

МЕХАНИЗМЫ НОРМАЛЬНОГО И ПАТОЛОГИЧЕСКОГО РАЗВИТИЯ ТКАНЕЙ

УДК 581.143.32:581.198:582.632.1

ИЗБЫТОК ЭКЗОГЕННЫХ НИТРАТОВ ПОДАВЛЯЕТ ФОРМИРОВАНИЕ АНОМАЛЬНОЙ ДРЕВЕСИНЫ У КАРЕЛЬСКОЙ БЕРЕЗЫ

© 2016 г. Н. А. Галибина, Л. Л. Новицкая, К. М. Никерова

Институт леса Карельского научного центра Российской академии наук
185910 Республика Карелия, Петрозаводск, Пушкинская ул., д. 11

E-mail: galibina@krc.karelia.ru

Поступила в редакцию 30.08.2015 г.

Окончательный вариант получен 05.11.2015 г.

Изучали влияние экзогенного нитрата на активность ферментов метаболизации сахарозы – сахарозосинтазы (СС) и апопластной инвертазы (АпИнв), в ксилеме и флоэме обычной березы повислой (*Betula pendula* Roth var. *pendula*) и карельской березы (*B. pendula* var. *carelica*), имеющей широкую известность благодаря аномальной (узорчатой) древесине. Показано, что в период камбиального роста между активностью ферментов и отклонениями от нормального роста и развития проводящих тканей ствола существует стойкая взаимосвязь. Образование обычной по строению древесины березы связано с высокой активностью СС. Продуктом реакции в данном случае является УДФ-глюкоза, которая используется в основном на синтез компонентов клеточных стенок сосудов и волокнистых трахеид. У карельской березы активность СС в зоне формирования ксилемы снижена, что согласуется с более высоким уровнем сахарозы в ткани. Избыток сахарозы выводится в апопласт, где расщепляется апопластной инвертазой. Образующиеся при этом гексозы индуцируют реакции запасного метаболизма, что ведет к увеличению количества запасных веществ и повышению в ксилеме доли клеток запасующей паренхимы. В результате в древесине карельской березы появляются крупные включения паренхимы, которые придают ей характерный узор. Изменение соотношения активностей СС и АпИнв лежит в основе большого разнообразия растений карельской березы по степени узорчатости древесины. У обычной березы действие нитратов усиливало использование сахарозы через сахарозосинтазный путь ее метаболизации, результатом чего было увеличение прироста древесины. В ксилеме карельской березы нитраты привели к снижению активности как СС (уменьшение прироста древесины), так и АпИнв (уменьшение количества паренхимы, т.е. нормализация строения древесины). Снижение метаболизации сахарозы в ксилеме происходило на фоне увеличения ее использования во флоэме, где возросла активность обоих ферментов. Выдвинуто предположение, что ограничение ареала карельской березы со стороны плодородных почв может быть обусловлено смещением зоны интенсивного апопластного усвоения сахарозы в сторону флоэмы под влиянием высоких доз азотного питания.

Ключевые слова: карельская береза, аномальный ксилогенез, сахарозосинтаза, апопластная инвертаза, влияние нитратов.

DOI: 10.7868/S047514501602004X

ВВЕДЕНИЕ

Карельская береза (*Betula pendula* Roth var. *carelica*) является формой березы повислой, у которой в результате отклонений в деятельности камбия формируется аномальная по строению (узорчатая) древесина. В период камбиального роста в зонах структурных аномалий производные камбия карельской березы не дифференцируются в ситовидные трубки флоэмы и сосуды и волокнистые трахеиды ксилемы, а превращаются в клетки запасующей паренхимы, которые накапливают большие количества липидов и таннинов (Novitskaya, Kushnir, 2006). Нарушение дифференцировки проводящих элементов ксилемы и флоэмы выражается в

появлении крупных скоплений паренхимных клеток, образующих на спилах древесины характерный узор. По сравнению с другими древесными породами, структурные аномалии тканей ствола у карельской березы выражены наиболее ярко, характеризуются большим разнообразием проявления в онтогенезе и высоким уровнем эндогенной изменчивости (Новицкая, 2008), благодаря чему она представляет собой уникальный объект исследования для познания механизмов морфогенеза древесных растений.

Исследование цитологических особенностей проводящей флоэмы карельской березы показало, что формирование структурных аномалий тканей ствола у этого древесного растения связано с из-

бытком сахарозы в проводящей флоэме и камбиальной зоне (Новицкая, 1997, 2008, Novitskaya, Kushnir, 2006). Сравнительное изучение активности метаболизирующих сахарозу ферментов в ксилеме и флоэме карельской березы и обычной березы повислой (*B. pendula* var. *pendula*) в период камбиального роста позволило впервые выявить метаболические причины, приводящие к формированию узорчатой древесины (Галибина и др., 2015а, 2015б). Показано, что при нормальном строении тканей ствола (обычная береза), ростовые процессы сосредоточены главным образом в формирующейся ксилеме. Причем аттрагирующая сила ксилемы создается за счет высокой активности сахарозосинтазы (СС) – фермента, расщепляющего сахарозу на УДФ-глюкозу и фруктозу. Это согласуется с известными данными о роли сахарозосинтазы в формировании клеточных стенок, а именно, что форма сахарозосинтазы, связанная с плазмалеммой, входит в состав целлюлозосинтазного комплекса и поставляет УДФ-глюкозу на синтез целлюлозы (Amor et al., 1995; Ruan et al., 2003; Song et al., 2010 и др.). У карельской березы активность СС в зоне формирования ксилемы снижена (Галибина и др., 2015а). Следствием этого становится избыточное накопление сахарозы в клетках и выход ее в апопласт, где она активно расщепляется апопластной инвертазой (АпИнв) с образованием глюкозы и фруктозы (Галибина и др., 2015б). Гексозы усиливают синтез запасных метаболитов, что способствует превращению камбиальных производных в клетки запасающей паренхимы, которые составляют структурную основу узорчатой древесины (Новицкая, 2008).

