

На правах рукописи



НИКЕРОВА Ксения Михайловна

**АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ
ПРИ ИЗМЕНЕНИИ СЦЕНАРИЕВ КСИЛОГЕНЕЗА
У *BETULA PENDULA* ROTH И *PINUS SYLVESTRIS* L.**

03.01.05 – «Физиология и биохимия растений»

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Санкт-Петербург

2020

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

Научный руководитель

доктор биологических наук
ГАЛИБИНА Наталия Алексеевна

Официальные оппоненты

КОСОБРЮХОВ Анатолий Александрович,
доктор биологических наук,
Институт фундаментальных проблем биологии
Российской академии наук
– обособленное подразделение
Федерального государственного бюджетного
учреждения науки
«Федеральный исследовательский центр
«Пушкинский научный центр биологических
исследований Российской академии наук»,
руководитель группы

МИНИБАЕВА Фарида Вилевна,
доктор биологических наук,
Казанский институт биохимии и биофизики
– обособленное структурное подразделение
Федерального государственного бюджетного
учреждения науки «Федеральный
исследовательский центр «Казанский научный
центр Российской академии наук»,
главный научный сотрудник

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук

Защита состоится 21 октября 2020 года в 14:00 на заседании диссертационного совета Д 002.211.02 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Ботаническом институте им. В.Л. Комарова Российской академии наук по адресу: 197376, г. Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д. 2.
Тел. (812)372-54-42, факс (812)372-54-43, disssovet.d00221102@binran.ru

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

Автореферат разослан « » _____ 2020 года

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук



Лянгузова Ирина Владимировна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Процесс формирования древесины, или ксилогенез, в жизни древесного растения имеет огромное значение. В основе ксилогенеза лежит фиксация углерода в составе структурных полимеров углеводной и фенольной природы клеточных стенок одревесневающих тканей растений. По активности основных ферментов углеводного и фенольного обмена можно судить о преобладании тех или иных метаболических путей и, как следствие, о возможном сценарии ксилогенеза (Sudachkova et al., 2004; Foucart et al., 2006; Nomura et al., 2013; Галибина и др., 2015; 2016; Novitskaya et al., 2016, 2020; Мощенская и др., 2017; Iakimova, Woltering, 2017). Структурные элементы древесины отличаются между собой по составу компонентов их клеточных стенок (целлюлоза, гемицеллюлозы, пектины, лигнин, белки), состав и соотношение которых определяют физико-механические, технологические, топливные и декоративные свойства древесины. Образование ксилемы, с одной стороны, находится под контролем генома, а с другой – зависит от действия экологических факторов, кроме того, в пределах одного дерева сценарии ксилогенеза могут отличаться (Paiva et al., 2008; Dharanishanthi, Dasgupta, 2016; Novitskaya et al., 2016). В этой связи, поиск цитологических, биохимических и молекулярных маркеров, которые могли бы определять тот или иной путь ксилогенеза, представляется актуальным.

С этой точки зрения, ценным объектом является карельская береза (*Betula pendula* Roth var. *carelica* (Mercl.) Hämet-Ahti) – форма березы повислой (*B. pendula* Roth), в древесине которой нарушены соотношение и пространственная ориентация структурных элементов (Барильская, 1978; Коровин и др., 2003; Novitskaya, Kushnir, 2006; Новицкая, 2008). Деревья карельской березы (*B. pendula* var. *carelica*) различаются между собой по времени начала и моделям развития узорчатой древесины в онтогенезе, у некоторых деревьев узорчатая древесина формируется только в отдельных частях ствола (Любавская, 1978; Ермаков, 1986; Машкина и др., 2000; Novitskaya et al., 2016). Все вышеперечисленное делает *B. pendula* var. *carelica* уникальным объектом для изучения механизмов ксилогенеза, поскольку в рамках одного ствола есть возможность исследовать «нормальные и аномальные» сценарии роста и развития проводящих тканей, нивелируя, тем самым, влияние факторов среды (Novitskaya et al., 2016).

Исследования, выполненные ранее в Институте леса КарНЦ РАН, выявили физиолого-биохимические и молекулярно-генетические закономерности, связанные со структурными особенностями и декоративными качествами узорчатой древесины (Галибина и др., 2016, 2018, 2019; Мощенская и др., 2016, 2017, 2019; Novitskaya et al., 2016, 2020). Помимо изменений в углеводном обмене, в тканях ствола *B. pendula* var. *carelica*, по сравнению с обычной березой повислой (*B. pendula* var. *pendula*), была отмечена высокая активность пероксидазы (ПО) – фермента антиоксидантной системы (АОС) (Галибина и др., 2013). ПО, наряду с другими ферментами, супероксиддисмутазой (СОД), каталазой (КАТ), полифенолоксидазой (ПФО), входит в единую сеть ферментов АОС, согласованное функционирование которой определяется локальными и общеклеточными каскадными взаимодействиями (Прадедова и др., 2011). На сегодняшний день в литературе имеются обширные и разнообразные данные, описывающие состав, строение и функции компонентов АОС в растительном организме; сезонную динамику их активности в различных органах и тканях; метаболические пути, в которых они, в той или иной степени, принимают участие (Mittler et al., 2002; Blokhina et al., 2003; Halliwell, 2006; Mittler, 2017 и др.).

Между тем, роль ферментов АОС в процессе ксилогенеза у древесных растений изучена гораздо хуже. Известно, что они принимают непосредственное участие в образовании лигнина и формировании древесины (Fernández-García et al., 2004; Passardi et al., 2004; Gapper, Dolan, 2006; Ros-Barceló et al., 2006; Ros-Barceló, Gómez Ros, 2009, Gill et al., 2010 и др.). Однако до сих пор остается невыясненным вопрос о том, существуют ли особенности функционирования ферментов АОС у древесных растений с признаками структурных аномалий.

Узорчатость – это лишь частный случай нарушения ксилогенеза у древесных растений. Среди нарушений камбиальной деятельности можно отметить довольно широко распространенное явление – формирование косослойной древесины у сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) (Hartig, 1895; Preston, 1949; Jones, 1963; Savidge, Farrar, 1984; Philipson et al., 1972; Harris, 2012; Larson, 2012). Исходя из данных литературы об особенностях метаболических процессов при формировании косослоя (Harris, 1973; Zagórska-Marek, Little, 1986; Kubler, 1991, Kozłowski, Pallardy, 1996), можно предположить, что результаты, полученные в ходе изучения *B. pendula* var. *carelica*, могут быть использованы в качестве фундаментальной основы для выявления механизмов развития структурных аномалий и у *P. sylvestris*.

С целью выявления роли ферментов АОС в формировании узорчатой древесины у *B. pendula* var. *carelica* и косослойной древесины у *P. sylvestris* были поставлены следующие **задачи**:

1. изучить годовичную динамику активности перекись-утилизирующих ферментов (КАТ, ПО) в тканях ствола двух форм березы повислой (*B. pendula* var. *pendula* и *B. pendula* var. *carelica*), различающихся по структуре древесины;
2. исследовать активность ферментов АОС (СОД, КАТ, ПО и ПФО) в тканях ствола у *B. pendula* var. *pendula* и *B. pendula* var. *carelica*, различающихся по степени узорчатости древесины;
3. изучить активность ферментов АОС в стебле и листе у сеянцев *B. pendula* var. *pendula* и *B. pendula* var. *carelica*;
4. исследовать изменение активности ферментов АОС у *B. pendula* в листовом аппарате;
5. сравнить активность ферментов АОС в тканях ствола у деревьев *P. sylvestris* с прямослойной и косослойной древесиной.

Научная новизна и практическая значимость работы. Впервые проведено комплексное изучение активности ферментов АОС в проводящих тканях ствола у двух форм *B. pendula* при разных сценариях ксилогенеза. Впервые продемонстрирована возможность использовать ферменты АОС для выявления нарушения ксилогенеза у *B. pendula* var. *carelica*, в том числе, и на начальных этапах онтогенеза. Впервые у сеянцев двух форм *B. pendula* изучено изменение активности ферментов АОС в зависимости от размеров листа. Впервые выявлены различия в активности ферментов АОС у *P. sylvestris* при формировании прямослойной и косослойной древесины.

Выявленные закономерности могут лечь в основу диагностики качества древесины *B. pendula* var. *carelica* и *P. sylvestris* на лесосеменных плантациях и в местах их естественного произрастания, что необходимо как для целей фундаментальной науки, так и в различных областях промышленности при заготовке высококачественного материала, обладающего наибольшей ценностью.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. У *B. pendula* разные сценарии ксилогенеза, связанные с формированием (1) прямослойной и (2) узорчатой древесины, отличаются по распределению активности комплекса ферментов АОС. Повышение активности ПО и ПФО при образовании узорчатой древесины является следствием преобладания апопластного пути метаболизации сахарозы и включением образующихся моносахаров преимущественно в биохимические пути вторичного метаболизма. Формирование узорчатой древесины у *B. pendula* var. *carelica* может быть диагностировано на разных стадиях онтогенеза по количественным значениям активности ферментов АОС.
2. Результаты, полученные в ходе изучения *B. pendula* var. *carelica*, можно использовать в качестве фундаментальной основы для выявления механизмов развития структурных аномалий осевых органов у *P. sylvestris*. Возрастание активности ПО и ПФО в камбиальной зоне у *P. sylvestris* при образовании косослойной древесины происходит на фоне увеличения метаболизации сахарозы в апопласте.

Личное участие автора. Автор принимал личное участие в планировании работы, постановке целей и задач исследования, модификации и совершенствовании методов исследования. Автор лично принимал участие в планировании и проведении экспедиционной и экспериментальной работы, в обработке полученных данных, в том числе, статистически, и в обсуждении полученных результатов. Автор лично участвовал в написании статей и подготовке устных и стендовых докладов по материалам исследования. Диссертация написана автором самостоятельно.

