

УДК 581.143.32+577.152.193+577.151.63

ВЛИЯНИЕ НИТРАТНОГО АЗОТА НА ПЕРОКСИДАЗНУЮ АКТИВНОСТЬ В ТКАНЯХ *Betula pendula* Roth var. *pendula* и *B. pendula* var. *carelica* (Mercklin)

К. М. Никерова, Н. А. Галибина

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

E-mail: knikerova@yandex.ru, galibina@krc.karelia.ru

Поступила в редакцию 02.12.2015 г.

Изучали распределение активности пероксидазы (ПОД) в период активного камбиального роста у 8-летних деревьев обычной березы повислой *Betula pendula* Roth var. *pendula* и карельской березы *B. pendula* var. *carelica* (Mercklin) с проявившимися признаками структурных аномалий. На анализ отбирали листья с укороченных побегов (брахибластов) и удлинённых (ауксибластов), мелкие сосущие корни, из ствола березы препарировали ткани флоэмы и ксилемы. Установлено, что активность ПОД у *B. pendula* var. *carelica* выше, чем у *B. pendula* var. *pendula*. С увеличением степени узорчатости древесины у 8-летних растений карельской березы возрастает активность ПОД в ксилеме. Высказано предположение, что локальное нарушение камбиальной деятельности у карельской березы приводит к повышению в клетках активных форм кислорода, что сопровождается увеличением пероксидазной активности. Для выявления ответной реакции растений березы на избыток азотных удобрений изучали влияние нитратного азота на активность фермента. Определение активности ПОД в тканях ствола березы повислой в условиях увеличения азотного питания выполнено впервые. Внесение нитрата калия в почву привело к увеличению активности ПОД в тканях ствола только у карельской березы. У обычной березы повислой активность ПОД во флоэме и ксилеме под влиянием азотных удобрений не изменялась. В листовом аппарате экзогенные нитраты вызвали разнонаправленные изменения у двух форм березы: у var. *pendula* активность пероксидазы возрастала, а у var. *carelica* ее значения снижались.

Ключевые слова: карельская береза, аномальный ксилогенез, пероксидаза, внесение нитратов.

DOI: 10.15372/SJFS20170102

ВВЕДЕНИЕ

Карельская береза *Betula pendula* var. *carelica* (Mercklin) – форма березы повислой *B. pendula* Roth var. *pendula*, обладающая высокодекоративной узорчатой древесиной. Структурные аномалии тканей ствола выражены у нее наиболее ярко по сравнению со всеми древесными породами, характеризуются большим разнообразием проявления в онтогенезе и высоким уровнем эндогенной изменчивости; их появление, развитие и затухание зависят от воздействия факторов среды (Новицкая, 2008).

Оригинальная текстура древесины карельской березы формируется в результате отклонений в деятельности камбия (Novitskaya, Kushnir, 2006; Новицкая, 2008). В зонах развития струк-

турных аномалий не запускается программа гибели клеток, приводящая к формированию сосудов и волокнистых трахеид ксилемы и ситовидных трубок флоэмы, дифференцирующиеся камбиальные производные сохраняют протопласт и превращаются в клетки запасующей паренхимы, которые накапливают большие количества липидов и танинов (Коровин и др., 2003; Novitskaya, Kushnir, 2006). Визуально нарушение дифференцировки проводящих элементов ксилемы и флоэмы выражается в появлении крупных скоплений паренхимных клеток, образующих на спилах древесины характерный узор (Novitskaya, Kushnir, 2006).

Многолетние исследования *B. pendula* var. *carelica* показали, что при любом варианте скрещивания родительских форм в потомстве всег-

да встречаются особи как с узорчатой, так и с обычной (безузорчатой) текстурой древесины (Любавская, 1978; Ермаков, 1986; Машкина и др., 2000). Поэтому вопрос диагностики степени развития узора при изучении насаждений карельской березы приобретает большое значение.

