg J., Sundberg B., Nilsson P., Sandberg G. A transcriptional roadmap to wood formation // *PNAS*. 2001. Vol. 98. pp. 14732–14737.
100. Hobson N., Roach M.J., Deyholos M.K. Gene expression in tension wood and bast fibres // *Russian Journal of Plant Physiology*. 2010. Vol. 57. pp. 321–327.
101. Hosokawa M., Suzuki S., Umezawa T., Sato Y. Progress of lignification mediated by intercellular transportation of monolignols during tracheary element differentiation of isolated *Zinnia* mesophyll cells // *Plant and Cell Physiology*. 2001. Vol. 42. pp. 959–968.
102. Ilvessalo-Pfäffli M.S. *Fiber atlas: identification of papermaking fibers*. Heidelberg: Springer, 1995. 381 pp.

103. Iraqi D., Le V.Q., Lamhamedi M.S., Tremblay F.M. Sucrose utilization during somatic embryo development in black spruce: involvement of apoplastic invertase in the tissue and of extracellular invertase in the medium // *J. Plant Physiol.* 2005. Vol. 162. P. 11.
104. Jacob F., Monod J. Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins // *J. Mol. Biol.* 1961. Vol. 3. pp. 318–356.
105. 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. Vol. 228. pp. 51–59.
106. Kerr J.F.R., Harmon B.V. Definition and incidence of apoptosis: An historical perspective // In: *Apoptosis: The Molecular Basis of Cell Death. Current Communications Cell Molecular Biology* / Ed. by Tomei L.D. C.F.O. NY: Cold Spring Harbor, 1991. P. 5.
107. Kerr J.F.R., Wyllie A.H., Currie A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics // *British journal of cancer.* 1972. Vol. 26. pp. 239–257.
108. Kladnik A., Chamusco K., Chourey P.S., Dermastia M.. In situ detection of programmed cell death in the maize caryopsis // *Periodicum Biologorum.* 2005. Vol. 107. pp. 11–16.
109. Koch G., Schmitt U. Topochemical and electron microscopic analyses on the lignification of individual cell wall layers during wood formation and secondary changes // In: *Cellular Aspects of Wood Formation* / Ed. by J F. Heidelberg: Springer, 2013. pp. 41–69.
110. Koch K. E. Carbohydrate-modulated gene expression in plants // *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 1996. Vol. 47. pp. 509–540.
111. Koch K.E. Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development // *Current Opinion in Plant Biology.* 2004. Vol. 7. pp. 235–246.
112. Koch K.E., Zeng Y. Molecular approaches to altered C partitioning: genes for sucrose metabolism // *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 2002. Vol. 127. pp. 474–483.
113. Koonjul P.K., Minhas J.S., Nunes C., Sheoran I.S., Saini H.S. Selective transcriptional down-regulation of anther invertase precedes the failure of pollen development in water-stressed wheat // *J. Exp. Bot.* 2005. Vol. 56. pp. 179–190.