Апробация работы. Результаты диссертационной работы были представлены в виде устных и стендовых докладов на 16 Международных и Всероссийских научных конференциях и симпозиумах, в том числе 18 Международной Пушкинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века (Пушино, 21-25 апреля 2014 г.); IX и X Международных Симпозиумах «Фенольные соединения: фундаментальные и прикладные аспекты» (Москва, 20-25 апреля 2015 г.; 14-19 мая 2018 г.); VIII и IX Съездах Общества физиологов растений России (Петрозаводск, 21-26 сентября 2015 г.; Казань, 18-24 сентября 2019 г.); Годичных собраниях Общества физиологов растений России (Калининград, 19-25 мая 2014 г.; Санкт-Петербург, 21–24 июня 2016 г.; Судак, 18-24 сентября 2017 г.; Иркутск, 10-15 июля 2018 г.); Fourth International Symposium «Plant Signaling and Behavior» (Санкт-Петербург, 19-24 июня 2016 г.); II Международном симпозиуме «Молекулярные аспекты редокс-метаболизма растений» и международной научной школе «Роль активных форм кислорода в жизни растений» (Уфа, 26 июня – 1 июля 2017 г.); Всероссийской научной конференции с международным участием «Бореальные леса: состояние, динамика, экосистемные услуги» (Петрозаводск, 11-15 сентября 2017 г.); Международной конференции «Young biologists science Week-2017» (Петрозаводск, 20-25 ноября 2017 г.); 10th International Conference Photosynthesis and Hydrogen Energy Research for Sustainability (Saint Petersburg, June 23-28 2019).

Степень достоверности. Достоверность результатов обеспечена проведением исследований с использованием многочисленных современных методик на научном оборудовании Центра коллективного пользования Федерального исследовательского центра «Карельский научный центр Российской академии наук» в многократной

биологической и аналитической повторности. Результаты исследований воспроизводимы.

Связь работы с научными программами. Исследования проводились в период с 2014 по 2019 гг. в рамках плановых тем НИР лаборатории физиологии и цитологии древесных растений ИЛ КарНЦ РАН, грантов РФФИ 16-04-01191, 19-04-00622 (рук. Новицкая Л. Л.), 16-04-100639 (рук. Галибина Н. А.) и гранта конкурса «УМНИК» (рук. Никерова К. М.).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 48 работ, из них 16 статей в рецензируемых журналах, входящих в перечень изданий, рекомендованных ВАК (7 – Web of Science и Scopus).

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследования, результатов экспериментальной работы и их обсуждения, заключения, выводов, списка цитируемой литературы и приложения. Список литературы включает 604 наименования, из них 501 на иностранном языке. Диссертация изложена на 201 странице машинописного текста, содержит 6 таблиц и 46 рисунков.

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

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1. Обзор литературы

Рассмотрены типы структурных аномалий у древесных растений, описаны известные на данный момент механизмы формирования узорчатой древесины у *B. pendula* var. *carelica* и косослойной древесины у *P. sylvestris*. Обсуждается строение и функции ферментов АОС – СОД, КАТ, ПО и ПФО и активных форм кислорода (АФК) в растительном организме, показаны возможные пути их взаимодействия. Рассмотрены взаимосвязи АОС с фенольным и углеводным обменом. Обсуждается вопрос важности поиска биохимических маркеров различных сценариев ксилогенеза, одними из которых могут быть ферменты АОС.

Глава 2. Объекты и методы исследования

2.1. Растительный материал

Объектами исследования были: (1) две формы березы повислой: *B. pendula* var. *pendula* и *B. pendula* var. *carelica* разного возраста; (2) взрослые растения *P. sylvestris* с прямослойной и косослойной древесиной ствола.

46-летние деревья *B. pendula* var. *pendula* с характерной для вида прямослойной древесиной и ***B. pendula* var. *carelica*** с узорчатой древесиной ствола произрастали на Агробиологической станции Карельского научного центра РАН.

25-летние растения *B. pendula* var. *carelica* произрастали на лесосеменной плантации на территории Карелии, отличались по степени узорчатости древесины ствола, которую характеризовали баллами от 0 (безузорчатые растения) до 3 (наиболее узорчатые растения), согласно способу диагностики узорчатой текстуры древесины, предложенному В. И. Ермаковым (1986).

12-летние растения *B. pendula* var. *pendula* и *B. pendula* var. *carelica* с разной степенью узорчатости древесины ствола произрастали на Агробиологической станции Карельского научного центра РАН.

Сеянцы *B. pendula* var. *pendula* и *B. pendula* var. *carelica* (1.5–10 месяцев) выращивали на светоустановке при следующих условиях: температура воздуха – 21–22 °С, освещенность – 8 клк, светопериод – 16 часов. Питательный грунт имел следующий состав основных элементов: N – 0.5 %, С – 21 %, P подвижный – 0.03 %, K подвижный – 0.09 %. 12-летние растения и сеянцы были выращены из семян, полученных от опыления *B. pendula* var. *pendula* и контролируемого опыления плюсовых деревьев *B. pendula* var. *carelica* (Forelia OY, Финляндия).

Деревья *P. sylvestris* с прямослойной древесиной и с проявившимся косослоем, выраженным в разной степени (5–20 градусов наклона) произрастали в трех типах лесорастительных условий: брусничном, черничном и черничном влажном (подзона средней тайги на территории Республики Карелия) древостоях. Все древостои III–IV класса бонитета, имели 2–3 поколения сосны, характеризовались низкой полнотой (около 0.5) и общей сомкнутостью крон не менее 0.6. Наличие косослоя определяли по отклонению волокон от линии, параллельной продольной оси. Для этого вырезали окошки 10x6 см на расстоянии 1 м друг от друга по вертикальной линии и измеряли угол наклона.

2.2. Отбор растительного материала

У взрослых деревьев *B. pendula* и *P. sylvestris* на анализ отбирали ткани флоэмы и ксилемы на высоте ~ 1.3 м от земли. У растений *B. pendula* var. *carelica* выбирали участки с наибольшей степенью проявления структурных аномалий. Отбор тканей ствола контролировали под световым микроскопом. Материал замораживали в жидком азоте и хранили при температуре -80 °С. Со ствола деревьев *P. sylvestris* на высоте ~ 1.3 м от земли были взяты керны (возрастной бурав Haglof, Швеция) для определения среднего значения радиального прироста за десятилетний период.

У 1.5 и 3–4-месячных сеянцев *B. pendula* var. *pendula* и *B. pendula* var. *carelica* на анализ отбирали стебли и листья размером 2–5 см. У 10-месячных сеянцев на анализ отбирали листья, которые находились во внепочечном периоде развития. По форме исследуемые листья соответствовали форме листа взрослого растения, однако обладали разными размерами, поэтому листья сеянцев были разделены на стадии по длине листовой пластинки: 1–2 см, 3–4 см, 5–6 см, 7–8 см – I, II, III и IV стадии соответственно.

2.3. Биохимические исследования

Определение активности ферментов. Растительные ткани растирали с жидким азотом и гомогенизировали в буфере при 4 °С, который имел следующий состав: 50 мМ Нерес (рН 7.5), 1 мМ ЭДТА, 1 мМ ЭГТА, 3 мМ ДТТ, 5 мМ MgCl₂, 0.5 мМ PMSF. После 20-минутной экстракции гомогенат центрифугировали при 10000 g в течение 20 минут (центрифуга MPW-351R, Польша). Осадок троекратно промывали буфером. В осадке определяли активность апопластной инвертазы (АпИInv), в супернатанте – активность сахарозосинтазы (СС), СОД, КАТ, ПО и ПФО. Активность указанных ферментов определяли спектрофотометрически (Спектрофотометр СФ-2000, ОКБ «Спектр», Россия). Содержание белка определяли по методу Бредфорда.

Для определения активности АпИInv инкубационная среда содержала 100 мМ ацетатный буфер (рН 4.7), 25 мМ сахарозу. Количество образовавшейся в процессе инкубации глюкозы определяли глюкозооксидазным методом. Активность АпИInv выражали в мкмоль распавшейся сахарозы на г сырой ткани за 30 минут (мкмоль распавшейся сахарозы/г сырой ткани).

Для определения активности СС инкубационная среда содержала 73 мМ трис-НСl (рН 7.5), 2.5 мМ УДФ-глюкозу, 20 мМ фруктозу, 5 мМ MgCl₂, 3 мМ ДТТ. Количество образовавшейся сахарозы определяли по резорциновому методу Роэ. Активность СС выражали в мкмоль образовавшейся сахарозы на мг белка за 30 минут (мкмоль сахарозы/мг белка).

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

Для определения активности СОД инкубационная среда содержала 50 мМ К, Na-фосфатный буфер (рН 7.8), 172 мкМ НСТ, 210 мкМ метионин, 24 мкМ рибофлавин, 0.1 % тритон X-100. Были проведены дополнительные серии измерений оптической плотности опытных образцов, при которых в инкубационную среду поочередно не добавляли метионин и рибофлавин. Активность определяли по уменьшению оптической плотности при 560 нм после 30 минут инкубации под светом флуоресцентных ламп. Активность СОД выражали в усл. ед. на мг белка за 30 минут (усл. ед./мг белка) (Никерова и др., 2018, 2019б).

Для определения активности КАТ инкубационная среда содержала 50 мМ К, Na-фосфатный буфер (рН 7.8) и 14.7 мМ перекись водорода. Активность определяли по уменьшению оптической плотности при 240 нм, содержание перекиси водорода рассчитывали по предварительно построенному градуировочному графику (Никерова и др., 2016). Активность КАТ выражали в мкмоль восстановленной перекиси водорода на мг белка за 4 минуты (мкмоль H₂O₂/мг белка).

Для определения активности ПФО инкубационная среда содержала 50 мМ К, Na-фосфатный буфер (рН 7.8), 16.4 мМ пирокатехин (246 мМ пирокатехин для тканей ствола *P. sylvestris*). Активность определяли по увеличению оптической плотности при длине волны 420 нм, где поглощают продукты окисления пирокатехина. Активность ПФО выражали в усл. ед. на мг белка за 1 минуту (усл. ед./мг белка) у *B. pendula* (Никерова и др., 2018, 2019б) и в усл. ед.*1000 на мг белка за 1 минуту (усл. ед.*1000/мг белка) у *P. sylvestris*.

Определение содержания целлюлозы. Целлюлозу выделяли по методу Кюршнера-Хоффера смесью концентрированной азотной кислоты и этилового спирта в соотношении 1:4 (по объему) (Оболенская и др., 1991). Содержание целлюлозы определяли гравиметрическим методом и выражали в процентах на абсолютно сухую навеску с поправкой на зольность.

Определение содержания лигнина. Для определения лигнина навеску растительного материала предварительно обрабатывали этиловым спиртом для освобождения от смолистых веществ (Гелес, 2001). Затем лигнин выделяли методом кислотного гидролиза в 72-% серной кислоте (TAPPI protocol, 2011). Содержание лигнина определяли гравиметрическим методом и выражали в процентах на абсолютно сухую навеску с поправкой на зольность.