Ранее нами обнаружено, что в аномальных по строению тканях ствола карельской березы активность пероксидазы (ПОД) значительно превосходит таковую в тканях обычной березы повислой, особенно в периоды покоя и временного торможения ростовых процессов в камбиальной зоне (Галибина и др., 2013). Пероксидаза (ЕС 1.11.1.7) – функционально очень лабильный фермент, реагирующий на любые изменения окружающей среды и стрессовые ситуации. Основной функцией ПОД наряду с супероксиддисмутазой и каталазой является защита организма от вредного воздействия перекиси водорода и других активных форм кислорода (АФК), образующихся при окислительном стрессе в ответ на действие факторов среды (Hiraga et al., 2001; Duroux, Welinder, 2003; Gechev et al., 2006; Agati et al., 2012 и др.). В связи с этим возникает вопрос: можно ли рассматривать локальное нарушение камбиальной деятельности у карельской березы причиной повышения в клетках АФК, а по активности ПОД судить о степени этого нарушения. Ранее В. К. Поповым с соавторами (1996) показано, что активность ПОД у однолетних сеянцев потомства карельской березы можно использовать для выявления растений, у которых в дальнейшем проявится узорчатая текстура. Дальнейшее изучение ПОД у растений карельской березы, различающихся по степени проявления аномального строения тканей ствола, представляет несомненный интерес.

Анализ почвенных условий в пределах ареала карельской березы показал, что она не распространяется в области богатых почв (буроземов темноцветных), характеризующихся высоким содержанием подвижного азота (Новицкая, 2008). В настоящее время изучена роль ПОД в адаптации растений к воздействию экзогенных нитратов (Dani et al., 2005; Дубовская и др., 2007; Wilson et al., 2008; Викторова и др., 2010; Карпец и др., 2011; Correa-Aragunde et al., 2013 и др.), в то время как данные о влиянии азотного питания на пероксидазную активность у карельской березы в известной нам литературе отсутствуют.

Цель данной работы – сравнить изменения активности ПОД на действие азотного питания у двух форм березы повислой. Задачи

исследования – изучение активности ПОД у 8-летних деревьев обычной березы повислой *B. pendula* var. *pendula* и карельской березы *B. pendula* var. *carelica*, различающихся по степени узорчатости древесины, и оценка влияния нитратного азота на изменение ферментативной активности.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследовали 8-летние деревья березы обычной повислой *Betula pendula* Roth var. *pendula* и карельской *B. pendula* Roth var. *carelica* (Mercklin) с проявившимися признаками структурных аномалий. Посадки растений созданы на агробиологической станции Карельского научного центра РАН в 2 км от Петрозаводска (61°45' с. ш., 34°20' в. д.) двухлетними сеянцами, которые высаживали в борозды на поле площадью 30 × 20 м с шагом посадки 1 м и расстоянием между бороздами 1.5 м. Сеянцы карельской березы выращивали из семян, полученных в результате контролируемого опыления деревьев с ярко выраженными признаками узорчатости (Forelia OY, Финляндия).

Восьмилетние деревья карельской березы обладали высоким уровнем индивидуальной изменчивости по расположению и плотности рисунка на стволе, поэтому все растения поделили на группы согласно способу диагностики узорчатой текстуры древесины, предложенному В. И. Ермаковым (1986). Метод основан на вырезании на стволе участка коры 2 × 4 см и подсчете количества желобковидных углублений на 1 см² обнаженной поверхности древесины. Каждой группе растений присвоили балл от 0 до 3. К первой группе (0 баллов) отнесли растения, не имеющие углублений (деревья обычной березы с прямослойной древесиной) (рис. 1, а), ко второй (1 балл) – имеющие 1–3 углубления на 1 см² (редкий рисунок) (рис. 1, б), в третью группу (2 балла) попали растения с 4–6 углублениями на 1 см² (плотный рисунок) (рис. 1, в) и в четвертую (3 балла) – особи с 7 и более углублениями на 1 см² (очень плотный рисунок) (рис. 1, г) (Ермаков, 1986).

Эксперимент с внесением нитрата калия проводили в период активного камбиального роста (2–4 июля 2012 г.). Растения разделили на две группы: опытные, подвергшиеся обработке нитратом калия (KNO₃), и контрольные, без внесения нитратов. В каждой группе было по 5 растений *B. pendula* var. *pendula* и *B. pendula* var. *carelica*.