114. Kosonen M. Visakoivu – Curly birch. Metsälehti Kustannus, 2004. 208 pp.
115. Kozłowski T.T., Pallardy S.G. Growth control in woody plants. California: Academic Press, Inc., 1997. 643 pp.
116. Kudlicka K., Brown R.M. Cellulose and callose biosynthesis in higher plants (I. Solubilization and separation of (1-> 3)-and (1-> 4)-[beta]-glucan synthase activities from mung bean) // *Plant Physiology*. 1997. Vol. 115. pp. 2643–2656.
117. Lachaud S., Catessonb A., Bonnemain J.. Structure and functions of the vascular cambium // *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Series III - Sciences de la Vie*. 1999. Vol. 322. pp. 633–650.
118. Lai V., Srivastava L.M. Nuclear changes during differentiation of xylem vessel elements // *Cytobiologie*. 1976. Vol. 12. pp. 220–243.
119. Larson P.R. The concept of cambium // *New perspectives in wood Anatomy*. 1982. Vol. 1. pp. 85–121.
120. Larson P.R. *The Vascular Cambium*. Berlin: Springer, 1994. 725 pp.
121. Lee R.H., Chen S.C.G. Programmed cell death during rice leaf senescence is nonapoptotic // *New Phytologist*. 2002. Vol. 155. pp. 25–32.
122. Luostarinen K., Verkasalo E. Birch as sawn timber and in mechanical further processing in Finland: a literature study. Vammala: Vammalan Kirjapaino Oy, 2000. 40 pp.
123. MacAdam J.W., Nelson C.J. Secondary cell wall deposition causes radial growth of fibre cells in the maturation zone of elongating tall fescue leaf blades // *Annals of Botany Volume*. 2002. Vol. 89. pp. 89–96.
124. Magel E., Kruse S., L ü tje G., Liese W. Soluble carbohydrates and acid invertases involved in the rapid growth of developing culms in *Sasa palmata* (Bean) Camus // *Bamboo Sci. Cult. J. Am. Bamboo Soc.* 2006. Vol. 19. pp. 23–29.
125. Matic S., Åkerlund H.-E., Everitt E., Widell S. Sucrose synthase isoforms in cultured tobacco cells // *Plant Physiology and Biochemistry*. 2004. Vol. 42. pp. 299–306.
126. Mattos P.P., Seitz R.A., Muniz B. Identification of annual growth rings based on periodical shoot growth. Vol 1. // In: *Tree ring analysis*. / Ed. by Wimmer R. V.R.E. Wallingford: CAB Publ., 1999. pp. 139–145.
127. McCann M.C., Bush M., Milioni D., Sado P., Stacey N.J., Catchpolea G.,

Defernez M., Carpita N.C., Hofted H., Ulvskov P., Wilson R.H., Roberts K. Approaches to understanding the functional architecture of the plant cell wall // *Phytochemistry*. 2001. Vol. 57. pp. 811–821.

128. Mellerowicz E.J., Baucher M., Sundberg B., Boerjan W. Unravelling cell wall formation in the woody dicot stem // In: *Plant Cell Walls* / Ed. by Carpita N.C. C.M.T.M. Dordrecht: Springer Science+Business Media Dordrecht, 2001. pp. 239–274.

129. Mellerowicz E.J., Sundberg B. Wood cell walls: biosynthesis, developmental dynamics // *Current opinion in plant biology*. 2008. Vol. 11. pp. 293–300.

130. Mijnsbrugge K.V., Meyermans H., van Montagu M., Bauw G., Boerjan W. Wood formation in poplar: identification, characterization, and seasonal variation of xylem proteins // *Planta*. 2000. Vol. 210. pp. 589–598.

131. Mittler R., Feng X., Cohen M. Post-transcriptional suppression of cytosolic ascorbate peroxidase expression during pathogen-induced programmed cell death in tobacco // *The Plant Cell*. 1998. Vol. 10. pp. 461–473.

132. Müller-Röber B., Sonnewald U., Willmitzer L. Inhibition of the ADP-glucose pyrophosphorylase in transgenic potatoes leads to sugar-storing tubers and influences tuber formation and expression of tuber storage protein genes // *EMBO Journal*. 1992. Vol. 11. pp. 1229–1238.

133. Myburg A.A., Sederoff R.R. Xylem structure and function // *Encyclopedia of life science*. 2001. pp. 1–9.

134. N'tchobo H., Dali N., Nguyen-Quoc B., Foyer C.H., Yelle S. Starch synthesis in tomato remains constant throughout fruit development and is dependent on sucrose supply and sucrose synthase activity // *Journal of Experimental Botany*. 1999. Vol. 50. pp. 1457–1463.

135. Naeem M., Tetlow I.J., Emes M.J. Starch synthesis in amyloplasts from developing potato tubers // *Plant Journal*. 1997. Vol. 11. pp. 1095–1103.

136. Nakai T., Tonouchi N., Konishi T., Kojima Y., Tsuchida T., Yoshinaga F., Sakai F., Hayashi T. Enhancement of cellulose production by expression of sucrose synthase in *Acetobacter xylinum* // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1999. Vol. 96. pp. 14–18.