2.4. Статистическая обработка данных

Статистическая обработка данных осуществлялась в среде Microsoft Excel и PAST. На диаграммах приведены средние значения, с учетом указанной биологической (обозначение на графиках **n**) и трехкратной аналитической повторностей, и их стандартные ошибки. Выборки проверялись на нормальность с использованием критерия Шапиро-Уилка. Для оценки достоверности различий при нормальном распределении использовали t-критерий Стьюдента (обозначение на графиках (*)). При отклонениях от нормального распределения для оценки различий использовали критерий Манна-Уитни (обозначение на графиках латинскими буквами). Для обнаружения зависимости активности ферментов и содержания целлюлозы, лигнина от степени узорчатости древесины, а также активности ферментов от стадии развития листа проводили анализ с использованием теста ранговой корреляции Спирмена. Также проводили корреляционный анализ, показывающий взаимосвязь активности ферментов между собой. Статистически значимыми считали различия при $p < 0.05$.

Глава 3. Результаты и обсуждение

3.1. Годичная динамика активности ПО и КАТ в тканях ствола у двух форм *V. pendula*, различающихся по структуре древесины

Исследование активности перекись-утилизирующих ферментов в тканях ствола проводили в течение 2016 года на 46-летних растениях *V. pendula* var. *pendula* и *V. pendula* var. *carelica*. Даты отбора были приурочены к протеканию следующих фенофаз: период покоя; выход из состояния покоя, активное сокодвижение, рост листовой пластинки; камбиальный рост; подготовка к состоянию покоя.

Сезонная динамика активности КАТ в ксилеме была схожа у двух форм *V. pendula*. Активность фермента повышалась при выходе из состояния покоя (29.03), достигала максимальных значений в период разворачивания листовой пластинки (12.05) и снижалась в период камбиального роста (особенно середина июня-июль), после завершения которого активность вновь возрастала (рис. 1).

Активность КАТ в ксилеме у растений *V. pendula* var. *pendula* была выше, чем у узорчатых растений *V. pendula* var. *carelica*, за исключением периода камбиального роста, когда происходит формирование древесины и отложение вторичной клеточной стенки (вторая половина июля). В этот период в ксилеме наблюдалась обратная тенденция: активность КАТ была выше у растений *V. pendula* var. *carelica* (рис. 1Б).

Во флоэме активность КАТ в период покоя была ниже, чем в ксилеме. Известно, что процессы дыхания у древесного растения, в большей степени,

сосредоточены в ксилеме, и активность КАТ может быть косвенным показателем их интенсивности (Крамер, Козловский, 1983).

Во флоэме *B. pendula* var. *pendula* при выходе растений из состояния покоя активность КАТ возрастала, за исключением периода сокодвижения (28.04) – в этот период ее активность резко снизилась. В период камбиального роста активность фермента практически не изменялась, а прекращение ростовых процессов и интенсивный отток метаболитов в ткани ствола сопровождалось возрастанием активности КАТ. Во флоэме сезонная динамика активности КАТ у *B. pendula* var. *carelica* отличалась от таковой у растений *B. pendula* var. *pendula*. При выходе растений из состояния покоя (29.03) и после окончания камбиального роста (10.08), в период интенсивного оттока метаболитов в ствол (13.09) происходило снижение активности КАТ (рис. 1). В целом, активность КАТ во флоэме была выше в течение всего сезона у растений *B. pendula* var. *pendula* по сравнению с узорчатыми растениями *B. pendula* var. *carelica*, за исключением периода формирования вторичной клеточной стенки (вторая половина июля).

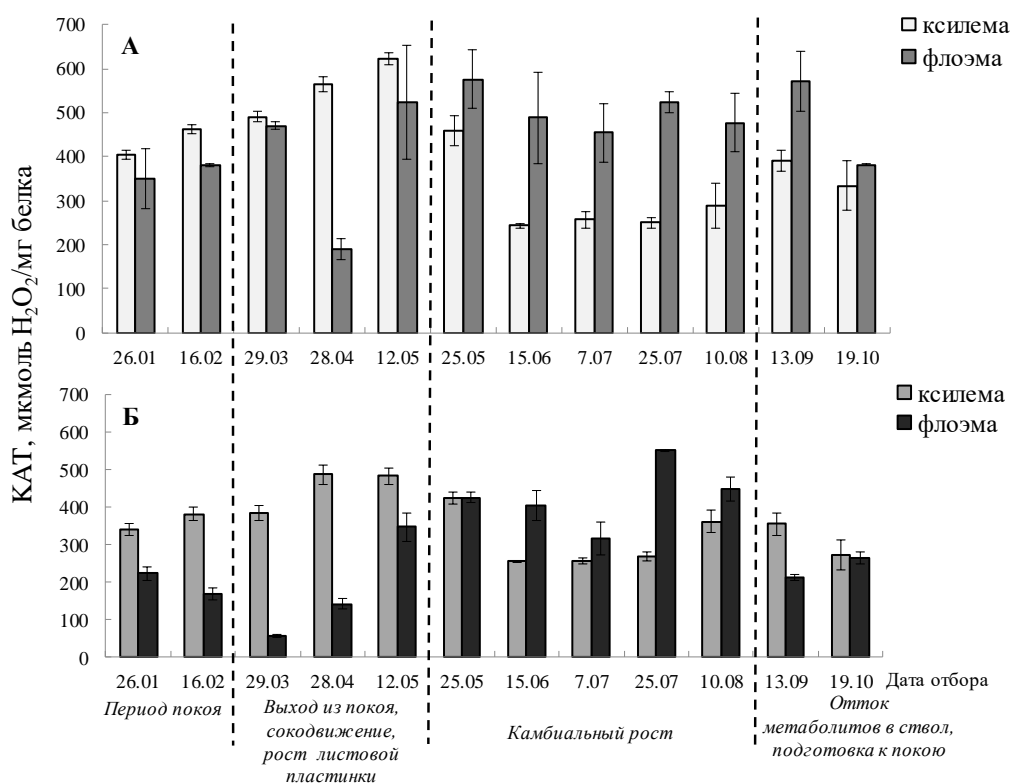


Рис. 1. Сезонная динамика активности КАТ в тканях ствола у *B. pendula* var. *pendula* (А) (n=5) и *B. pendula* var. *carelica* (Б) (n=5).

У обеих изучаемых форм *B. pendula* в период глубокого покоя активность ПО, как и КАТ, была невысокая (рис. 2). Известно, что ферменты АОС являются показателем активных аэробных процессов, а в зимний период покоя в растениях преобладают анаэробные процессы (Рогожин, 2004).

Пик активности ПО приходился на конец марта, когда растения еще находились в состоянии вынужденного покоя. В ксилеме низкие значения активности наблюдали в период сокодвижения и в период формирования ранней тонкостенной древесины (15.06). Во флоэме – только в период формирования ранней тонкостенной древесины. В тканях флоэмы, по сравнению с тканями ксилемы, активность ПО была

значимо выше у *B. pendula* var. *pendula* ($p=0.0304$) и у *B. pendula* var. *carelica* ($p=0.0003$). Выявлено, что у растений *B. pendula* var. *pendula* на протяжении всего сезона активность ПО была ниже, чем у растений *B. pendula* var. *carelica* как в ксилеме ($p=0.0024$), так и во флоэме ($p<0.0001$) (рис. 2).

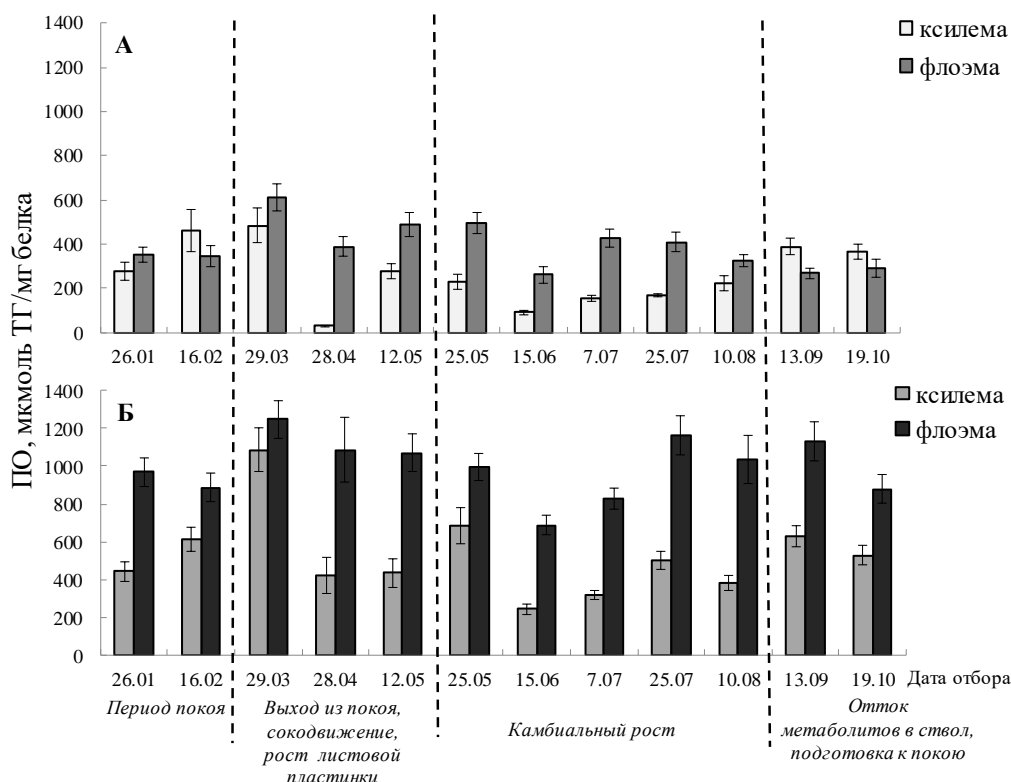


Рис. 2. Сезонная динамика активности ПО в тканях ствола у *B. pendula* var. *pendula* (А) (n=5) и *B. pendula* var. *carelica* (Б) (n=5).

Полученные данные подтверждают обнаруженную ранее (Галибина и др., 2013) обратную корреляцию между ростовыми процессами и пероксидазной активностью в тканях ствола. В период камбиального роста основной субстрат в тканях березы – сахаразы – интенсивно расходуется на синтез компонентов клеточных стенок структурных элементов древесины. В этот период метаболизация сахаразы в камбиальных инициалах происходит с участием цитоплазматических ферментов: цитоплазматической инвертазы (ЦитИнь) (на стадии формирования тонкостенной древесины) и СС (на стадии активного отложения вторичной клеточной стенки (Галибина, 2018). При снижении роли ЦитИнь и СС в метаболизации сахаразы в тканях ствола *B. pendula* активное участие принимает АпИнь (Галибина и др., 2019а).