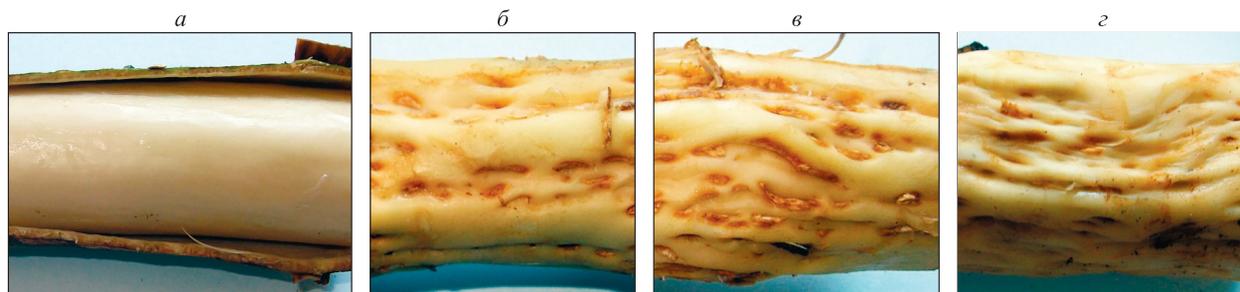


Рис. 1. Окоренная поверхность древесины ствола обычной березы с прямослойной древесиной (0 баллов) и карельской березы с разной степенью проявления узорчатости древесины (от 1 до 3 баллов).

2 июля под каждое опытное дерево внесли по 20 л 50 мМ раствора KNO_3 , под каждое контрольное дерево – по 20 л воды. Растворы вносили на всей площади проекции кроны. 3 июля – отбор образцов с контрольных растений; 4 июля – отбор образцов с опытных растений.

Опытная концентрация KNO_3 взята на основании данных литературы: под травянистые растения вносили 50 мМ раствор KNO_3 (Batasheva et al., 2007), под шестинедельные сеянцы березы – 10 мМ раствор KNO_3 (Friemann et al., 1992); влияние нитратов на ген нитратредуктазы, выделенный из березы повислой, изучали при воздействии 50 мМ KNO_3 (Nachtel, Strater, 2000).

В эксперименте использовали растения карельской березы с высокой степенью узорчатости древесины (2 балла по шкале В. И. Ермакова).

В качестве образцов отбирали листья с укороченных (брахибластов – БР) и удлиненных побегов (ауксибластов – АУ), а также мелкие сошущие корни. Из ствола березы препарировали ткани флоэмы и ксилемы. В ткани, обозначенные как «флоэма», входили камбиальная зона и проводящая флоэма, в ткани, обозначенные как «ксилема», – зоны деления, роста и дифференцировки клеток ксилемы. Отбор образцов контролировали под световым микроскопом. Весь растительный материал сразу замораживали в жидком азоте и хранили в низкотемпературной морозильной камере при $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Определение нитратного азота. Из корнеобитаемого слоя почвы каждого опытного и контрольного дерева отбирали образцы почвы, в которых потенциометрическим методом (рН-метр Анион А4100, Россия) определяли концентрацию нитратного азота (мг нитратного азота на 100 г сухой массы почвы). Количество нитратов в корнях и листьях с АУ и БР (мг нитратного азота на 100 г сухой массы ткани) определяли потенциометрическим методом.

Биохимические исследования. Растительный материал растирали с жидким азотом и гомогенизировали при $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ в среде следующего состава: 50 мМ Hepes буфер (pH 7.5), 1 мМ ЭДТА, 1 мМ ЭГТА, 3 мМ DTT, 5 мМ $MgCl_2$, 0.5 мМ PMSF (Le Hir et al., 2006), экстрагировали 20 мин при $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ и центрифугировали при 10 000 g в течение 20 мин (центрифуга Sigma 2-16PK, Германия). Осадок трехкратно промывали раствором, используемым для гомогенизации. Объединенный супернатант диализовали при $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 18–20 ч против среды для гомогенизации, разбавленной в 10 раз.

Активность ПОД определяли спектрофотометрически (спектрофотометр СФ-2000, Россия) в полученных после диализа ферментативных препаратах (Андреев и др., 2011). Для определения активности ПОД в тканях ствола в качестве донора водорода использовали бензидин, в качестве субстрата – перекись водорода. Инкубационная среда содержала: 60 мМ К, Na-фосфатный буфер (pH 7.8), 2.6 мМ перекись водорода и 0.034 мМ бензидин. Активность ПОД (мкмоль бензидина/мг белка за 30 мин) оценивали по изменению оптической плотности бензидина при $\lambda = 282\text{ нм}$. Для определения активности ПОД в листьях в качестве донора водорода использовали тетрагваякол (ТГ), в качестве субстрата – перекись водорода. Инкубационная среда содержала: 60 мМ К, Na-фосфатный буфер (pH 5.0), 2.6 мМ перекись водорода и 21.5 мМ ТГ. Активность ПОД (мкмоль ТГ/мг белка за 30 мин) определяли по скорости образования продукта реакции ТГ с учетом коэффициента экстинкции ($\epsilon_{470\text{ нм}} = 0.0266\text{ мкМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$). Содержание белка определено по методу Бредфорда (Bradford, 1976).