137. Neutelings G. Lignin variability in plant cell walls: contribution of new models // *Plant science*. 2011. Vol. 181. pp. 379–386.

138. 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. pp. 368–387.
139. Northcote D.H. Chemistry of the plant cell wall // *Annu. Rev. Plant Physiol.* 1972. Vol. 23. pp. 113–132.
140. 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. pp. 18–29.
141. Novitskaya L.L., Nikolaeva N.N., Galibina N.A., Tarelkina T.V., Semenova L.I. The greatest density of parenchyma inclusions in Karelian birch wood occurs at confluences of phloem flows // *Silva Fennica*. 2016. Vol. 50. pp. 1461–1478.
142. O'Brein T.P. The primary xylem // In: *Xylem cell development* / Ed. by Barnett J.R. Tunbridge Wells, Kent: Castle House, 1981. pp. 14–16.
143. Ohtani J., Saitoh Y., Wu J., Fukuzawa K., Xiao S.Q. Perforation plates in *Knema furfuracea* (Myristicaceae). // *IAWA bull. n.s.* 1992. Vol. 13. pp. 301–306.
144. Patrick J.W, Offler C.E. Compartmentation of transport and transfer events in developing seeds // *J. Exp. Bot.* 2001. Vol. 52. pp. 551–564.
145. Patrick J.W., Botha F.C., Birch R.G. Metabolic engineering of sugars and simple sugar derivatives in plants // *Plant biotechnology journal*. 2013. Vol. 11. pp. 142–156.
146. 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.*, Vol. 26, 2004. pp. 509–515.
147. Philipson W. R., Ward J. M., Butterfield B. G. *The Vascular cambium: its development and activity*. London: Chapman and Hall, 1971. 182 pp.
148. Pickett-Heaps J.D. Xylem wall deposition // *Protoplasma*. 1968. Vol. 65. pp. 181–205.
149. Plomion C., Leprovost G., Stokes A. Wood Formation in Trees // *Plant Physiology* December. 2001. Vol. 127. pp. 1513–1523.
150. Pozueta-Romero J., Frehner M., Viale A., Akazawa T. Direct transport of ADPglucose by an adenylate translocator is linked to starch biosynthesis in amyloplasts //

Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1991. Vol. 88. pp. 5769–5773.

151. Pozueta-Romero J., Perata P., Akazawa T. Sucrose-starch conversion in heterotrophic tissues of plants // *Crit. Rev. Plant Sci.* 1999. Vol. 18. pp. 489–525.

152. Price A., Macdonald E. Growing birch in Scotland for higher quality timber, Timber Development Programme 2012. 1-26 pp.

153. Prislán P., Gričarb J., Luise M., Smithd K.T., Čufa K. Phenological variation in xylem and phloem formation in *Fagus sylvatica* from two contrasting sites // *Agricultural and Forest Meteorology.* 2013. Vol. 180. pp. 142–151.

154. Pucher G.W., Leavenworth C.S., Vickery H.B. Determination of starch in plant tissue // *Analytical Chemistry.* 1948. Vol. 20. pp. 850–853.

155. Rees A.P., Wilson P.M., Wright B.W. The ability of *Sordaria fimicola* to take up and metabolize glucose and sucrose // *Journal of general microbiology.* 1984. Vol. 130. pp. 3235–3238.

156. Ruan Y.L., Llewellyn D.J., Furbank R.T. Suppression of sucrose synthase gene expression represses cotton fiber cell initiation, elongation, and seed development // *Plant Cell Online.* 2003. Vol. 15. pp. 952–964.

157. Ruan Y.-L. Sucrose metabolism: gateway to diverse carbon use and sugar signaling // *Annu. Rev. Plant Biol.* 2014. Vol. 65. pp. 33–67.

158. Sachs T. The Control of the Patterned Differentiation of Vascular Tissues // *Advances in Botanical Research.* 1981. Vol. 9. pp. 151–262.

159. 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. pp. 823–833.

