

## ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ КАМБИАЛЬНОЙ ЗОНЫ БЕРЕЗЫ ПОВИСЛОЙ НА НАРУШЕНИЕ ТРАНСПОРТА АССИМИЛЯТОВ

Л.Л. Новицкая, Н.А. Галибина, Ю.Л. Мощенская, К.М. Никерова, Т.В. Тарелкина,  
М.Н. Подгорная, И.Н. Софронова, Л.И. Семенова

Институт леса – обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра «Карельский научный центр Российской академии наук», Петрозаводск, Россия, [nowits@krc.karelia.ru](mailto:nowits@krc.karelia.ru)

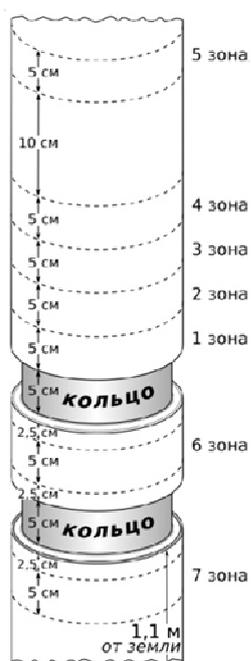
**Аннотация.** В эксперименте с двойным кольцеванием ствола березы повислой (*Betula pendula* var. *pendula*) нарушали флоэмный транспорт ассимилятов. Это позволило создать градиент концентрации сахарозы по оси ствола. В зонах роста и дифференциации проводящих тканей (флоэма, ксилема) на разном расстоянии от окольцованной части ствола исследовали уровень экспрессии генов, кодирующих апопластную инвертазу (*CWIN*), ее белковый ингибитор (*Cif*), изоформы сахарозосинтазы (*Sus1*, *Sus2*) и целлюлозосинтазы (*Ces3*, *Ces7*, *Ces8*).

**Ключевые слова:** нарушение флоэмного транспорта, содержание сахарозы, апопластная инвертаза и ее белковый ингибитор, изоформы сахарозосинтазы и целлюлозосинтазы, экспрессия генов

**DOI:** 10.31255/978-5-94797-319-8-558-562

Нисходящий транспорт сахарозы нарушали путем кольцевания ствола деревьев обычной березы повислой (*Betula pendula* var. *pendula*). Указанный методический прием широко используется для изучения камбиального роста в условиях различной обеспеченности тканей ассимилятами. Для исследования использовали 22-летние деревья березы, компактно произрастающие на одном из участков на Агробиологической станции КарНЦ РАН. Все они имели хорошо развитую крону и гладкий ровный ствол без видимых повреждений. Высота деревьев –  $10 \pm 0.5$  м, диаметр ствола на высоте 1.3 м от земли –  $10 \pm 0.2$  см. На стволах опытных деревьев в период активных делений в камбиальной зоне (19.06.2017 г.) было выполнено двойное кольцевание по методике [Daudet et al., 2005]: острым ножом удаляли два кольца коры вплоть до зоны формирующейся ксилемы. Нижние границы колец располагались на высоте 110 см и 125 см от земли, ширина колец составляла 5 см (рис. 1). Для предотвращения образования каллуса и восстановления транспорта ассимилятов поверхность древесины в зоне колец дополнительно зачищали ножом. Отбор тканей ствола проводили с 7 зон, различающихся по обеспеченности сахарами. Часть ствола, расположенная выше верхнего кольца, сохраняла связь с кроной и продолжала снабжаться ассимилятами, образующимися в процессе фотосинтеза. Поскольку в эксперименте полностью удаляли проводящую флоэму, мы предположили, что в этой части ствола будет накапливаться сахароза с максимумом в зоне непосредственно над верхним кольцом (1 зона) и с последующим снижением ее содержания на расстоянии 5, 10, 15 и 35 см выше границы верхнего кольца (2-5 зоны соответственно) (рис. 1). Участок ствола, расположенный между кольцами, был полностью изолирован от флоэмного притока сахаров и мог использовать только сахара, образующиеся при расщеплении запасных соединений (6 зона). Участок ствола, расположенный под нижним кольцом, мог получать углеводы, запасенные ниже по стволу и в корнях (7 зона) (рис. 1). Часть деревьев были помечены как контрольные и оставлены без каких-либо воздействий. На контрольных деревьях образцы отбирали с мест, соответствующих по высоте 1-7 зонам у окольцованных растений. В указанных