В работе использовали препараты следующих фирм: буфер Hepes – Sigma-Aldrich Merk (Германия); ЭДТА (этилендиаминтетрауксусной кислоты динатриевая соль) – AppliChem

(Германия); ЭГТА (этиленгликоль тетрауксусная кислота) – AppliChem (Германия); DTT (дитиотреитол) – Sigma-Aldrich Merk (Германия); PMSF (фенилметилсульфонилфторид) – AppliChem (Германия); гваякол – Acros organics (США). Остальные реактивы отечественного производства, имели квалификацию химически чистые или чистые для анализа.

Статистическая обработка данных проводилась в среде Microsoft Excel. Приведенные данные представлены в виде средних арифметических значений по биологической повторности в количестве 5 деревьев каждой группы. На диаграммах, иллюстрирующих активность ПОД и содержание нитратов в почве и органах растений, показаны средние значения \pm стандартное отклонение. Для оценки достоверности различий использовался *t*-критерий Стьюдента. Статистически значимыми считались различия при $p < 0.05$.

Все исследования проведены на оборудовании центра коллективного пользования Аналитическая лаборатория Института леса Карельского научного центра РАН.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В период активного камбиального роста у *B. pendula* var. *pendula* активность ПОД во флоэме составила 12.8 мкмоль бензидина/мг белка (рис. 2, а), что \sim в 42 раза больше, чем в ксилеме (0.3 мкмоль бензидина/мг белка) (рис. 2, б).

В аномальных по строению тканях ствола *B. pendula* var. *carelica* активность ПОД значительно превосходит таковую у *B. pendula* var. *pendula*. Так, активность фермента во флоэме

карельской березы была в 1.4 раза (см. рис. 2, а), а в ксилеме – в 20.5 раз выше (см. рис. 2, б), чем у обычной березы. Активность ПОД во флоэме у карельской березы была в 3 раза выше, чем в ксилеме.

Исследование показало, что пероксидазная активность у 8-летних растений березы повислой коррелировала со степенью узорчатости растений. Так, в ксилеме активность фермента составила 0.5 мкмоль бензидина/мг белка у *B. pendula* var. *pendula* (узорчатость древесины 0 баллов) и 1.4, 4.6, 23.1 мкмоль бензидина/мг белка у деревьев *B. pendula* var. *carelica* со степенью узорчатости древесины 1, 2 и 3 балла соответственно (рис. 3).

У *B. pendula* var. *pendula* активность ПОД в листьях с АУ не отличалась от таковой в листьях с БР и колебалась в диапазоне 11–13 мкмоль ТГ/мг белка (рис. 4). У *B. pendula* var. *carelica* пероксидазная активность была \sim в 2 раза выше и достигала 22.4 и 30.4 мкмоль ТГ/мг белка в листьях с АУ и БР соответственно. При этом активность ПОД в листьях с БР была в 1.4 раза больше, чем в листьях с АУ (см. рис. 4).

Содержание нитратов в почве и органах березы. Увеличение нитратного азота в почве у опытных растений березы повислой (\sim в 49 и 90 раз) (рис. 5, а) приводило к возрастанию его содержания в корнях (в 8–9 раз) по сравнению с контрольными деревьями (рис. 5, б). Следует отметить, что содержание нитратов в корнях опытных растений (4.8 ± 0.7 и 3.0 ± 0.3 мг нитратного азота на 100 г сухой массы ткани у обычной и карельской березы) не было максимальным для растений (Харитонашвили и др., 1997).