В этой связи, была рассмотрена сезонная динамика активности АпИнь. У растений *B. pendula* var. *pendula* на протяжении всего сезона активность АпИнь, как и активность ПО, была, в целом, ниже, чем у растений *B. pendula* var. *carelica* в тканях флоэмы ($p=0.0073$) и ксилемы (в каждую отдельную дату отбора). Активность АпИнь и ПО положительно коррелировали в ксилеме и у растений *B. pendula* var. *pendula* ($r=0.86$; $p=0.0004$), и у *B. pendula* var. *carelica* ($r=0.68$; $p=0.015$).

Выявленная в течение сезона взаимосвязь активностей КАТ, ПО и АпИнь может свидетельствовать о тесной связи между изменениями, происходящими в

углеводном обмене у *B. pendula* var. *carelica* (Галибина и др., 2015а, 2015б, 2019а, 2019б), и ферментами АОС.

Таким образом, данный этап исследования показал, что сезонная динамика активности КАТ и ПО различалась у *B. pendula* var. *pendula* и *B. pendula* var. *carelica*. Период камбиального роста является наиболее информативным с точки зрения рассмотрения участия данных ферментов в формировании узорчатой древесины у *B. pendula* var. *carelica*. На основании полученных данных можно сделать вывод о том, что по изменению активности КАТ и ПО можно судить о возможном сценарии ксилогенеза у *B. pendula* var. *carelica*.

У растений *B. pendula* var. *carelica* наблюдается более высокая активность ПО, а у растений *B. pendula* var. *pendula* практически весь сезон (за исключением периода камбиального роста) выше активность КАТ. С одной стороны, причиной меньшей активности КАТ у *B. pendula* var. *carelica* может быть высокое содержание у нее перекиси водорода, которая, согласно данным литературы, ингибирует КАТ (Мирошниченко, 1992). С другой стороны, известно, что константа Михаэлиса у КАТ намного более высокая, чем у ПО (Mittler, Zilinskas, 1991; König et al., 2002), что говорит о низком сродстве к своему субстрату – перекиси водорода. В этой связи, наоборот, более низкое содержание перекиси водорода в тканях узорчатых растений *B. pendula* var. *carelica* может быть причиной более низкой у них активности КАТ. Для выяснения этих вопросов необходимо определение активности других ферментов АОС: СОД – фермента, участвующего в образовании перекиси водорода, и ПФО – фермента, который может перехватывать кислород и, с его участием, окислять фенольные соединения совместно с ПО.

3.2. Распределение активности ферментов АОС в камбиальной зоне растений *B. pendula* при разных сценариях ксилогенеза

Для исследования были выбраны 12-летние растения *B. pendula* var. *carelica*, у которых на одном стволе встречались безузорчатые и узорчатые участки древесины. В качестве контрольных использовали растения *B. pendula* var. *pendula*. Ткани отбирали в период активного камбиального роста в июле 2018 года.

В ксилеме активность СОД находилась примерно на одном уровне у всех исследуемых растений, различающихся по структуре древесины. Различия между активностью КАТ у растений *B. pendula* var. *pendula* и *B. pendula* var. *carelica* не были значимы, однако наблюдалась тенденция на увеличение активности фермента у растений *B. pendula* var. *carelica* даже в той части ствола, где аномалии внешне не были выражены. При рассмотрении активности ПО и ПФО выявлены сходные тенденции. Оба фермента имели близкие значения активности у растений *B. pendula* var. *pendula* и в безузорчатой части ствола у растений *B. pendula* var. *carelica*. В узорчатых участках активность обоих ферментов была достоверно более высокой (рис. 3).

Во флоэме наблюдалась тенденция к увеличению активности СОД в ряду: *B. pendula* var. *pendula*, безузорчатые и узорчатые участки ствола *B. pendula* var. *carelica*. Активность КАТ во флоэме, как и в ксилеме, у исследуемых растений не отличалась. Значения активности ПО и ПФО в ряду растений *B. pendula* var. *pendula*, безузорчатые и узорчатые участки ствола *B. pendula* var. *carelica* увеличивались (рис. 4).

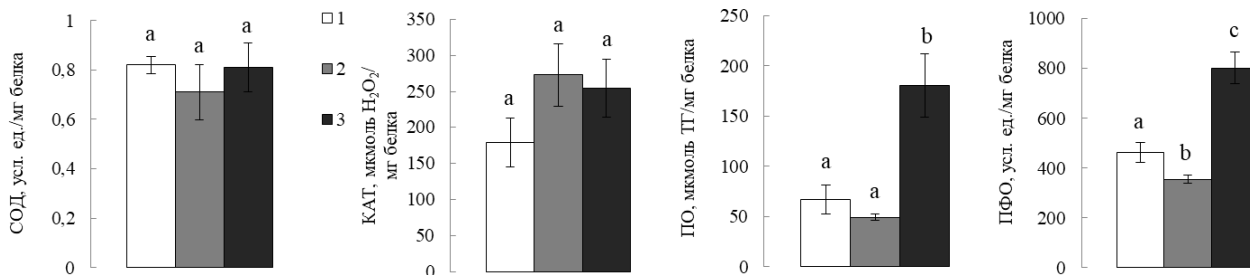


Рис. 3. Активность ферментов АОС в ксилеме у растений *B. pendula* var. *pendula* (1) (n=4) и у растений *B. pendula* var. *carelica* в безузорчатой (2) (n=4) и узорчатой (3) (n=4) частях ствола.

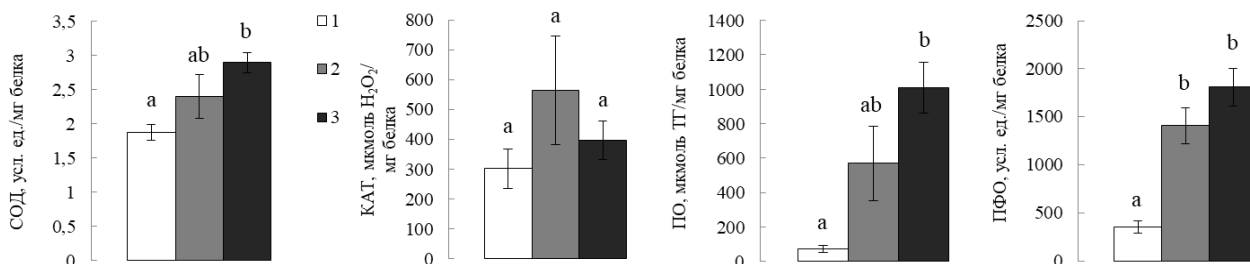


Рис. 4. Активность ферментов АОС во флоэме у растений *B. pendula* var. *pendula* (1) (n=4) и у растений *B. pendula* var. *carelica* в безузорчатой (2) (n=4) и узорчатой (3) (n=4) частях ствола.

В результате проведенного исследования в дифференцирующихся тканях ксилемы у растений *B. pendula* var. *pendula* и *B. pendula* var. *carelica* (узорчатые и безузорчатые участки ствола) не обнаружено отличий в активности СОД и КАТ. При этом активность ПО и ПФО в узорчатых участках была значимо выше. Кажется логичным, что этому могла предшествовать высокая активность СОД, при участии которой активно образовывалась бы перекись водорода, однако этого не происходило. Возможно, причиной тому, единство буферной системы распределения кислорода, как субстрата реакций СОД и ПФО (Vaughn, Duke, 1984).

Интересными оказались результаты по флоэме, большая активность в ней СОД сопровождалась и более высокой активностью КАТ, по сравнению с таковыми в ксилеме. При этом, уже в безузорчатых участках ствола *B. pendula* var. *carelica*, активность ПФО была достоверно выше по сравнению с *B. pendula* var. *pendula*. Высокую активность ПО и ПФО в ксилеме узорчатых частей ствола и во флоэме узорчатых и безузорчатых частей ствола растений *B. pendula* var. *carelica* можно связать с высокой активностью здесь АПИнв (Галибина и др., 2019б), работа которой приводит к интенсивному образованию гексоз, что коррелирует с накоплением в паренхимных клетках узорчатых растений большего количества липидов, веществ фенольной природы (Барильская, 1978; Новицкая, 2008; Novitskaya, Kushnir, 2006), что и может объяснять здесь высокие значения активностей ПО и ПФО. Известно, что органы и ткани с высокой концентрацией гексоз проявляют синергизм в углеводном и фенольном обмене. Такое взаимодействие углеводного и фенольного обмена является частью взаимосвязанной окислительно-восстановительной системы, улавливающей АФК (Fotopoulos et al., 2003; Essmann et al., 2008).

Таким образом, повышение в стволе узорчатых растений активности ПФО, наряду с ПО, также можно рассматривать как биохимический индикатор образования структурных аномалий.

3.3. Участие ферментов АОС в формировании древесины

B. pendula var. *carelica* с разной степенью развития структурных аномалий

Активность ферментов АОС исследовали на деревьях *B. pendula* var. *carelica*, произрастающих на лесосеменной плантации и отличающихся высоким уровнем индивидуальной изменчивости по расположению и плотности рисунка на стволе. Отбирали высокоствольные узорчатые растения *B. pendula* var. *carelica* и растения, у которых признак узорчатости не проявился (безузорчатые растения). Все растения были поделены на четыре группы, каждой из которых был присвоен балл в зависимости от степени узорчатости от 0 до 3 (рис. 5). Отбор тканей проводили в период вторичного утолщения клеточных стенок. В условиях Карелии этот период приходится на конец июня – начало июля, в зависимости от погодных условий. В 2016 году растительный материал отбирали в последнюю неделю июня.

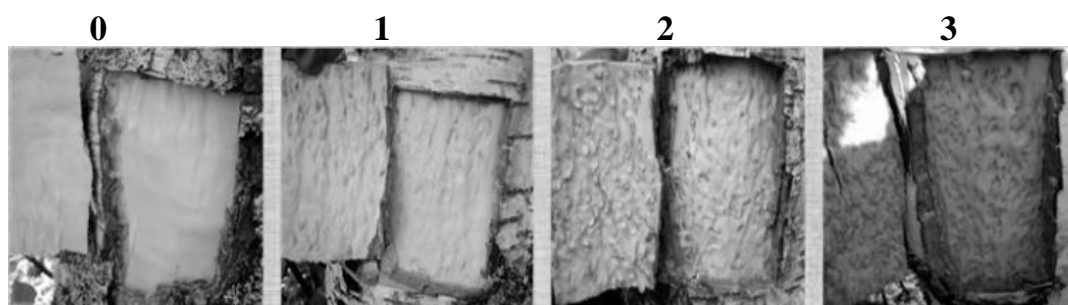


Рис. 5. Растения *B. pendula* var. *carelica* с разной степенью узорчатости древесины.