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

К настоящему времени накоплено достаточно много данных о влиянии азотного питания на углеводный обмен растений (Баташева, 2006; Chikov et al., 2003; Chikov, Bakirova, 2004; Gordon et al., 1999, 2002 и др.) На растениях сахарной свеклы (Люленова, 2007) и гороха посевного (Брускова и др., 2009; Никитин и др., 2010) показано, что внесение в почву нитратов усиливает активность СС.

Мы поставили эксперимент с целью исследовать влияние экзогенного нитрата на метаболизацию сахарозы в стволе обычной и карельской березы в период камбиального роста. В настоящей работе приведены данные по активности сахарозосинтазы и апопластной инвертазы в тканях ствола растений, подвергшихся обработке нитратами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА

Растительный материал

Объектами исследования были 6-летние деревья обычной березы повислой (*Betula pendula* Roth var. *pendula*) с нормальным строением тканей ствола и карельской березы (*B. pendula* var. *carelica*) с проявившимися признаками структурных аномалий. Все растения произрастали в одинаковых почвенно-климатических условиях на Агробиологической станции Карельского научного центра РАН в 2 км от Петрозаводска (61°45' с.ш., 34°20' в.д.).

Растения карельской березы были разделены на группы по степени проявления узорчатости древесины, согласно способу, предложенному В.И. Ермаковым (1986). Метод основан на корреляции между количеством углублений на обнаженной поверхности древесины и степенью ее узорчатости. На стволе дерева вырезали участок коры 2 × 4 см с более длинной стороной вдоль ствола. На обнаженной поверхности древесины подсчитывали число углублений, затем делали их пересчет на 1 см². К первой группе отнесли растения, имеющие 1–3 углубления на 1 см² (редкий рисунок – 1 балл) (рис. 1б), во вторую группу попали растения с 4–6 углублениями на 1 см² (плотный рисунок – 2 балла) (рис. 1в) и в третьей группе были растения с 7 и более углублениями на 1 см² (очень плотный рисунок – 3 балла) (рис. 1с). Для сравнения использовали растения обычной березы (прямослойная древесина – 0 баллов) (рис. 1а).

Внесение экзогенного нитрата

Эксперимент проводили в период активного камбиального роста (2–4 июля 2012 года).

Растения разделили на две группы: 1) опытные, подвергшиеся обработке нитратом калия (KNO₃), и 2) контрольные, без внесения нитратов. Под опытные растения вносили по 20 л 50 мМ раствора

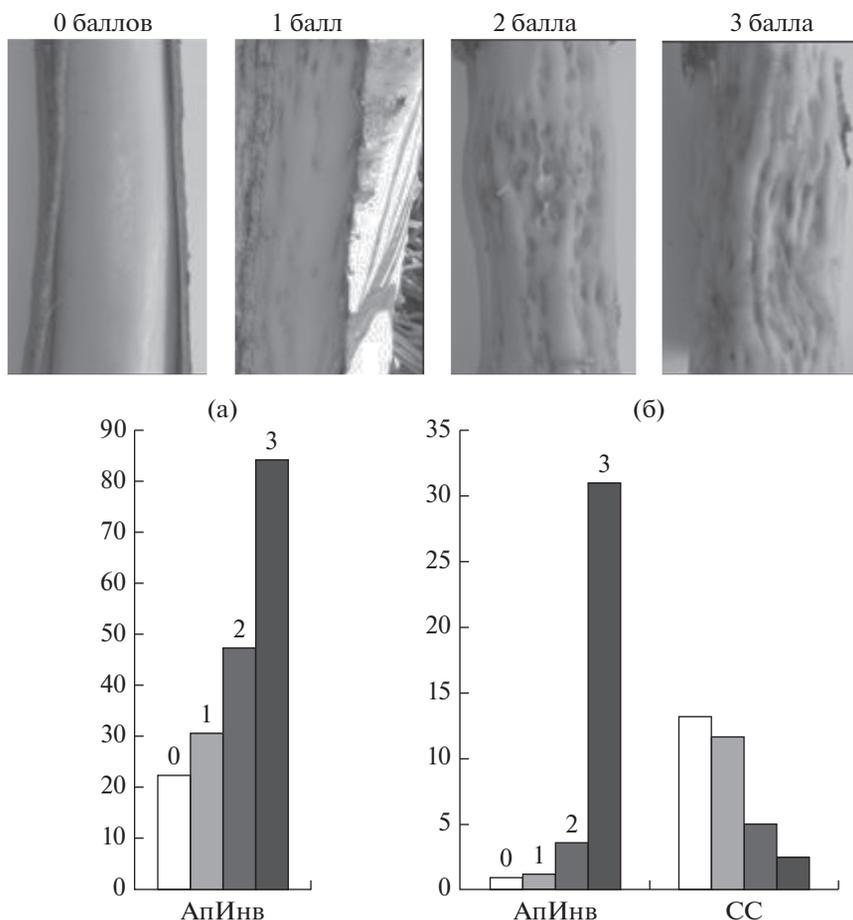


Рис. 1. Окоренная поверхность древесины ствола обычной (0 баллов) и карельской березы с разной степенью узорчатой текстуры (1–3 балла). Пояснения в тексте. На диаграммах активность апопластной инвертазы (АпИInv) и сахарозосинтазы (СС) (мкмоль распавшейся сахарозы на г сырой ткани) во флоэме (а) и ксилеме (б) у растений обычной (0 – 0 баллов) и карельской березы с разной степенью узорчатой текстуры: 1 – 1 балл, 2 – 2 балла, 3 – 3 балла.