участках ствола препарировали слои тканей, соответствующие зонам роста и дифференциации флоэмы и ксилемы (в дальнейшем обозначены как флоэма и ксилема). Образцы отбирали с 5 окольцованных и 3 контрольных деревьев на 10-й день после начала эксперимента (29 июня 2017 г.).



**Рис. 1. Схема эксперимента с двойным кольцевидным стволом. Пояснения в тексте.**

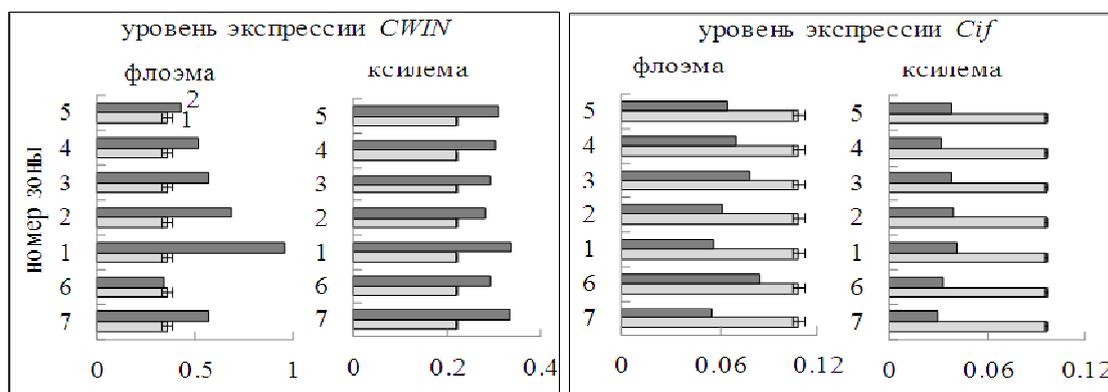
зависимости от зоны, его количество равномерно было выше в  $\sim 1.4$  раза по сравнению с контролем (рис. 2).

Регуляция активности АпИнв, по всей видимости, происходила не только на уровне экспрессии кодирующих ее генов, но и на посттрансляционном уровне. Содержание транскриптов мРНК гена, кодирующего белковый ингибитор АпИнв, возросло у опытных растений, по сравнению с контрольными, в 1.6 и 2.6 раз во флоэме и ксилеме соответственно (рис. 2), что свидетельствует об увеличении содержания сахарозы в апопласте.

Уровень экспрессии генов, кодирующих сахарозсинтазу (СС), во флоэме опытных деревьев, по сравнению с контрольными, увеличился в 2.5 раза, а в зоне непосредственно над верхним кольцом, где, предположительно, накапливается наибольший избыток сахаров, в 5 раз. В ксилеме количество транскриптов мРНК генов сахарозсинтазного семейства (*Sus1*, *Sus2*) у опытных растений, по сравнению с контрольными, увеличилось в 1.4 раза только в 1 зоне. В ходе ксилогенеза изоформы СС регулируют количество УДФ-глюкозы, идущей на синтез микрофибрилл целлюлозы, а также участвуют в биосинтезе крахмала [Echt, Chourey, 1985; Pozueta-Romero et al., 1999; Tauberger et al., 2000; Tiessen et al., 2002; Baroja-Fernández et al., 2003; Kladnik et al., 2005; Baroja-Fernandez et al., 2012]. В тканях ствола в период камбиального роста у древесных растений основная функция СС – участие в синтезе компонентов клеточных стенок ксилемы, при этом запасание крахмала происходит слабо. Уровень экспрессии гена *Ces8*, кодирующего изоформу целлюлозсинтазы, которая принимает участие в биосинтезе вторичной клеточной стенки, снижался  $\sim 2$