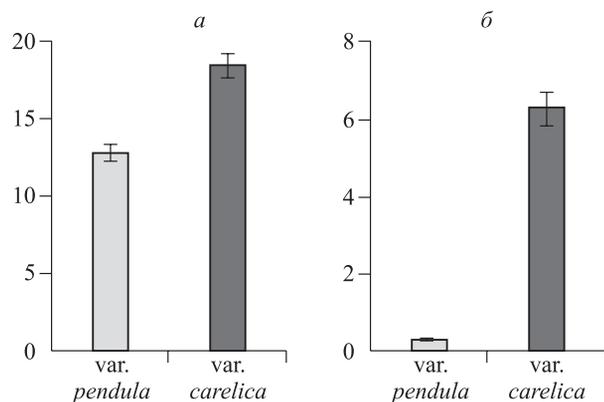


Рис. 2. Активность ПОД (мкмоль бензидина/мг белка) во флоэме (а) и ксилеме (б) у контрольных растений березы повислой в период активного роста.

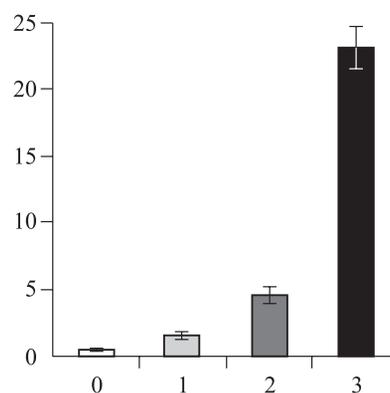


Рис. 3. Активность ПОД (мкмоль бензидина/мг белка) в ксилеме у контрольных растений березы повислой, отличающихся по степени проявления узорчатости древесины (указана по оси абсцисс в баллах: 0 – отсутствует, 1 – слабая, 2 – средняя, 3 – сильная).

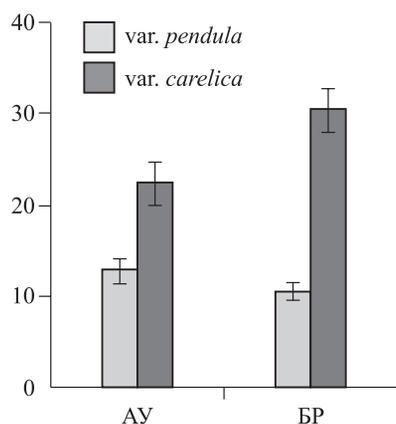


Рис. 4. Активность ПОД (мкмоль ТГ/мг белка) в листьях с АУ и БР у контрольных растений березы повислой в период активного роста.

Изучение распределения нитрата в листьях показало достоверное возрастание (в 1.6 раза) только у карельской березы в листьях с АУ (рис. 5, в).

Влияние нитрата калия на изменение активности ПОД в тканях ствола и в листьях березы. Внесение нитрата калия в почву у обычной березы не приводило к изменению активности ПОД во флоэме. В ксилеме активность ПОД возрастала, но значения ее не превышали 0.7 мкмоль ТГ/мг белка (рис. 6, а). У карельской березы активность фермента у опытных растений по сравнению с контрольными повысилась в 1.4 раза в ксилеме и в 1.3 раза во флоэме (рис. 6, б).

Внесение нитрата привело у var. *pendula* к возрастанию активности ПОД в листьях с АУ в 2 раза и в листьях с БР в 2.5 раза (рис. 7, а).

У растений var. *carelica* наблюдали противоположный эффект: активность ПОД при внесе-

нии нитрата снижалась в 1.5 раза в листьях с АУ и в 3.2 раза в листьях с БР (рис. 7, б).

В июле камбиальная зона и дифференцирующаяся ксилема являются основным местом потребления ассимилятов, донорами которых служат фотосинтезирующие листья. Проведенное исследование показало, что у 8-летних растений *B. pendula* в период камбиального роста активность ПОД во флоэме была выше по сравнению с ксилемой (см. рис. 2). Основная транспортная форма углерода – сахароза (Новицкая и др., 2015) вовлекается в обменные процессы только после расщепления ее ферментами метаболизации: сахарозосинтазой и инвертазой. Во флоэме у березы гидролиз сахарозы происходит преимущественно по инвертазному пути (Галибина и др., 2015б), в результате которого дисахарид расщепляется на глюкозу и фруктозу. Избыток гексоз утилизируется за счет работы цикла Кребса и пентозофосфатного пути. При этом образуются АФК за счет деятельности ферментов дегидро- и оксигеназ (Донцов и др., 2006; Soue et al., 2006; Wellen, Thompson, 2010) и синтезируются вещества фенольной природы. Фенолы могут стать субстратами пероксидазного окисления и привести к возрастанию пероксидазной активности во флоэме, в результате чего организм избавляется от вредного воздействия АФК (Андреев, 2001; Jansen et al., 2001; Rizhsky et al., 2002; Duroux, Welinder, 2003; Agati et al., 2012). В ксилеме березы повислой наблюдается высокая активность сахарозосинтазы (Галибина и др., 2015а), в результате чего появляется большое количество УДФ-глюкозы, идущей на синтез компонентов клеточных стенок, выводом тем самым углеродные субстраты из обмена веществ. Очевидно, изменение активности ПОД у березы