KNO_3 , под контрольные деревья добавляли по 20 л воды.

Опытная концентрация KNO_3 была взята на основании данных литературы: под травянистые растения вносили растворы нитрата калия в концентрации 10 мМ (Gordon et al., 2002) и 50 мМ (Batasheva et al., 2007), под виноград – 36 мМ (Vargier et al., 2005), под шестинедельные сеянцы березы – 10 мМ (Friemann, 1992); влияние нитратов на ген нитратредуктазы, выделенный из березы повислой, изучали при воздействии 50 мМ KNO_3 (Nachtel, Strater, 2000).

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

В эксперименте использовали растения карельской березы с высокой степенью узорчатости древесины (3 балла по шкале В.И. Ермакова).

Отбор образцов

Из ствола березы препарировали ткани флоэмы и ксилемы. В ткани, обозначенные как “флоэма”, входили камбиальная зона и проводящая флоэма, в ткани, обозначенные как “ксилема” – зоны деления, роста и дифференцировки клеток ксилемы. Образцы тканей ствола сразу замораживали в жидком азоте и хранили в низкотемпературной морозильной камере при $-70^{\circ}C$. Отбор образцов контролировали под световым микроскопом. Ткани для анализа отбирали с пяти растений каждой формы березы.

Определение нитратного азота

Из корнеобитаемого слоя почвы каждого опытного и контрольного дерева отбирали образцы почвы, в которых потенциметрическим методом определяли концентрацию нитратного (NO_3) азота (рН-метр Анион А4100, Россия). Со-

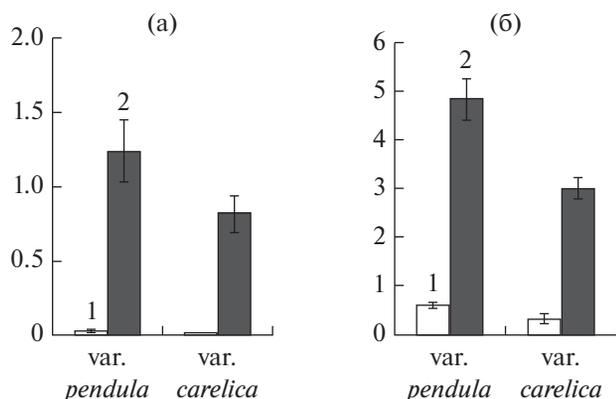


Рис. 2. Содержание нитратного азота в почве (а) (мг нитратного азота на 100 г почвы) и корнях (б) (мг нитратного азота на 100 г ткани) в контроле (1) и опыте (2) у растений обычной (var. *pendula*) и карельской (var. *carelica*) березы. Числа на диаграммах – средние значения из 5 биологических повторностей. Бары – стандартное отклонение.

держание нитрата выражали в мг N от NO_3 на 100 г сухой массы почвы.

Биохимические исследования

Растительные ткани растирали в жидком азоте до однородной массы и гомогенизировали при 4°C в буфере следующего состава: 50 мМ Нерес (pH = 7.5), 1 мМ ЭДТА, 1 мМ ЭГТА, 3 мМ ДТТ, 5 мМ MgCl_2 , 0.5 мМ PMSF. После 20-минутной экстракции гомогенат центрифугировали при 10000 g в течение 20 минут (центрифуга Sigma 2-16РК, Германия). Осадок трехкратно промывали буфером. Объединенный супернатант диализовали при 4°C в течение 18–20 часов против буфера для гомогенизации, разбавленного в 10 раз. В полученных после диализа ферментативных препаратах свободные гексозы и сахароза не обнаруживались. В осадке определяли апопластную инвертазу, связанную с клеточной стенкой (АпИInv), в супернатанте – сахарозосинтазу (СС). Инкубационная среда для определения активности АпИInv содержала 100 мМ ацетатный буфер (pH 4.7), 25 мМ сахарозу. Количество образовавшейся в процессе инкубации глюкозы определяли глюкозооксидазным методом (набор реагентов “Глюкоза-Агат”, Россия). Активность инвертазы выражали в мкмоль распавшейся сахарозы на г сырой ткани за 30 минут (мкмоль/г сырой ткани). Инкубационная среда для определения активности СС содержала 70 мМ Нерес (pH 7.4), 5 мМ MgCl_2 , 1 мМ уридиндифосфат, 1 мМ пиродифосфат, 1 мМ НАДФ, 50 мМ сахарозу, 1 U глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, 2 U фосфоглюкомутазы (Xu et al., 1989). Активность СС определяли в направлении распада сахарозы спектрофотометри-

чески по восстановлению НАДФ при $\lambda = 340$ нм (спектрофотометр СФ-2000, Россия). Активность СС выражали в мкмоль распавшейся сахарозы на г сырой ткани за 30 мин (мкмоль/г сырой ткани).