В ксилеме активность изучаемых ферментов у узорчатых растений, в целом, была выше, чем у безузорчатых. Кроме того, в ряду возрастания степени узорчатости значения активности СОД, КАТ, ПО и ПФО повышались (рис. 6).

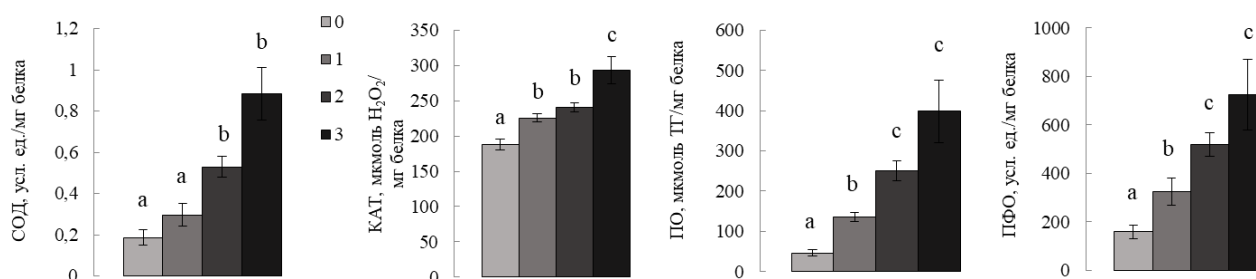


Рис. 6. Активность ферментов АОС в ксилеме у безузорчатых растений *B. pendula* var. *carelica* (0 баллов) (n=25) и с разной степенью узорчатости (от 1 до 3) (n(1)=19; n(2)=19; n(3)=7) в период активного камбиального роста.

Во флоэме активность СОД различалась только между безузорчатыми (1.8 усл. ед./мг белка) и узорчатыми (2.5 усл. ед./мг белка) растениями *B. pendula* var. *carelica* (без разделения по степени узорчатости), при этом активность КАТ у тех же групп достоверно не отличалась (334 и 379 мкмоль H₂O₂/мг белка у безузорчатых и узорчатых растений соответственно). Во флоэме активность ПО и ПФО была выше, чем в ксилеме. С увеличением степени узорчатости древесины активность ПО и ПФО возрастала. В ряду растений – 0, 1, 2 и 3 балла согласно степени узорчатости древесины – активность ПО составила 95, 581, 820 и 1382 мкмоль ТГ/мг белка, а активность ПФО – 429, 1168, 1547, 2438 усл. ед./мг белка соответственно.

Во время камбиального роста была обнаружена зависимость активности изучаемых ферментов АОС от степени узорчатости древесины. Ранговый коэффициент корреляции Спирмена показал, что в ксилеме в период интенсивного утолщения вторичных клеточных стенок активность изучаемых ферментов возрастает с увеличением степени узорчатости. Для СОД $r=0.82$; $p<0.0001$, для КАТ $r=0.81$; $p<0.0001$, для ПО $r=0.95$; $p<0.0001$, для ПФО $r=0.82$; $p<0.0001$. Кроме того, установлена сильная положительная корреляционная взаимосвязь активности изучаемых ферментов АОС между собой (табл. 1).

r	p	СОД	КАТ	ПО	ПФО
СОД			0.0246	0.0076	0.0181
КАТ	0.98			0.0160	0.0203
ПО	0.99	0.98			0.0023
ПФО	0.98	0.98	0.998		

Таблица 1. Результаты корреляционного анализа, отражающего взаимосвязь между изучаемыми ферментами в ксилеме в период интенсивного утолщения вторичных клеточных стенок. Указаны коэффициент корреляции r и уровень значимости p .

Приведенные результаты свидетельствуют о взаимосвязанной каскадной работе ферментов АОС при разных сценариях ксилогенеза у *B. pendula* var. *carelica*. В результате супероксиддисмутазной реакции происходит образование перекиси водорода, что в дальнейшем активизирует работу КАТ и ПО. Согласованная работа СОД, КАТ и ПО происходит за счет поддержания баланса между супероксидными радикалами и перекисью водорода (Mittler et al., 2004; Прадедова и др., 2011; Jajic et al., 2015). КАТ, ПО и ПФО связаны друг с другом посредством молекулярного кислорода, как продукта каталазной реакции, и фенолов, как субстратов для ПО и ПФО (Wang et al., 1991; Sheptovitsky, Brudvig, 1996). Более того, перекись водорода может являться сигнальной молекулой для запуска генов ПФО (Thipyarong et al., 2004). Хиноны, являясь продуктами реакции ПО и ПФО, образуют семихинонные радикалы, которые ковалентно присоединяются к другим молекулам и генерируют большое количество супероксидных радикалов, что обеспечивает взаимосвязь ПФО и СОД (Steffens et al., 1994; Thipyarong et al., 2004). АФК на определенном контролируемом уровне всегда присутствуют в клетках, участвуют во многих метаболических процессах, вовлечены в нормальную жизнедеятельность растительного организма, участвуют в сигнальных путях растения (Apel, Hirt, 2004; Mittler, 2017). Возникает вопрос: в чем же причина увеличения АФК, а следом и активности АОС при формировании узорчатой древесины?

Наши предыдущие исследования показали, что при формировании узорчатой древесины *B. pendula* var. *carelica* имеет место смена приоритетного направления утилизации сахарозы в ксилемных производных камбия. Образование нормальной по строению древесины *B. pendula* var. *pendula*, в составе которой преобладают сосуды и волокна, происходит на фоне высокой активности СС и сопровождается активным синтезом структурных компонентов клеточных стенок. В ряду растений от 0 до 3 баллов степени узорчатости уменьшается содержание целлюлозы (45,9 %, 41,2 %, 40,9 % и 35,9 % соответственно) (тест ранговой корреляции Спирмена $r=-0.83$; $p<0.0001$).

Дифференциация производных камбия у *B. pendula* var. *carelica* в зонах развития структурных аномалий происходит на фоне низкой активности СС (Галибина и др., 2015а; Галибина и др., 2016б; Мощенская и др., 2016, 2017). Избыток сахарозы выводится в апопласт и расщепляется с участием АпИнов. Возрастание активности АпИнов в камбиальной зоне можно рассматривать как компенсаторный

механизм, направленный на устранение избыточного содержания сахарозы, что важно для поддержания донорно-акцепторных отношений между тканями и органами древесного растения (Галибина и др., 2019б). В данном случае процессы, связанные с синтезом/распадом сахарозы и крахмала, начинают преобладать над синтезом структурных компонентов вторичных клеточных стенок. Такая направленность метаболизма характерна для клеток, сохраняющих живой протопласт. В данной связи следует отметить, что в местах формирования аномалий у *B. pendula* var. *carelica* вместо волокон и сосудов наблюдается активная дифференцировка клеток запасующей паренхимы. Уменьшение отношения активности СС/АпИInv коррелирует со степенью развития структурных аномалий в камбиальной зоне *B. pendula* (Галибина и др., 2015б; Галибина и др., 2016б; Галибина и др., 2019а).

Перекись водорода может играть роль той сигнальной молекулы, которая обеспечивает взаимосвязь ферментов АОС и АпИInv. Она регулирует уровень экспрессии *PR*-генов (Bi et al., 1995; Pellinen et al., 2002), кодирующих патоген-индуцируемые белки (*PR*-белки, от pathogenesis related, к ним относятся и ПО), которые управляют неспецифичной устойчивостью растений к действию различных факторов (Kinkema et al., 2000; Van Loon et al., 2006; Almagro et al., 2009). Как правило, повышение уровня экспрессии *PR*-генов рассматривают в связи с влиянием патогенов. На трансгенных растениях *Populus tremula* L. × *P. alba* L. показали, что у растений со сверхэкспрессией генов, кодирующих АпИInv, увеличивается уровень экспрессии *PR*-генов (Zhang et al., 2014).

Перекись водорода, наряду с другими АФК, может расходоваться на синтез лигнина (Oslon, Varner, 1993; Polle et al., 1994; Michalak, 2006; Ros-Barceló, Gómez Ros, 2009). Есть данные, что сверхэкспрессия гена СОД может приводить к активной лигнификации (Gill et al., 2010). Обнаруженная более высокая активность ПО и ПФО в узорчатых тканях может быть обусловлена активными процессами лигнификации. Высокоактивные хиноны, образующиеся в результате пероксидазных и полифенолоксидазных реакций, могут модифицировать и сшивать большое количество молекул с получением полимеров (Boudet et al., 2003; Passardi et al., 2004; Ros-Barceló et al., 2006; Ortega-Garcia, Peragon, 2009; Yang et al., 2010).

При определении содержания лигнина было отмечено, что у наиболее узорчатых 25-летних растений *B. pendula* var. *carelica* с баллом узорчатости 3 самая высокая активность СОД, ПО и ПФО сопровождалась более интенсивным синтезом лигнина по сравнению с безузорчатыми растениями. Содержание лигнина у безузорчатых растений составило 18.1 %, а у наиболее узорчатых растений – 19.8 %.

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

На основании данных исследований был предложен способ количественной экспресс-диагностики «узорчатости» древесины *B. pendula* var. *carelica* по определению активности гваякол-пероксидазы в ксилеме (Патент на полезную модель № 2596013, Галибина, Никерова, 2016).

3.4. Соотношение активностей ферментов АОС у сеянцев двух форм *V. pendula*

Известно, что ферменты АОС вовлечены в регуляцию метаболизма на протяжении всего онтогенеза растения (Жукова и др., 1996; Половникова, Воскресенская, 2008; Jakovljevic et al., 2013; Iqbal et al., 2017).

В этой связи возникает вопрос, как ведут себя изучаемые ферменты АОС, являющиеся во взрослом состоянии биохимическими маркерами структурных аномалий у *V. pendula*, в раннем онтогенезе? Сохраняются ли обнаруженные биохимические закономерности, когда внешних признаков еще нет? Для выяснения этих вопросов было проведено исследование активности ферментов АОС на начальных этапах онтогенеза у 1.5 и 3-4-месячных сеянцев *V. pendula* var. *pendula* и *V. pendula* var. *carelica*.