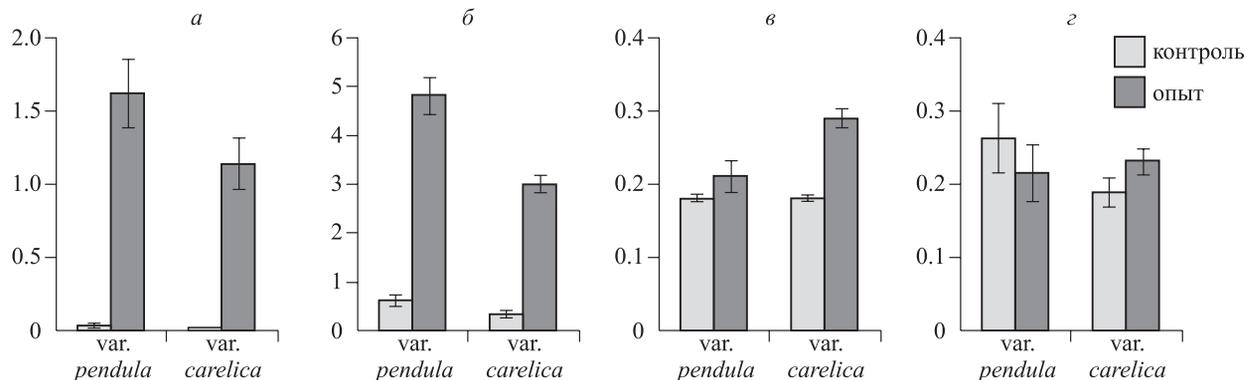


Рис. 5. Содержание нитратного азота в почве (а) (мг нитратного азота на 100 г сухой массы почвы), корнях (б), листьях с АУ (в) и с БР (г) (мг нитратного азота на 100 г сухой массы ткани) у контрольных и опытных растений обычной (var. *pendula*) и карельской (var. *carelica*) березы.

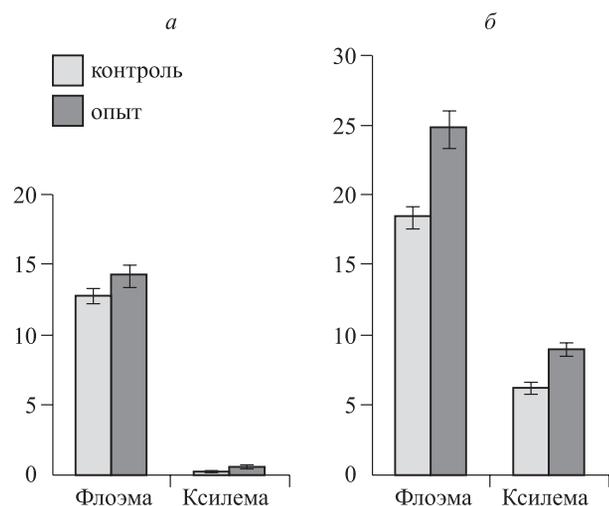


Рис. 6. Активность ПОД (мкмоль бензидина/мг белка) в тканях ствола у контрольных и опытных растений обычной (а) и карельской (б) березы повислой в период активного роста.

тесно связано с углеводным обменом. Ранее на 40-летних растениях *B. pendula* была показана отрицательная корреляция между активностью ПОД и интенсивностью камбиального роста: активность ПОД снижалась в июне (активный камбиальный рост) по сравнению с маем (камбий еще не активен) и повышалась в конце июля (временное торможение камбиальной активности продолжительными высокими температурами) (Галибина и др., 2013).