Для определения сахарозы весь растительный материал сразу после взятия проб замораживали в жидком азоте и лиофильно высушивали. Выделение и экстракцию сахаров проводили по методике, которая подробно описана ранее (Галибина и др., 2012). Экстракцию сахаров проводили 80% этиловым спиртом при 50°C в течение 30 минут. Содержание сахарозы в экстракте анализировали на ВЭЖХ системе серии “Стайер” (Аквилон, Россия) при следующих условиях: колонка – Rezex RCM-Monosaccharide (Phenomenex, США), элюент – бидистиллированная вода, скорость потока элюента – 0.6 мл/мин, детектор – рефрактометр. Критерием идентификации пиков служило время удерживания стандартного раствора сахарозы (Panгеас, Испания). Содержание сахарозы выражали в мг на г сухой ткани.

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

РЕЗУЛЬТАТЫ

Особенности распределения активности ферментов метаболизации сахарозы в тканях ствола березы с разной степенью узорчатости древесины

Активность АпИInv во флоэме коррелировала со степенью узорчатости древесины. Ее значения составили 22 мкмоль/г сырой ткани у обычной березы (узорчатость древесины 0 баллов) и 30, 47, 84 мкмоль/г сырой ткани у деревьев карельской березы со степенью узорчатости древесины 1 балл, 2 балла и 3 балла, соответственно (рис. 1а). В тканях ксилемы распределение активности АпИInv было аналогичным: 1–1.3–3.6–31 мкмоль/г сырой ткани в ряду растений с узорчатостью древесины 0–1–2–3 балла (рис. 1б). По мере увеличения узорчатости древесины в тканях ксилемы происходило снижение активности СС, значения ее составили: 13.2–11.7–5.1–2.5 мкмоль/г сырой ткани (рис. 1б).

Содержание нитратов в почве и в растениях

Увеличение нитратного азота в почве примерно в 100 раз (рис. 2а) приводило к возрастанию его содержания в корнях опытных растений в 8–9 раз, по сравнению с контрольными деревьями (рис. 2б).

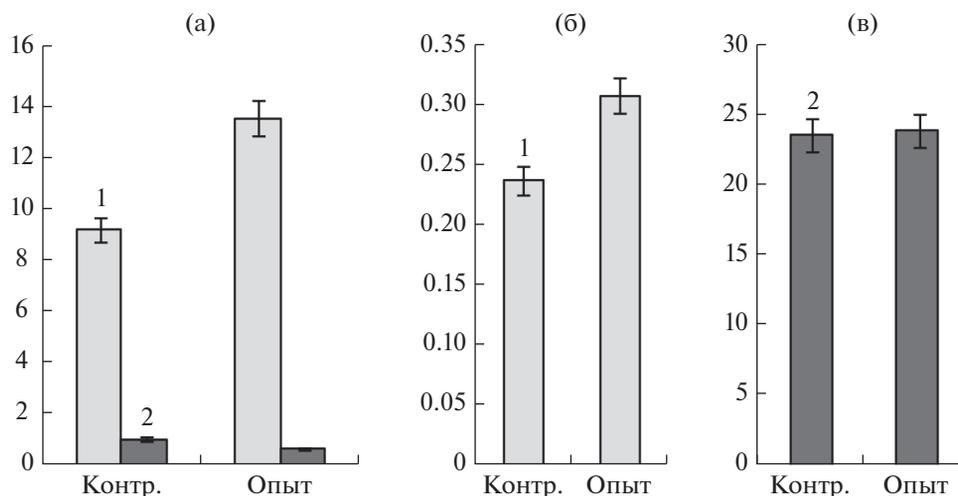


Рис. 3. Активность сахарозосинтазы (1) и апопластной инвертазы (2) (мкмоль распавшейся сахарозы на г сырой ткани) в ксилеме (а) и флоэме (б, в) в контрольных (контр.) и опытных (опыт) растениях обычной березы. Числа на диаграммах — средние значения из 5 биологических повторностей. Бары — стандартное отклонение.

Активность СС и АпИнв в ксилеме и флоэме обычной березы

В ксилеме контрольных растений в период камбиального роста отмечена высокая активность СС (9 мкмоль/г сырой ткани), в то время как активность АпИнв здесь не превышала 1 мкмоль/г сырой ткани (рис. 3а). Во флоэме, наоборот, основным ферментом, расщепляющим сахарозу, была инвертаза клеточной стенки, активность которой достигала ~24 мкмоль/г сырой ткани (рис. 3в). При этом активность СС была в 100 раз меньше (около 0.2 мкмоль/г сырой ткани) (рис. 3б).

Внесение нитратного азота в почву привело у опытных растений обычной березы к увеличению в ксилеме активности СС в 1.5 раз (рис. 3а). Во флоэме также наблюдалось увеличение активности СС (рис. 3б). Активность апопластного фермента у опытных и контрольных растений была практически одинаковой (рис. 3а, 3в).