Изучение ферментов АОС на начальных этапах онтогенеза выявило отличия в распределении их активности между сеянцами разного возраста. Так, в стебле 1.5-месячных сеянцев у двух форм *V. pendula* активности СОД, КАТ, ПО и ПФО значимо не отличались. В стебле у 3-4-месячных сеянцев распределение активности ферментов АОС было аналогично тому, что наблюдали у взрослых растений, а именно: активности ПО и ПФО были выше у сеянцев *V. pendula* var. *carelica* (рис. 7).

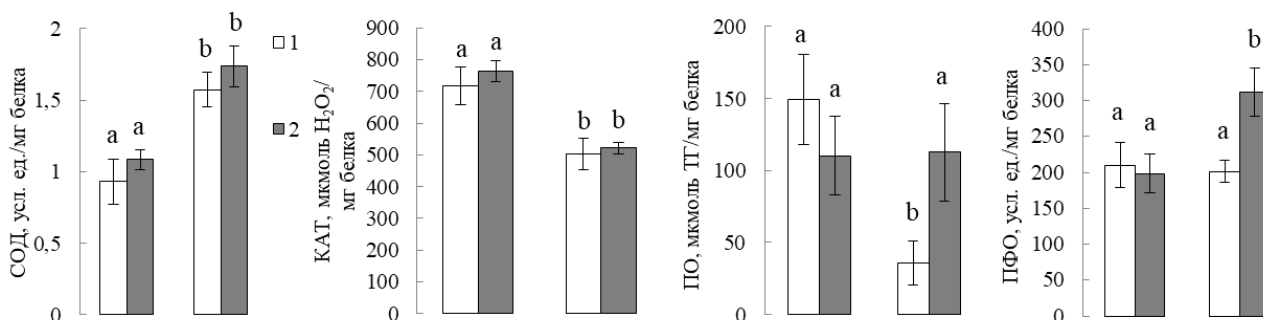


Рис. 7. Активность ферментов АОС в стебле у 1.5- и 3-4-месячных сеянцев *V. pendula* var. *pendula* (1) (n=12) и *V. pendula* var. *carelica* (2) (n=12).

При этом активность АпИньв, которая не отличалась у 1.5-месячных сеянцев обеих изучаемых форм (26 и 27 мкмоль распавшейся сахарозы/г сырой ткани у *V. pendula* var. *pendula* и *V. pendula* var. *carelica* соответственно), к возрасту 3-4 месяцев становится выше в стебле у сеянцев *V. pendula* var. *carelica* (20 и 34 мкмоль распавшейся сахарозы/г сырой ткани у *V. pendula* var. *pendula* и *V. pendula* var. *carelica* соответственно), что, вероятно, является причиной последующего повышения ПО и ПФО.

В листе активность ПО у 1.5-месячных сеянцев выше, чем у сеянцев *V. pendula* var. *carelica* того же возраста (65 и 33 мкмоль ТГ/мг белка соответственно). К возрасту 3-4 месяцев значимых отличий обнаружено не было. Отмечено, что у сеянцев двух форм *V. pendula* соотношение листьев разных размеров не одинаково, в связи с чем, было изучено изменение активности ферментов АОС в зависимости от размера листа.

3.5. Активность ферментов АОС в листовом аппарате как возможный индикатор ранней диагностики образования узорчатой древесины

У 10-месячных семян *B. pendula* var. *pendula* и *B. pendula* var. *carelica* проведено исследование активности перекись-расщепляющих ферментов (КАТ и ПО) в листьях, разделенных на стадии (I-IV), в зависимости от длины листовой пластинки (см. методы). Все исследуемые листья находились во внепочечном периоде развития, имели форму, характерную для взрослого растения, но отличались размерами.

В результате проведенных измерений установлено, что у обеих изучаемых форм *B. pendula* активность КАТ в листьях значительно возрастала при переходе от I к IV стадии, то есть с увеличением длины листовой пластинки: у семян *B. pendula* var. *pendula* $r=0.83$ ($p=0.00012$), у семян *B. pendula* var. *carelica* $r=0.92$ ($p<0.0001$) (рис. 8А).

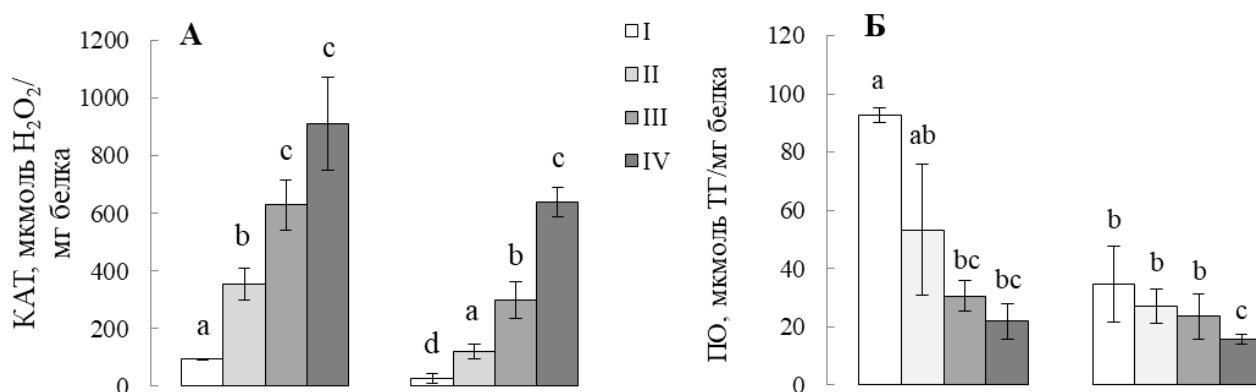


Рис. 8. Активность КАТ (А) и ПО (Б) в листьях, отличающихся стадией развития (I-IV) ($n(I)=5$; $n(II)=8$; $n(III)=8$; $n(IV)=6$), у 10-месячных семян *B. pendula* var. *pendula* *B. pendula* var. *carelica*.

Сравнительный анализ полученных результатов позволил установить, что активность КАТ в листьях *B. pendula* var. *pendula* на всех стадиях, кроме IV, была значимо выше, чем у семян *B. pendula* var. *carelica*. При этом увеличение каталазной активности в листе при переходе от I к IV стадии у семян *B. pendula* var. *carelica* происходило более динамично.

Активность ПО в листьях у обеих форм *B. pendula* убывала с увеличением длины листовой пластинки: у семян *B. pendula* var. *pendula* $r=-0.56$ ($p=0.015$), у семян *B. pendula* var. *carelica* $r=-0.45$ ($p=0.044$). Активность ПО в листьях *B. pendula* var. *pendula* была значимо выше, чем у семян *B. pendula* var. *carelica* только на I стадии. Уменьшение пероксидазной активности в листе при переходе от I к IV стадии более динамично происходило у семян *B. pendula* var. *pendula* (рис. 8Б).

Таким образом, *B. pendula* var. *pendula* и *B. pendula* var. *carelica* на начальных стадиях онтогенеза различаются по активности ферментов АОС (ПО и ПФО в стебле, КАТ в листе). Данные закономерности могут лечь в основу ферментативной диагностики признака узорчатости древесины у *B. pendula* в раннем онтогенезе, когда внешние признаки отсутствуют. Высказано предположение, что лист может использоваться как орган первичной диагностики для выявления предрасположенности к возникновению структурных аномалий у *B. pendula*. Однако особенно стоит обратить внимание на то, что сравнивать активность ферментов в листовом аппарате представляется возможным только, когда лист находится на одной стадии развития.

3.6. Участие ферментов АОС в формировании косослойной древесины у *P. sylvestris*

Понимание процессов ксилогенеза необходимо как с научной, так и с практической точки зрения. Узорчатость – это лишь частный случай аномального ксилогенеза у древесных растений. Чтобы понять, могут ли обнаруженные закономерности в изменении активности ферментов АОС иметь диагностическое значение для других древесных пород, было проведено исследование активности комплекса ферментов АОС при формировании косослойной древесины у *P. sylvestris*.

В ксилеме активность СОД значительно не отличалась у прямослойных и косослойных растений *P. sylvestris*. Активность основных ферментов фенольного метаболизма (ПО и ПФО) была выше у растений, которые проявляли признаки косослойной древесины (рис. 9). Во флоэме только ПФО была значимо выше у растений с признаками структурных аномалий в 1.6 раза по сравнению с прямослойными растениями: значения составили 39 и 64 усл. ед.*1000/мг белка соответственно.

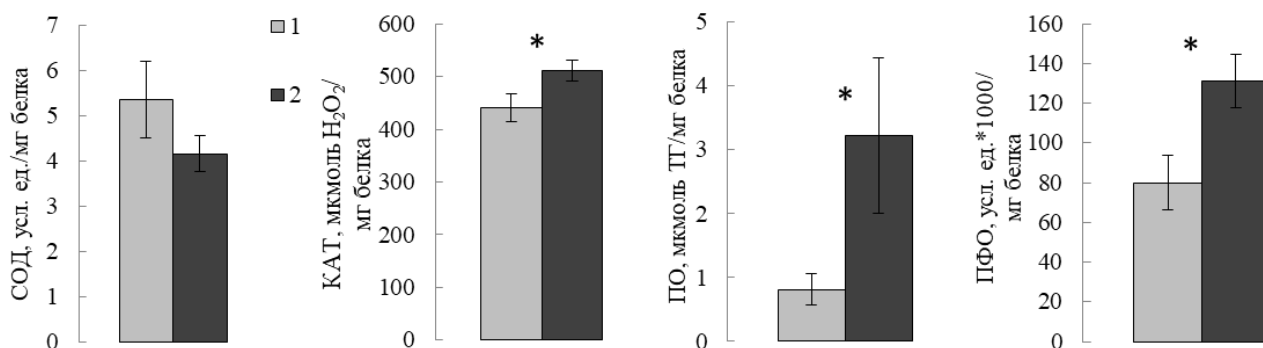


Рис. 9. Активность ферментов АОС в ксилеме у растений *P. sylvestris* с прямослойной (1) (n=30) и косослойной (2) (n=35) древесиной.

Отметим, что прямослойные деревья имели среднюю ширину годичного кольца (0.65 мм за 10 лет) больше, чем деревья с выраженным косослоем (0.38 мм за 10 лет), что говорит о большем приросте.