160. Salnikov V.V., Grimson M.J., Seagull R.W., Haigler C.H. Localization of sucrose synthase and callose in freeze-substituted secondary-cell-wall stage cotton fibres // *Protoplasma.* 2003. Vol. 221. pp. 175–184.

161. Sauer N. Molecular physiology of higher plant sucrose transporters // *FEBS Lett.* 2007. Vol. 581. pp. 2309–2317.

162. Savidge R.A., Wareing P.F. Plant-growth regulators and the differentiation of vascular elements // In: *Xylem cell development* / Ed. by J. B. Tunbridge Wells: Castle House

Publications, 1981. pp. 192–235.

163. 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. B.J.R..N.R. Oxford: BIOS Scientific Publishers, 2000. pp. 1–30.

164. Schuetz M., Smith R., Ellis B. Xylem tissue specification, patterning, and differentiation mechanisms // Journal of Experimental Botany. 2013. Vol. 64. pp. 11–31.

165. Schwarze F., Baum S., Fink S. Dual modes of degradation by *Fistulina hepatica* in xylem cell walls of *Quercus robur* // Mycological Research, Volume , Issue 7. 2000. Vol. 104. pp. 846–852.

166. Schwarze F.W.M.R. Wood decay under the microscope // Fungal Biology Reviews. 2007. Vol. 21. pp. 133–170.

167. Shannon J.C., Pien F.-M., Cao P., Liu K.-C. (1998) *Brittle-1*, an adenylate translocator, facilitates transfer of extraplastidial ADP-glucose into amyloplasts of maize endosperms. Plant Physiology. 1998. Vol. 117. pp. 1235–1252.

168. Song D.L., Shen J.H., Li L.G. Characterization of cellulose synthase complexes in *Populus* xylem differentiation // New Phytologist. 2010. Vol. 187. pp. 777–790.

169. Sterky F., Regan S., Karlsson J., Hertzberg M., Rohde A.. Gene discovery in the wood-forming tissue of poplar: analysis of 5692 expressed sequence tags // Proc. Natl. Acad. Sci. 1998. Vol. 95. pp. 13330–13335.

170. 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. pp. 401–407.

171. Su J.C., Preiss J. Sucrose Synthase from Corn Kernels // Seikagaku. 1977. Vol. 49. P. 6.

172. Subbaiah C.C., Sachs M.M. Altered patterns of sucrose synthase phosphorylation and localization precede callose induction and root tip death in anoxic maize seedling // Plant Physiol. 2001. Vol. 125. pp. 585–594.

173. Tanase K., Yamaki S. Purification and characterization of two sucrose synthase isoforms from Japanese pear fruit // Plant and Cell Physiology. 2000. Vol. 41. pp. 408-414.

174. 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 Journal*. 2000. Vol. 23. pp. 43–53.

175. Telewski F., Aloni R., Sauter J. Physiology of secondary tissues of *Populus* // In: *Biology of Populus and its implications for management and conservation* / Ed. by R. S., H. B.J., P. H., T. H. Ottawa: NRC Research Press, National Research Council of Canada, 1996. pp. 301–329.

176. Tiessen A., Hendriks J.H.M., Stitt M., Branscheid A., Gibon Y., Farré 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. pp. 2191–2213.

177. Tokunaga N., Sakakibara N., Umezawa T., Ito Y., Fukuda H., Sato Y. Involvement of extracellular dilignols in lignification during tracheary element differentiation of isolated *Zinnia* mesophyll cells // *Plant and Cell Physiology*. 2005. Vol. 46. pp. 224–232.

178. Tomazello M., Silva Cardoso N. da. Seasonal variations of the vascular cambium of teak (*Tectona grandis* L.) in Brazil // In: *Tree-ring analysis: biological, methodological and environmental aspects* / Ed. by Wimmer R. V.R.E. Wallingford: CABI publishing, 1999. pp. 147–154.

179. Uggla C., Magel E., Moritz T., Sundberg B. Function and dynamics of auxin and carbohydrates during early-wood/latewood transition in Scots pine // *Plant Physiol*. 2001. Vol. 125. pp. 2029–2039.