Активность СС и АпИнв в ксилеме и флоэме карельской березы

У контрольных растений карельской березы активность СС в ксилеме была ниже по сравнению с обычной березой и составила 6.5 мкмоль/г сырой ткани. При этом наблюдалась высокая активность АпИнв, значения которой (12 мкмоль/г сырой ткани) превосходили таковую у обычной березы ~ в 12 раз (рис. 4а). Еще одна особенность карельской березы — активность АпИнв в ксилеме была ~ в 2 раза выше, чем активность СС. Во флоэме контрольных растений карельской березы, по сравнению с обычной березой, наблюдалась высокая активность как СС (0.7 мкмоль/г

сырой ткани), так и АпИнв (54 мкмоль/г сырой ткани) (рис. 4б, 4в).

Внесение в почву нитратного азота не привело к возрастанию СС в ксилеме карельской березы, более того активность фермента снизилась, по сравнению с контролем, в 2.2 раза. При этом происходило снижение в 1.7 раз активности АпИнв (рис. 4а). Во флоэме, наоборот, обработка экзогенным нитратом привела к увеличению активности СС и АпИнв в 2 и 1.4 раза соответственно (рис. 4б, 4в).

Содержание сахарозы в тканях ствола обычной березы и карельской березы

У обычной березы в ксилеме содержание сахарозы составило 36.3 мг/г, что было в 3 раза меньше, чем во флоэме (113.6 мг/г). Внесение экзогенного нитрата в почву сопровождалось снижением сахарозы в ксилеме (до 26.3 мг/г) и во флоэме (до 102.3 мг/г) (рис. 5а).

У карельской березы в этот период количество сахарозы в ксилеме и флоэме было примерно одинаковое (47–48 мг/г). Внесение в почву экзогенного нитрата привело к возрастанию сахарозы в ксилеме (до 61.4 мг/г) и снижению во флоэме (до 40.5 мг/г) (рис. 5б).

ОБСУЖДЕНИЕ

В июле фотосинтезирующие листья являются донорами ассимилятов (сахарозы), основным местом их потребления служат камбиальная зона и дифференцирующаяся ксилема. Транспорт сахарозы контролируется способностью акцепторов к ее расщеплению, что поддерживает градиент ди-

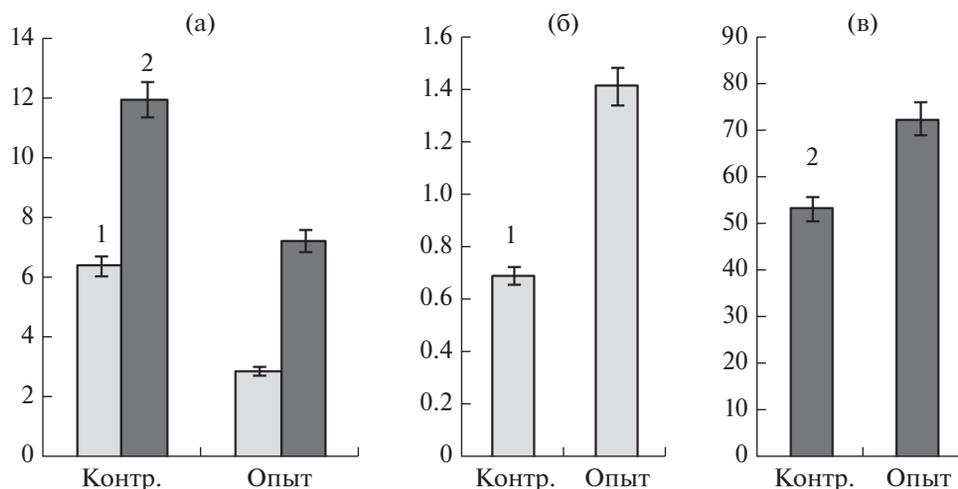


Рис. 4. Активность сахарозосинтазы (1) и апопластной инвертазы (2) (мкмоль распавшейся сахарозы на г сырой ткани) в ксилеме (а) и флоэме (б, в) в контрольных (контр.) и опытных (опыт) растениях карельской березы. Числа на диаграммах – средние значения из 5 биологических повторностей. Бары – стандартное отклонение.

сахарида. В повышении акцепторной силы органа важную роль играют апопластная инвертаза (Koch, 2004; Iraqi et al., 2005; Godt, Roitsch, 2006; Canam et al., 2008; Barratt et al., 2009 и др.) и сахарозосинтаза (Godt, Roitsh, 2006; Coleman et al., 2008; Nilsson et al., 2010 и др.). Изучение активности АпИInv и СС в дифференцирующейся ксилеме у обычной березы и карельской березы с разной степенью узорчатости древесины показало, что в ряду “отсутствие узора (0 баллов) – слабый узор (1 балл) – средний узор (2 балла) – сильный узор (3 балла)” активность СС уменьшалась. При этом возрастала метаболизация сахарозы инвертазой клеточной стенки (рис. 1). Исходя из полученных данных, а также результатов выполненных ранее исследований (Галибина и др., 2015а, 2015б), мы предположили, что между активностями СС и АпИInv и формированием структурных аномалий ксилемы существует стойкая взаимосвязь. В зависимости от пути вовлечения сахарозы в метаболизм направленность обменных процессов может быть смещена 1) в сторону формирования клеточных оболочек (“СС-путь”), что наблюдается при образовании нормальной древесины, или 2) в сторону синтеза запасных метаболитов (“инвертазный путь”) и, как следствие усиленной паренхиматизации ткани, что происходит при формировании узорчатой древесины. Различные соотношения активностей СС и АпИInv приводят к появлению растений карельской березы с разной степенью узорчатости древесины.