Нарушение флоэмного транспорта привело к существенному изменению уровня экспрессии генов, кодирующих АпИнв, как во флоэме, так и в ксилеме. Во флоэме количество транскриптов мРНК гена *CWIN* увеличилось, по сравнению с контролем, в 2.7, 1.9, 1.6 и 1.5 раз в 1, 2, 3 и 4 зонах соответственно (рис. 2). Полученные данные подтверждают наше предположение, что из-за нарушения нисходящего транспорта в этих местах мог образоваться избыток сахарозы, для расщепления которой потребовалось увеличение активности АпИнв. Минимальный уровень экспрессии гена *CWIN* наблюдался в 6 зоне, которая была полностью изолирована от флоэмных потоков фотоассимилятов. При этом, количество транскрипта мРНК гена *CWIN* в 7 зоне, расположенной под нижним кольцом, возросло, по сравнению с контролем, в 1.6 раз (рис. 2). Полученный результат подтверждает предположение о возможности поступления в этот участок сахаров, запасенных в нижележащей части ствола и в корнях. В ксилеме мы не наблюдали градиента в распределении транскрипта мРНК гена *CWIN* в зависимости от зоны, его количество равномерно было выше в  $\sim 1.4$  раза по сравнению с контролем (рис. 2).

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



**Рис. 2.** Уровень экспрессии (относит. ед.) генов, кодирующих апопластную инвертазу (*SWIN*) и ее белковый ингибитор (*Cif*), в исследуемых зонах деревьев березы повислой после кольцевания ствола (темные столбики) и в контроле (светлые столбики).

Таким образом, в эксперименте с кольцеванием ствола березы повислой нарушение транспорта фотоассимилятов приводит к увеличению содержания сахарозы в апопласте флоэмы (падает уровень экспрессии гена *Cif*) в зонах над кольцом (1-5 зона) и под кольцом (7 зона), что сопровождается возрастанием метаболизации дисахарида по апопластному (возрастает уровень экспрессии гена *SWIN*) и сахарозосинтазному (возрастает уровень экспрессии генов *Sus*) пути. В ксилеме, в отличие от флоэмы, не обнаружено градиента в распределении уровня экспрессии генов, кодирующих апопластную инвертазу и ее белковый ингибитор, сахарозосинтазу и целлюлозосинтазу, по зонам. В ксилеме опытных растений увеличение содержания сахарозы в апопласте сопровождается возрастанием ее метаболизации по апопластному пути, снижением использования сахарозы на синтез компонентов вторичных клеточных стенок (снижается уровень экспрессии гена *Ces8*) и увеличением ее использования на синтез первичных клеточных стенок (возрастает уровень экспрессии гена *Ces3*). При этом повышается количество транскрипта мРНК гена *Ces7*, кодирующего специфическую целлюлозосинтазу ксилемы [Liu et al., 2012; Salojärvi et al., 2017], который в обычных условиях почти не обнаруживается.

Финансовое обеспечение исследований осуществлялось из средств федерального бюджета на выполнение государственного задания КарНЦ РАН (Институт леса КарНЦ РАН) и частично при финансовой поддержке РФФИ (проекты № 16-04-01191 и 16-04-100639\_p\_a).

#### Литература

Baroja-Fernandez E., Mucoz F.J., Saikusa T., Rodriguez-Lopez M., Akazawa T., Pozueta-Romero J. Sucrose synthase catalyzes the de novo production of ADP-glucose linked to starch biosynthesis in heterotrophic tissues of plants // *Plant and Cell Physiology*. – 2003. – V. 44, Issue 5. – P. 500–509.