180. Uggla C., Mellerowicz E.J., Sundberg B. Indole-3-acetic acid controls cambial growth in scots pine by positional signaling // *Plant Physiology*. 1998. Vol. 117. pp. 113–121.

181. Vanholme R., Morreel K., Ralph J., Boerjan W. Lignin engineering // *Current Opinion in Plant Biology*. 2008. Vol. 11. pp. 278–285.

182. Wachter R., Langhans M., Aloni R., Gotz S., Weilmunster A., Koops A., Temguia L., Mistrik I., Pavlovkin J., Rascher U. Vascularization, high-volume solution flow, and localized roles for enzymes of sucrose metabolism during tumorigenesis by *Agrobacterium tumefaciens* // *Plant Physiology*. 2003. Vol. 133. pp. 1024–1037.

183. Wang L., Ruan Y.L. Shoot–root carbon allocation, sugar signalling and their coupling with nitrogen uptake and assimilation // *Functional Plant Biology*. 2016. Vol. 43. pp. 105–113.

184. Watanabe M, Setoguchi D., Uehara K., Ohtsuka W., Watanabe Y. Apoptosis-like cell death of *Brassica napus* leaf protoplast // *New Phytol.* 2002. Vol. 156. pp. 417–426.
185. Weil M., Krausgrill S., Schuster A., Rausch T. A 17 kDa *Nicotiana tabacum* cell-wall peptide acts as an in-vitro inhibitor of the cell-wall isoform of acid invertase // *Planta.* 1994. Vol. 193. pp. 438–445.
186. Welham T., Pike J., Horst I., Fletmetakis 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.
187. Wheeler E.A., Baas P., Gasson P.E. IAWA list of microscopic features for hardwood identification. // *IAWA bull. n.s.* 1989. Vol. 10. pp. 219–332.
188. Wheeler E.A., Baas P. Wood identification // *IAWA Journal.* 1998. Vol. 19. pp. 241–264.
189. Wind J., Smeekens S., Hanson J. Sucrose: Metabolite and signaling molecule // *Phytochemistry.* 2010. Vol. 71. pp. 1610–1614.
190. 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. pp. 151–155.
191. Winter H., Huber J.L., Huber S.C. Identification of sucrose synthase as an actin-binding protein // *FEBS Letters.* 1998. Vol. 430. pp. 205–208.
192. Winter H., Huber S.C. Regulation of Sucrose Metabolism in Higher Plants: localization and regulation of activity of key enzymes // *Critical Reviews in Plant Sciences.* 2000. Vol. 19. pp. 31–67.
193. Wobus U., Weber H. Sugars as signal molecules in plant seed development // *Biological Chemistry.* 1999. Vol. 380. pp. 937–944.
194. Wu Z., Zhang B., Yan B. Regulation of enzyme activity through interactions with nanoparticles // *International journal of molecular sciences.* 2009. Vol. 10. pp. 4198–4209.
195. Xu D.P., Sung S.J., Loboda T.S., Kormanik P.P., Black C.C. Characterization of sucrolysis via the uridine diphosphate and pyrophosphate-dependent sucrose synthase pathway // *Plant Physiol.* 1989. Vol. 90. pp. 635–642.

196. 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. pp. 1293–1294.
197. Ye Z.H., Zhong R. Molecular control of wood formation in trees // *The Journal of Experimental Botany*. 2015. Vol. 66. pp. 4119–4131.
198. 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. pp. 599–608.
199. Zhang C., Yu M., Ma R., Shen Z., Zhang B., Korir N.K. Structure, expression profile, and evolution of the sucrose synthase gene family in peach (*Prunus persica*) // *Acta Physiologiae Plantarum*. 2015. Vol. 37. pp. 1–15.
200. Zhang D., Xu B., Yang X., Zhang Z., Li B. The sucrose synthase gene family in *Populus*: structure, expression, and evolution // *Tree Genetics & Genome*. 2011. Vol. 7. pp. 443–456.