С увеличением степени узорчатости происходит снижение метаболизации сахарозы в дифференцирующейся ксилеме, что сопровождается возрастанием расщепления сахарозы с помощью АпИInv во флоэме (рис. 1а). Это означает, что у высокоузорчатой карельской березы (узорчатость

3 балла) ростовые процессы сосредоточены преимущественно во флоэме. Данный вывод находится в соответствии с величиной градиента концентрации сахарозы между флоэмой и ксилемой у двух форм березы. У обычной березы этот показатель ($113.6 \text{ мг/г} - 36.3 \text{ мг/г} = 67.3 \text{ мг/г}$) (рис. 5а) существенно больше, чем у карельской березы ($48.6 \text{ мг/г} - 47.8 \text{ мг/г} = 1.2 \text{ мг/г}$) (рис. 5б). Следовательно, у обычной березы имеет место интенсивный отток сахарозы из флоэмы в ксилему, где она расходуется на формирование клеточных оболочек структурных элементов древесины, а у карельской березы поток сахарозы из флоэмы сильно замедлен, и ее использование в значительной степени происходит во флоэме.

Увеличение нитратного азота в почве у опытных растений березы (рис. 2а) приводило к возрастанию его содержания в корнях (рис. 2б), что свидетельствует об активном поступлении нитратов из почвы в корни.

У обычной березы внесение нитратов в почву оказало стимулирующее влияние на активность СС в ксилеме (рис. 3а) и во флоэме (рис. 3б) и снизило выход сахарозы в апопласт ксилемы, на что указывает снижение в ткани активности АпИInv (рис. 3а). Многими авторами установлено, что ассимиляция нитратов растением связана с высокой активностью СС (Люленова, 2007; Брускова и др., 2009; Никитин и др., 2010; Gordon et al., 1999, 2002 и др.). Добавление в питательную среду нитрата калия приводило к увеличению активности СС в корнях гороха, что, объясняют стимулирующим действием нитратов на синтез белка СС *de novo* (Брускова и др., 2009; Никитин и др., 2010). В растениях арабидопсиса обнаружено около 40 генов, индуцируемых нитратом, среди них гены, кодиру-

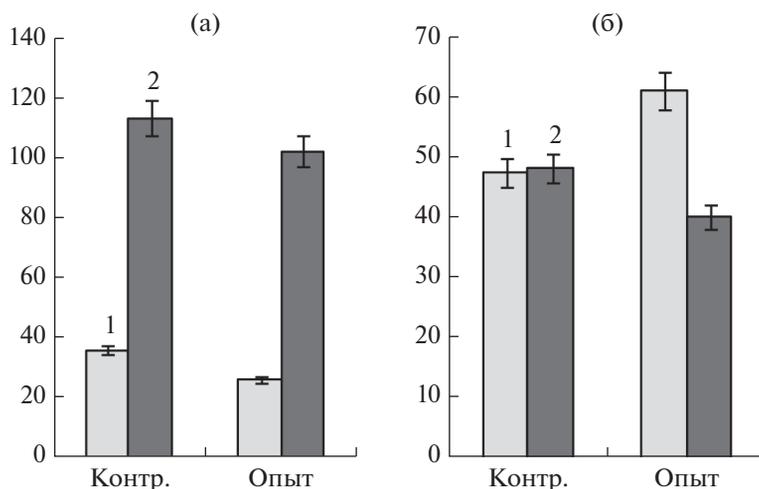


Рис. 5. Содержание сахарозы (мг на г сухой ткани) в ксилеме (1) и флоэме (2) в контрольных (контр.) и опытных (опыт) растениях обычной (а) и карельской (б) березы. Числа на диаграммах – средние значения из 5 биологических повторностей. Бары – стандартное отклонение.

ющие ферменты углеводного обмена (Wang et al., 2000). Согласно нашим данным, в ксилеме обычной березы увеличение метаболизации сахарозы по “СС-пути” сопровождается снижением содержания сахарозы во флоэме и ксилеме (рис. 5б), при сохранении градиента ее концентрации между тканями на высоком уровне (102.2 мг/г – 26.3 мг/г = 75.9 мг/г). Перечисленные изменения показывают, что действие нитратов у обычной березы стимулировало включение сахарозы в сахарозосинтазный путь метаболизации, направленный на формирование клеточных оболочек. Таким образом, у обычной березы нитраты вызвали усиление пути усвоения сахарозы в ксилеме, который у нее преобладал в отсутствие экспериментального воздействия.

У карельской березы при воздействии нитратов наблюдали увеличение активности СС и АпИнв во флоэме (рис. 4б, 4в) на фоне снижения активности этих ферментов в ксилеме (рис. 4а). Это согласуется с изменением градиента концентрации сахарозы между флоэмой и ксилемой, который приобрел отрицательное значение (40.5 мг/г – 61.4 мг/г = –20.9 мг/г). Таким образом, метаболизация сахарозы под действием нитратов у карельской березы, как и у обычной березы, усилилась в тех тканях (в данном случае флоэма), где ростовые процессы преобладали до их внесения.