Baroja-Fernandez E., Mucoz F.J., Li J., Bahaji A., Almagro G., Montero M., Etxeberria E., Hidalgo M., Sesma M.T., Pozueta-Romero J. Sucrose synthase activity in the *sus1/sus2/sus3/sus4* Arabidopsis mutant is sufficient to support normal cellulose and starch production // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. – 2012. – V. 109, No. 1. – P. 321–326.

Daudet F-A., Ameglio T., Cochard H., Archilla O., Lacoïnte A. Experimental analysis of the role of water and carbon in tree stem diameter variations // *J. Exp. Bot.* – 2005. – V. 56, No. 409. – P. 135–144.

Echt C.S., Chourey P.S. A Comparison of two sucrose synthetase isozymes from normal and *shrunk-1* maize // *Plant Physiology*. – 1985. – V. 79, No. 2. – P. 530–536.

Kladnik A., Chamusco K., Chourey P.S., Dermastia M. *In situ* detection of programmed cell death in the maize caryopsis // *Periodicum Biologorum*. – 2005. – V. 107, No. 1. – P. 11–16.

Liu X., Wang Q., Pengfei Chen P., Song F., Guan M., Jin L., Wang Y., Yang C. Four novel cellulose synthase (CESA) genes from birch (*Betula platyphylla* Suk.) involved in primary and secondary cell wall biosynthesis // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2012. – V. 13, No. 10. – P. 12195–12212.

Pozueta-Romero J., Perata P., Akazawa T. Sucrose-starch conversion in heterotrophic tissues of plants // *Critical Reviews in Plant Sciences*. – 1999. – V. 18, Issue 4. – P. 489–525.

Salojärvi J. et al. Genome sequencing and population genomic analyses provide insights into the adaptive landscape of silver birch // *Nat. Genet.* – 2017. – V. 49. – P. 904–912.

Tauberger E., Fernie A.R., Emmermann M., Renz A., Kossmann J., Willmitzer L., Trethewey R.N. Antisense inhibition of plastidial phosphoglucomutase provides compelling evidence that potato tuber amyloplasts import carbon from the cytosol in the form of glucose-6-phosphate // *Plant J.* – 2000. – V. 23. – P. 43–53.

Tiessen A., Hendriks J.H.M., Stitt M., Branscheid A., Gibon Y., Farre E.M., Geigenberger P. Starch synthesis in potato tubers is regulated by post-translational redox modification of ADP-glucose pyrophosphorylase: a novel regulatory mechanism linking starch synthesis to the sucrose supply // *Plant Cell*. – 2002. – V. 14. – P. 2191–2213.

## PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL REACTIONS OF THE CAMBIAL REGION OF SILVER BIRCH TO DISTURBANCE OF ASSIMILATE TRANSPORT

L.L. Novitskaya, N.A. Galibina, Yu.L. Moshchenskaya, K.M. Nikerova, T.V. Tarelkina, M.N. Podgornaya, I.N. Sofronova, L.I. Semenova

Forest Research Institute of the Karelian Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Petrozavodsk, Russia, *nowits@krc.karelia.ru*

**Abstract.** In an experiment with double girdling of silver birch trunk the assimilate transport in the phloem was interrupted. This allowed to create sucrose concentration gradients along the trunk axis. In zones of growth and differentiation of conducting tissues (phloem, xylem), at different distances from the girdling zone the expression level of the genes encoding the apoplastic invertase (*CWIN*), its protein inhibitor (*Cif*), the isoforms of sucrose synthase (*Sus1*, *Sus2*) and cellulose synthase (*Ces3*, *Ces7*, *Ces8*) was studied.

**Keywords:** *disturbance of phloem transport, sucrose content, apoplastic invertase and its protein inhibitors, isoforms of sucrose synthase and cellulose synthase, gene expression*