В период активного камбиального роста у 8-летних растений *B. pendula* var. *carelica* активность ПОД в тканях ствола была выше по сравнению с *B. pendula* var. *pendula* (см. рис. 2). Эти результаты согласуются с данными, полученными на 40-летних растениях березы повислой: в аномальных по строению тканях ствола карельской березы активность ПОД значительно превосходит таковую в тканях обычной березы повислой в течение всего сезона вегетации (Галибина и др., 2013). Формирование аномальных участков ствола карельской березы происходит на фоне низкой активности сахарозосинтазы в ксилеме (Галибина и др., 2015а). Следствием этого являются избыточное накопление сахарозы в клетках и выход ее в апопласт, где она активно расщепляется апопластной инвертазой с образованием глюкозы и фруктозы (Галибина и др., 2015б). Увеличение пула свободных гексоз в ксилеме и во флоэме у карельской березы (Галибина и др., 2015б), в свою очередь, может быть причиной высокой активности ПОД. Таким образом, высокие значения активности ПОД у узорчатых растений можно рассматривать как

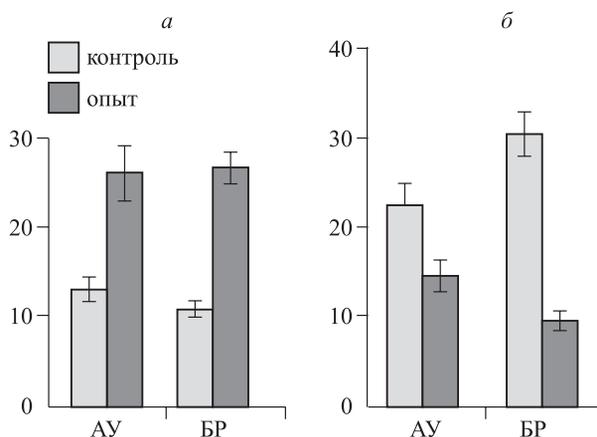


Рис. 7. Активность ПОД (мкмоль ТГ/мг белка) в листьях с АУ и БР у контрольных и опытных растений обычной (а) и карельской (б) березы в период активного роста.

следствие интенсивной метаболизации сахарозы в тканях ствола по инвертазному пути. При этом у 8-летних растений березы увеличение степени узорчатости древесины сопровождается возрастанием в ксилеме активности ПОД (см. рис. 3). На основании полученных результатов, а также наших предыдущих исследований выдвинуто предположение, что активность ПОД можно использовать как индикатор степени узорчатости растений карельской березы.

В результате многолетнего изучения карельской березы выдвинуто предположение, что формирование узорчатой древесины происходит при поддержании в камбиальной зоне определенного С/Н отношения, а именно избытка сахаров на фоне некоторого дефицита азотного питания. В условиях повышенного плодородия почвы изменение С/Н отношения в камбиальной зоне сопровождается появлением другой экологической формы березы повислой – грубокорой березы (Новицкая, 2008). Для изучения влияния избытка азота на активность ПОД растения березы обрабатывали нитратом калия. Увеличение нитратного азота в почве у опытных растений (см. рис. 5, а) приводило к возрастанию его содержания в корнях (см. рис. 5, б), что свидетельствует об активном поступлении нитратов из почвы в корни. В статье для обсуждения результатов, отражающих изменение пероксидазной активности у обеих форм березы повислой при внесении экзогенного нитрата, привлечены полученные ранее данные по активности ферментов метаболизации сахарозы (Галибина и др., 2016) (см. таблицу).

Активность апопластной инвертазы во флоэме и сахарозосинтазы в ксилеме (мкмоль распавшейся сахарозы на 1 г сырой ткани за 30 мин) у контрольных и опытных растений березы повислой (данные из статьи Галибиной и др., 2016)

Ткань / фермент	Форма <i>B. pendula</i>	Контрольные растения	Опытные растения
Флоэма / апопластная инвертаза	var. <i>pendula</i>	23.7 ± 2.1	24.4 ± 1.7
	var. <i>carelica</i>	53.9 ± 4.9	73.1 ± 8.8
Ксилема / сахарозосинтаза	var. <i>pendula</i>	9.0 ± 0.4	13.3 ± 0.5
	var. <i>carelica</i>	6.5 ± 0.5	3.0 ± 0.3