Воздействие нитратов у карельской березы приводит к снижению в ксилеме метаболизации сахарозы по инвертазному пути, вызывая уменьшение в ней количества паренхимы, следствием чего становится нормализация строения ткани. Низкий уровень использования сахарозы в ксилеме наблюдался на фоне увеличения ее расщепления во флоэме с помощью АпИнв, значения которой достигали 73 мкмоль/г сырой ткани (рис. 4в),

что свидетельствует о существенном выходе сахарозы в апопласт флоэмы. Гексозы, образующиеся в результате расщепления сахарозы в апопласте, не возвращаются назад в ситовидные элементы, а включаются в метаболизм в паренхимных клетках флоэмы. Подобный эффект наблюдали на растениях льна долгунца при повышенной подкормке растений нитратами (Баташева, 2006; Chikov et al., 2003; Chikov, Bakirova, 2004). Авторы предполагают, что продукты неполного восстановления нитрата при участии NO сигнальной системы стимулируют синтез каллозы в ситовидных элементах листа (Баташева и др., 2010; Хамидуллина и др., 2011), что снижает загрузку сахарозы во флоэму и приводит к ее выходу в апопласт, активируя тем самым апопластную инвертазу.

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

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

Авторы выражают благодарность И.Н. Софроновой за помощь в проведении биохимических анализов.

Работа выполнена в рамках государственного задания ИЛ КарНЦ РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Баташева С.Н., Абдрахимов Ф.А., Бакирова Г.Г. и др. Влияние донора оксида азота — нитропруссид натрия — на фотосинтез и ультраструктуру листовых пластинок льна-долгунца // Физиология растений. 2010. Т. 57. № 3. С. 398–403.
- Баташева С.Н. Нитратный ион в апопласте растения: влияние на фотосинтез и транспорт ассимилятов. Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Казань, 2006. 168 с.
- Брускова Р.К., Никитин А.В., Сацкая М.В. и др. Действие нитрата на активность сахарозосинтазы растений гороха // Физиология растений. 2009. Т. 56. № 1. С. 85–91.
- Галибина Н.А., Новицкая Л.Л., Красавина М.С. и др. Активность сахарозосинтазы в тканях ствола карельской березы в период камбиального роста // Физиология растений. 2015а. Т. 62. № 3. С. 1–10.
- Галибина Н.А., Новицкая Л.Л., Красавина М.С. и др. Активность инвертазы в тканях ствола карельской березы // Физиология растений. 2015б (в печати).
- Галибина Н.А., Новицкая Л.Л., Софронова И.Н. Динамика сахаров в тканях ствола *Betula pendula* (Betulaceae) при выходе из зимнего покоя // Растительные ресурсы. 2012. Т. 48. № 4. С. 554–564.
- Евдокимов А.П. Биология и культура карельской березы. Л.: Изд-во Ленинградского университета, 1989. 226 с.
- Люленова В.В. Регуляция минерального питания, активность сахарозосинтазы, сахарозофосфатсинтазы и накопление сахарозы свекловичным растением. Автореф. дис. ... докт. биол. наук. М., 2007. 33 с.
- Никитин А.В., Брускова Р.К., Измайлов С.Ф. Действие аммония на сахарозосинтазу гороха *Pisum sativum* L. // Физиология растений. 2010. Т. 57. № 1. С. 76–80.
- Новицкая Л.Л. О возможной причине формирования структурных аномалий ствола карельской березы // Бот. журн. 1997. Т. 82. № 9. С. 61–66.
- Новицкая Л.Л. Карельская береза: механизмы роста и развития структурных аномалий. Петрозаводск: Verso, 2008. 144 с.
- Соколов Н.О. Карельская береза. Петрозаводск: Изд-во Карело-финской ССР, 1950. 116 с.
- Хамидуллина Л.А., Абдрахимов Ф.А., Баташева С.Н. и др. Влияние введения нитратов в апопласт побега на фотосинтез и транспорт ассимилятов у симпластных и апопластных растений // Физиология растений. 2011. Т. 58. № 3. С. 420–426.
- Amor Y., Haigler C.H., Johnson S. et al. A membrane-associated form of sucrose synthase and its potential role in synthesis of cellulose and callose in plants // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1995. V. 92. P. 9353–9357.
- Barbier H., Gaudillere J.P., Rothan C. Gene expression profiles in response to nitrogen nutrition in *Vitis vinifera* L. // VII International Symposium on Grapevine Physiology and Biotechnology ISHS Acta Horticulturae L.E. Williams Ed. 2005. V. 689. P. 429–434.
- Barratt D.H., Derbyshire P., Findlay K et al. Normal growth of Arabidopsis requires cytosolic invertase but not sucrose synthase // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2009. V. 106. P. 13124–13129.
- Batasheva S.N., Abdрахимов F.A., Bakirova G.G. et al. Effect of nitrates supplied with the transpiration flow on assimilate translocation // Russian Journal of Plant Physiology. 2007. V. 54. № 3. P. 373–380.
- Canam T., Mak S.W.Y., Mansfield S.D. Spatial and temporal expression profiling of cell-wall invertase genes during early development in hybrid poplar // Tree Physiology. 2008. V. 28. P. 1059–1067.
- Chikov V.I., Avvakumova N.Yu., Bakirova G.G. Postphotosynthetic utilization of labeled assimilates in fiber flax // Biology Bulletin. 2003. V. 30. № 4. P. 377–382.
- Chikov V.I., Bakirova G.G. Role of the apoplast in the control of assimilate transport, photosynthesis, and plant productivity // Russian Journal of Plant Physiology. 2004. V. 51. № 3. P. 420–431.
- Coleman H.D., Samuels A.L., Guy R.D. et al. Perturbed lignification impacts tree growth in hybrid poplar — a function of sink strength, vascular integrity, and photosynthetic assimilation // Plant Physiology. 2008. V. 148. № 3. P. 1229–1237.
- Friemann A., Lange M., Hachtel W. et al. Brinkmann K. Induction of nitrate assimilatory enzymes in the tree *Betula pendula* // Plant Physiology. 1992. V. 99. P. 837–842.
- Godt D.E., Roitsch T. The developmental and organ specific expression of sucrose cleaving enzymes in sugar beet suggests a transition between apoplastic and symplastic phloem unloading in the tap roots // Plant Physiol. Biochem. 2006. V. 44. P. 656–665.
- Gordon A.J., Minchin F.R., James C.L. et al. Sucrose Synthase in legume nodules is essential for nitrogen fixation // Plant Physiology. 1999. V. 120. № 3. P. 867–878.