Исследования ферментов, утилизирующих сахарозу (СС и АпИнов), позволили обнаружить некоторые отличия в их активности у деревьев с прямослойной древесиной и наличием косослоя. У растений с признаками косослоя в ксилеме активность СС (52 мкмоль сахарозы/мг белка) ниже по сравнению с таковой у растений с прямослойной древесиной (94 мкмоль сахарозы/мг белка), что говорит об уменьшении роли СС в утилизации сахарозы. При этом у косослойных растений наблюдается более высокая метаболизация сахарозы в апопласте: активность АпИнов 0.9 против 0.4 мкмоль распавшейся сахарозы/г сырой ткани у прямослойных растений. Возрастание метаболизации сахарозы в апопласте при формировании косослойной древесины *P. sylvestris* и возрастание активностей ПО и ПФО схоже с таковым при формировании узорчатой древесины *B. pendula* var. *carelica*. Можно предположить, что альтернативный путь метаболизации сахарозы, являющийся индикатором аномального ксилогенеза у растений *B. pendula* var. *carelica* и влекущий за собой перестройку работы ферментов АОС, присутствует и у *P. sylvestris* при образовании косослойной древесины.

Между сосной и березой выявлены некоторые отличия в работе ферментов АОС в тканях ствола. Во-первых, у *P. sylvestris* наблюдается более высокая активность СОД как в ксилеме (4.2-5.4 против 0.19-0.89 усл. ед./мг белка соответственно у сосны и березы), так и во флоэме (5.2-5.7 против 1.8-2.8 усл. ед./мг белка соответственно у сосны и березы). Вероятно, высокая активность СОД, приводящая к образованию большего количества перекиси водорода, является причиной большей активности КАТ у *P. sylvestris* по сравнению с *B. pendula* (в ксилеме 441-512 против 188-293 мкмоль H_2O_2 /мг белка; во флоэме 639-672 против 334-368 мкмоль H_2O_2 /мг белка соответственно у сосны и березы). Активность ПО у *P. sylvestris*, по сравнению с *B. pendula*, в сотни раз меньше: как во флоэме (45-46 против 95-1382 мкмоль ТГ/мг белка соответственно у сосны и березы), так и в ксилеме (0.8-3.2 против 46-398 мкмоль ТГ/мг белка соответственно у сосны и березы). Нейтрализация основного пула перекиси водорода КАТ – это второе отличие сосны от березы. Поскольку ПО могут нейтрализовывать перекись, недоступную для КАТ, – константа Михаэлиса у КАТ намного более высокая, чем у ПО (Mittler, Zilinskas, 1991; Creissen et al., 1994; König et al., 2002), можно предположить, что меньшая активность КАТ в тканях узорчатых растений *B. pendula* (раздел 3.2., 3.3.) является следствием более низкого у них содержания перекиси водорода.

Еще одна отличительная особенность тканей ствола у *P. sylvestris* – это высокая активность ПФО, значения ее превосходят таковую у *B. pendula* в сотни раз (в ксилеме 80-131 усл. ед.*1000/мг белка против 158-724 усл. ед./мг белка соответственно, во флоэме 39-64 усл. ед.*1000/мг белка против 428-2438 усл. ед./мг белка соответственно). Высокая активность ПФО может быть связана, с одной стороны, с накоплением АФК (Thipyarong et al., 2004; Mayer, 2006) и изменением окислительно-восстановительного статуса (Webb et al., 2014). Известно, что ПФО может участвовать в буферном распределении кислорода (Vaughn, Duke, 1984). С другой стороны, высокая активность фермента может быть связана с увеличением субстратов фенольной природы, таких, как кофейная кислота и ее производные; производные пирокатехина или дигидроксифенилаланина; галловая кислота и др. (Constabel et al., 1996; Guyot et al., 1996; Shin et al. 1997; Jimenez, Garcia-Carmona, 1999; Li, Steffens, 2002; Melo et al., 2006; Wuys et al., 2006). Накопление этих компонентов обычно наблюдается при формировании ядровой древесины, некоторые из них, такие, как хлорогеновая кислота, являются предшественниками лигнина (Humphreys, Chapple, 2002). Вероятно, высокая активность ПФО может свидетельствовать об интенсивных процессах образования ядровой древесины у *P. sylvestris*. Кроме того, содержание лигнина у *P. sylvestris*, составившее, в среднем, 24 % (отличий между прямослойной и косослойной древесиной не обнаружено), превышает таковое у *B. pendula* var. *carelica* (18.7 % в среднем). Вероятно, этому способствуют реакции, запускаемые более высокой активностью СОД, которая участвует в процессе генерации перекиси водорода и последующей лигнификации (Karpinska et al., 2001).

Таким образом, метаболические закономерности, обнаруженные при исследовании комплекса ферментов АОС при формировании косослойной древесины, не противоречат тем, что были обнаружены при формировании структурных аномалий у *B. pendula* var. *carelica*. Повышение активности КАТ, ПО и ПФО в ксилеме и ПФО во флоэме при образовании косослойной древесины может служить биохимическим маркером развития данного вида структурных аномалий.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное исследование позволило выявить закономерности в изменении активности ферментов АОС при разных сценариях ксилогенеза у древесных растений. Объектами исследования были две формы *B. pendula* – var. *pendula*, у которой формируется типичная для вида прямослойная древесина, и var. *carelica*, у которой в пределах одного дерева, наряду с формированием нормальной по строению древесины, происходит образование узорчатой древесины.

Показано, что у взрослых растений изучаемых форм различается путь утилизации перекиси водорода: у растений *B. pendula* var. *pendula* выше активность КАТ, а у растений с проявившимися признаками структурных аномалий – выше активность ПО. Вероятно, более низкое содержание перекиси водорода в тканях узорчатых растений может быть причиной меньшей у них активности КАТ, у которой сродство к перекиси водорода ниже, чем у ПО. Выявленные между двумя формами *B. pendula* отличия в утилизации перекиси водорода наблюдаются и в пределах одного дерева *B. pendula* var. *carelica*: в безузорчатых участках ствола наблюдается тенденция на повышение активности КАТ, в узорчатых участках того же ствола – выше активность ПО.

Исследования комплекса ферментов АОС, проведенные в период активного камбиального роста, показали, что увеличение степени узорчатости древесины у *B. pendula* var. *carelica* коррелирует с возрастанием активности СОД, КАТ, ПО и ПФО. Между изученными ферментами выявлена высокая степень корреляции, что свидетельствует о взаимосвязанной каскадной работе ферментов АОС при изменении сценария ксилогенеза. Высказано предположение, что причиной увеличения активности ферментов АОС является преобладание в узорчатых участках апопластного пути метаболизации сахарозы. Образующиеся в результате него гексозы через гликолиз, пентозофосфатный путь, шикиматный путь используются для синтеза запасных компонентов, в том числе фенольной природы, которые, в свою очередь, могут быть субстратами ПО и ПФО.

Важным результатом проведенного исследования является обнаружение выявленных во взрослом состоянии закономерностей в раннем онтогенезе. Уже в возрасте нескольких месяцев, когда видимые признаки узорчатости древесины отсутствуют, в стебле сеянцев *B. pendula* var. *carelica* наблюдались более высокие активности ПО и ПФО, по сравнению с таковыми у *B. pendula* var. *pendula*. Показано, что активность изучаемых ферментов АОС в листе у сеянцев может иметь диагностическое значение. Предложено рассматривать лист в качестве органа ранней диагностики структурных аномалий.

Результаты, полученные в ходе изучения *B. pendula* var. *carelica*, использовали в качестве фундаментальной основы для выявления механизмов развития структурных аномалий осевых органов у *P. sylvestris*. Исследование активности ферментов АОС при образовании косослойной древесины у *P. sylvestris* показало, что возрастание активности ПО и ПФО, на фоне увеличения метаболизации сахарозы в апопласте, схоже с таковым при формировании узорчатой древесины *B. pendula* var. *carelica*.

Таким образом, формирование структурных аномалий древесины тесно сопряжено с процессами вторичного метаболизма у древесного растения, что отражается в изменении активности ферментов АОС. Полученные данные показали возможность использовать ферменты АОС в качестве биохимических маркеров разных сценариев ксилогенеза.

ВЫВОДЫ

1. У растений *B. pendula* var. *carelica* в местах формирования структурных аномалий в течение всего сезона выше активность пероксидазы и ниже активность каталазы, по сравнению с таковой у растений *B. pendula* var. *pendula*.
2. Активность пероксидазы и полифенолоксидазы, участвующих в метаболизации фенольных компонентов, в 3.7 и 2.3 раза соответственно выше в зонах формирования узорчатой древесины (высокое содержание паренхимных клеток), по сравнению с зонами формирования нормальной по строению древесины (структурную основу составляют сосуды и волокна).
3. В период камбиального роста активность супероксиддисмутазы, каталазы, пероксидазы и полифенолоксидазы коррелирует с возрастанием степени узорчатости древесины, что позволяет считать ферменты АОС биохимическими маркерами структурных аномалий ствола.
4. Активность ферментов АОС в стебле имеет диагностическое значение для обнаружения аномального ксилогенеза у *B. pendula* var. *carelica* уже на самых ранних этапах онтогенеза.
5. Лист на определенных стадиях развития может рассматриваться как орган первичной диагностики формирования узорчатой древесины у *B. pendula*.
6. При формировании косослойной древесины у *P. sylvestris* наблюдаются те же закономерности, что и при формировании узорчатой древесины *B. pendula* var. *carelica*, – возрастание активности пероксидазы и полифенолоксидазы на фоне увеличения метаболизации сахарозы в апопласте.