- Gordon A.J., Scot L., James C.L. et al. Short-term metabolic responses of soybean root nodules to nitrate // J. Exp. Bot. 2002. V. 5. P. 423–428.
- Hachtel W., Strater T. The nitrate reductase promoter of birch directs differential reporter gene expression in tissues of transgenic tobacco // Plant Soil. 2000. V. 221. P. 33–38.
- Iraqi D., Le V.-Q., Lamhamedi M.S. et al. Sucrose utilization during somatic embryo development in black spruce: involvement of apoplastic invertase in the tissue and of extracellular invertase in the medium // J. of Plant Physiology. 2005. V. 162. P. 115–124.
- Koch K.E. Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development // Curr. Opin. Plant Biol. 2004. V. 7. P. 235–246.
- Nilsson R., Bernfur K., Gustavsson N. et al. Proteomics of plasma membranes from poplar trees reveals tissue distribution of transporters, receptors, and proteins in cell wall formation // Mol. Cell. Proteomics. 2010. V. 9. P. 368–387.
- Novitskaya L.L., Kushnir F.V. The role of sucrose in regulation of trunk tissue development in *Betula pendula* Roth // J. Plant Growth Regul. 2006. V. 25. P. 18–29.
- Ruan Y.L., Llewellyn D.J., Furbank R.T. Suppression of sucrose synthase gene expression represses cotton fiber cell initiation, elongation, and seed development // Plant Cell Online. 2003. V. 15. P. 952–964.
- Song D.L., Shen J.H., Li L.G. Characterization of cellulose synthase complexes in *Populus* xylem differentiation // New Phytologist. 2010. V. 187. P. 777–790.
- Wang R., Guegler K., Labrie S.T. et al. Crawford N.M. Genomic analysis of a nutrient response in *Arabidopsis* reveals diverse expression patterns and novel metabolic and potential regulatory genes induced by nitrate // Plant Cell. 2000. V. 12. P. 1491–1509.
- Xu D.P., Sung S.J. S., Loboda T. et al. Characterization of sucrolysis via the uridine diphosphate and pyrophosphate-dependent sucrose synthase pathway // Plant Physiology. 1989. V. 90. P. 635–642.

Excess of Exogenous Nitrates Inhibits Formation of Abnormal Wood in the Karelian Birch

N. A. Galibina, L. L. Novitskaya, and K. M. Nikerova

Forest Institute, Karelian Scientific Center, Russian Academy of Sciences,
ul. Pushkinskaya 11, Petrozavodsk, Republic of Karelia, 185910 Russia
e-mail: galibina@krc.karelia.ru

Received August 30, 2015; in final form, November 11, 2015

The effect of exogenous nitrate on the sucrose-metabolizing enzyme activities—sucrose synthase (SS) and apoplastic invertase (ApInv) — in the xylem and phloem of the silver (*Betula pendula* Roth var. *pendula*) and Karelian (*B. pendula* var. *carelica*) birches (the latter is well known for its abnormal, patterned wood) has been studied. A stable correlation between the enzyme activities and deviations in the growth and development of stem vascular tissues during cambial growth has been demonstrated. Formation of the birch wood with a common structure is associated with high SS activity. In this case, the reaction yields UDP glucose, which is utilized mainly for synthesis of the cell wall components of vessels and fiber tracheids. As for the Karelian birch, the SS activity in the xylem formation zone is decreased, which complies with a higher sucrose level in the tissue. The excess sucrose is released into the apoplast to be cleaved by ApInv. The resulting hexoses induce storage metabolism, thereby increasing the amount of storage substances and the share of storage parenchyma cells in the xylem. As a result, the Karelian birch wood acquires large inclusions in the parenchyma, which render a characteristic pattern. A change in the ratio of SS to ApInv activities underlies a great variety in the degree of wood patterning observed in Karelian birch trees. In the common silver birch, the nitrate application increases the sucrose utilization via SS pathway, which results in an increase in wood growth. In the Karelian birch xylem, nitrates lead to a decrease in both the SS (a decrease in wood growth) and ApInv (a decrease in the amount of parenchyma, i.e., normalization of the wood structure). The sucrose metabolizing in the xylem decreases on the background of an increase in its utilization in the phloem, where both enzyme activities elevate. It is assumed that the fact that the Karelian birch distribution range is limited by rich soils can be determined by a shift from intensive apoplastic sucrose utilization zone towards the phloem caused by high doses of nitrogen nutrition.

Keywords: Karelian birch, abnormal xylogenesis, sucrose synthase, apoplastic invertase, effect of nitrates