СПИСОК ОСНОВНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК РФ:

1. Галибина Н. А., Новицкая Л. Л., **Никерова К. М.** Избыток экзогенных нитратов подавляет формирование аномальной древесины у карельской березы // Онтогенез. 2016. Т. 47. № 2. С. 83-91 (Web of Science, Scopus).
Galibina N. A., Novitskaya L. L., **Nikerova K. M.** Excess of exogenous nitrates inhibits formation of abnormal wood in the Karelian birch // Russian journal of developmental biology. 2016. V. 47. № 2. P. 69-76.
2. Галибина Н. А., Новицкая Л. Л., **Никерова К. М.**, Мощенская Ю. Л., Бородина М. Н., Софронова И. Н. Регуляция активности апопластной инвертазы в камбиальной зоне карельской березы // Онтогенез. 2019. Т. 50. № 2. С. 53-64 (Web of Science, Scopus).
Galibina N. A., Novitskaya L. L., **Nikerova K. M.**, et al. Apoplastic Invertase Activity Regulation in the Cambial Zone of Karelian Birch // Russian journal of developmental biology. 2019. V. 50. № 1. P. 20-29.
3. Мощенская Ю. Л., Галибина Н. А., Новицкая Л. Л., **Никерова К. М.** Роль сахарозосинтазы в акцепторных органах древесных растений // Физиология растений. 2019. Т. 66. № 1. С. 13-25 (Web of Science и Scopus).
Moshchenskaya Yu L., Galibina N. A., Novitskaya L. L., **Nikerova K. M.** The Role of Sucrose Synthase in Sink Organs of Woody Plants // Russian journal of plant physiology. 2019. V. 66. № 1. P. 10-21.
4. Галибина Н. А., Новицкая Л. Л., **Никерова К. М.** Донорно-акцепторные отношения органов и тканей березы повислой при альтернативных сценариях ксилогенеза // Физиология растений. 2019. Т. 66. № 2. С. 128-136 (Web of Science, Scopus).
Galibina N. A., Novitskaya L. L., **Nikerova K. M.** Source-Sink Relations in the Organs and Tissues of Silver Birch during Different Scenarios of Xylogenesis // Russian journal of plant physiology. 2019. V. 66. № 2. P. 308-315.
5. **Никерова К. М.**, Галибина Н. А., Мощенская Ю. Л., Новицкая Л. Л., Подгорная М. Н., Софронова И. Н. Участие каталазы и пероксидазы в процессах ксилогенеза у карельской березы // Лесоведение. 2019. № 2. С. 115-127 (Scopus).

6. Galibina N. A., Novitskaya L. L., **Nikerova K. M.**, et al. Labile nitrogen availability in soil influences the expression of wood pattern in Karelian birch // Ботанический журнал. 2019. Т. 104. № 10. С. 1598-1609 (Scopus).
7. Novitskaya Ludmila L., Tarelkina Tatiana V., Galibina Natalia A.; et al. ... **Nikerova Kseniya M.** The Formation of Structural Abnormalities in Karelian Birch Wood is Associated with Auxin Inactivation and Disrupted Basipetal Auxin Transport // Journal of plant growth regulation. 2020. V. 39. № 1. P. 378-394 (Web of Science, Scopus).
8. Галибина Н. А., Целищева Ю. Л., Андреев В. П., Софронова И. Н., **Никерова К. М.** Активность пероксидазы в органах и тканях деревьев березы повислой // Ученые записки ПетрГУ. № 4 (133). Серия: Естественные и технические науки. 2013. С. 7-13.
9. Новицкая Л. Л., Галибина Н. А., **Никерова К. М.** Транспорт и запасание сахаров во флоэме *Betula pendula* Roth var. *pendula* и var. *carelica* // Труды КарНЦ РАН. No 11. Сер. Экспериментальная биология. 2015. С. 35-47.
10. Галибина Н. А., Мошкина Е. В., **Никерова К. М.**, Мощенская Ю. Л., Знаменский С. Р. Активность пероксидазы как индикатор степени узорчатости древесины карельской березы // Лесоведение. 2016. № 4. С. 294-304.
11. Мощенская Ю. Л., Галибина Н. А., Новицкая Л. Л., **Никерова К. М.**, Подгорная М. Н., Софронова И. Н. Активность ферментов диссимиляции сахарозы в раннем онтогенезе разных форм березы повислой // Труды КарНЦ РАН. No 11. Сер. Экспериментальная биология. 2016. С. 78-87.
12. **Никерова К. М.**, Галибина Н. А., Мощенская Ю. Л., Новицкая Л. Л., Подгорная М. Н., Софронова И. Н. Каталазная активность в листовом аппарате у сеянцев березы повислой разных форм (*Betula pendula* Roth): var. *pendula* и var. *carelica* (Mercklin) // Труды КарНЦ РАН. No 11. Сер. Экспериментальная биология. 2016. С. 68-77.
13. **Никерова К. М.**, Галибина Н. А. Влияние нитратного азота на пероксидазную активность в тканях *Betula pendula* Roth var. *pendula* и *B. pendula* var. *carelica* (Mercklin) // Сибирский лесной журнал. 2017. № 1. С. 15-24.
14. **Никерова К. М.**, Галибина Н. А., Мощенская Ю. Л., Новицкая Л. Л., Подгорная М. Н., Софронова И. Н. Ферменты антиоксидантной системы – индикаторы разных сценариев ксилогенеза: в раннем онтогенезе и во взрослом состоянии (на примере *Betula pendula* Roth) // Труды КарНЦ РАН. No 6. Сер. Экспериментальная биология. 2018. С. 68-80.
15. **Никерова К. М.**, Галибина Н. А., Мощенская Ю. Л., Новицкая Л. Л., Бородина М. Н., Софронова И. Н. Окисление кверцетина пероксидазой карельской березы // Труды КарНЦ РАН. No 12. Сер. Экспериментальная биология. 2018. С. 65-75.
16. **Никерова К. М.**, Галибина Н. А., Мощенская Ю. Л., Бородина М. Н., Софронова И. Н. Определение активности супероксиддисмутазы и полифенолоксидазы в древесине *Betula pendula* var. *carelica* (*Betulaceae*) при разной степени нарушения ксилогенеза // Растительные ресурсы. 2019. Т. 55. № 2. С. 213-230.

Патенты

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

Другие публикации

1. **Никерова К. М.**, Галибина Н. А. Влияние экзогенного нитрата на активность пероксидазы карельской березы. Биология - наука XXI века: 18-я Междунар. Пущинская школа-конф. молодых ученых (Пущино, 21-25 апреля 2014 г.). Сб. тезисов. Пущино. 2014. С. 393-394.
2. **Никерова К. М.**, Галибина Н. А. Окисление кверцетина пероксидазой карельской березы. Материалы докладов 9-го международного симпозиума. Фенольные соединения: фундаментальные и прикладные аспекты. М. 2015. С. 386-390.
3. **Никерова К. М.**, Галибина Н. А. Изменение пероксидазной активности у карельской березы в зависимости от степени насыщенности текстуры древесины. Растения в условиях глобальных и локальных природно-климатических и антропогенных

- воздействий: Тез. докл. Всерос. науч. конф. с международным участием и школы для мол. ученых (21-26 сент. 2015 г.). Петрозаводск: Карельский научный центр РАН. 2015. С. 378.
4. **Никерова К. М.**, Галибина Н. А. Донорно-акцепторные отношения листового аппарата и тканей ствола у разных форм березы повислой (*Betula pendula* Roth): var. *pendula* и var. *carelica* (Mercklin). Годичное собрание общества физиологов растений России. Сигнальные системы растений: от рецептора до ответной реакции организма. 21–24 июня 2016, С.-Петербург, Россия / Медведев С.С. Изд-во Санкт-Петербургского государственного университета, 2016. – С. 241-242.
 5. **Никерова К. М.**, Галибина Н. А., Новицкая Л. Л., Мощенская Ю. Л. Гваякол-пероксидаза карельской березы как компонент сигнальной системы во взаимоотношениях почва-растение. IV Российский симпозиум с международным участием «Фитоиммунитет и клеточная сигнализация у растений». Казань, 2016. С. 107-108.
 6. **Никерова К. М.**, Галибина Н. А., Мощенская Ю. Л., Новицкая Л. Л. Ферменты антиоксидантной системы в разных сценариях ксилогенеза. Материалы II Международного симпозиума «Молекулярные аспекты редокс-метаболизма растений» и Международной научной школы «Роль активных форм кислорода в жизни растений» (Уфа, 26 июня – 1 июля 2017 г.) / ред. И.В. Максимов и др. Уфа: ООО «Первая типография», 2017. С. 188-191.
 7. **Никерова К. М.**, Галибина Н. А., Синькевич С. М., Мощенская Ю. Л., Подгорная М. Н., Софронова И. Н. Биохимические аспекты формирования косослойной древесины у сосны обыкновенной. Тезисы докладов Всероссийской научной конференции с международным участием, посвященной 60-летию Института леса Карельского научного центра РАН (Петрозаводск, 11-15 сентября 2017 года). Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 2017. С. 200-201.
 8. **Никерова К. М.**, Галибина Н. А., Мощенская Ю. Л., Новицкая Л. Л. Древесные растения, произрастающие на разных по уровню плодородия почвах, отличаются по активности ферментов АОС. Сборник материалов докладов Годичного собрания Общества физиологов растений России Научной конференции и школы для молодых ученых «Экспериментальная биология растений: фундаментальные и прикладные аспекты», 18-24 сентября 2017 г., Крым, Судак. – Москва, 2017. С. 242.
 9. **Никерова К. М.**, Галибина Н. А. Мощенская Ю. Л., Новицкая Л. Л., Подгорная М. Н., Софронова И. Н. Активность пероксидазы и полифенолоксидазы повышается при альтернативном сценарии ксилогенеза. Фенольные соединения: функциональная роль в растениях: сборник научных статей по материалам X Международного симпозиума «Фенольные соединения: фундаментальные и прикладные аспекты», Москва, 14-19 мая 2018 г. / отв. ред. Н. В. Загоскина – М.: ИФР РАН, – 2018. С. 300-305.
 10. **Никерова К.М.**, Галибина Н. А., Мощенская Ю. Л., Новицкая Л. Л., Подгорная М. Н., Софронова И. Н. Изменение активности ферментов АОС – биохимический индикатор сценария ксилогенеза при разном соотношении подвижных форм азота и фосфора в почве. Сборник материалов докладов Годичного собрания Общества физиологов растений России Всероссийской научной конференции с международным участием и школы молодых ученых «Механизмы устойчивости растений и микроорганизмов к неблагоприятным условиям среды», 10-15 июля 2018 г., Иркутск. С. 549-553.
 11. **Kseniya Nikerova**, Natalya Galibina, Julia Moschenskaya, Ludmila Novitskya, Marina Borodina, Irina Sofronova. The increase in the activity of AOS enzymes is an indicator of abnormal growth of woody plants, which differ in the heartwood/sapwood ratio. 10th International Conference «Photosynthesis and Hydrogen Energy Research for Sustainability-2019» in honor of Kimiyuki Satoh, Tingyun Kuang, Cesare Marchetti, and Anthony Larkum Eds. Suleyman Allakhverdiev, Ilya Naydov. Saint Petersburg, Russia, 2019, P. 80.
 12. **Никерова К. М.**, Галибина Н. А., Мощенская Ю. Л., Новицкая Л. Л., Бородин М. Н., Софронова И. Н. Биохимические закономерности аномального ксилогенеза карельской березы. IX Съезд физиологов растений России «Физиология растений – основа создания растений будущего». Казань, 19-21 сентября 2019г. 2019. С. 311.