У *B. pendula* var. *pendula* внесение нитрата привело к возрастанию активности ПОД в листьях с АУ и БР (см. рис. 7, а) (Chikov et al., 2003; Chikov, Bakirova, 2004; Баташева, 2006). 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 при этом апопластную инвертазу. Известно, что образующиеся при гидролизе сахарозы глюкоза и фруктоза не могут загружаться во флоэму (Туркина и др., 1999), и, следовательно, отток ассимилятов из листьев будет снижаться. Можно предположить, что увеличение активности ПОД в листьях обычной березы произошло в результате снижения оттока сахаров к акцепторным органам под влиянием нитратов. При этом активность ПОД в тканях ствола не изменялась (см. рис. 6, а). Ранее нами показано, что у var. *pendula* действие экзогенных нитратов приводило к увеличению активности сахарозосинтазы в ксилеме и не сопровождалось изменением активности апопластной инвертазы (см. таблицу).

У растений var. *carelica* наблюдали противоположный эффект: при внесении нитрата активность ПОД снижалась в листьях с АУ и БР (см. рис. 7, б). Влияние нитрата у карельской березы приводило к увеличению метаболизации сахарозы во флоэме по инвертазному пути (Галибина и др., 2016) (см. таблицу). При этом повышалась активность ПОД во флоэме и ксилеме (см. рис. 6, б). Возрастание запроса на ассимилянты со стороны флоэмы у опытных растений карельской березы могло привести к увеличению оттока сахарозы из листа и, следовательно, к снижению активности ПОД в листе.

Таким образом, у обычной березы нитраты стимулируют ростовые процессы в ксилеме, приводящие к снижению в стволе свободных углеводных субстратов и активности ПОД. У карельской березы под воздействием нитрат-

ного азота существенно возрастает использование сахарозы с участием апопластной инвертазы во флоэме и ксилеме. Подобные метаболические изменения сопровождаются повышением активности ПОД, что свидетельствует об интенсивных процессах дыхания, запасаения и вторичного утолщения клеточных стенок. В наших предыдущих исследованиях установлено, что в тканях ксилемы карельской березы по сравнению с обычной выше жесткость структуры клеточной стенки за счет увеличения доли компонентов фенольной природы как в составе лигнина, так и в виде поперечных диферуловых мостиков (Галибина, Терехова, 2014).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, между 8-летними деревьями карельской березы с узорчатым строением древесины ствола и растениями без признаков структурных аномалий обнаружены отличия в распределении пероксидазной активности: у карельской березы активность ПОД значительно выше. Высокие значения активности ПОД во флоэме у березы наблюдаются на фоне увеличения свободных гексоз. Высказано предположение, что локальное нарушение камбиальной деятельности у карельской березы в результате снижения ростовых процессов и интенсивного использования ассимилятов в дыхании и синтезе запасных метаболитов приводит к повышению в клетках АФК и сопровождается увеличением активности ПОД. Активность ПОД у 8-летних *B. pendula* возрастает с увеличением степени узорчатости древесины.

Поступление избытка нитратного азота сопровождалось у карельской березы увеличением активности ПОД в ксилеме и особенно во флоэме, что свидетельствует о возрастании в этих тканях свободной сахарозы. Нормальное осуществление флоэмного транспорта возможно только при условии поддержания относительно невысокого уровня сахарозы в зоне разгрузки, что наблюдается у обычной березы (Новицкая и

др., 2015). При высокой концентрации сахарозы в ситовидных трубках и паренхимных клетках проводящей флоэмы включаются дополнительные механизмы утилизации дисахарида: синтез крахмала, танинов, склерификация паренхимы в непосредственной близости от камбия. В результате клетки камбиальной зоны, которые в процессе развития должны были потерять протопласт, сохраняют его и превращаются в клетки запасающей паренхимы (Новицкая, 2008). Наш эксперимент продемонстрировал, что внесение нитратного азота усугубляет эти процессы у карельской березы. Вероятно, поэтому березы, произрастающие на плодородных почвах, согласно описаниям Л. Л. Новицкой (2008), образуют толстую кору, и в результате появляются грубокорые формы березы.

Работа выполнена в рамках государственного задания Института леса Карельского научного центра РАН.

Авторы выражают благодарность И. Н. Софроновой и М. Н. Подгорной за помощь в проведении биохимических исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Андреев В. П., Соболев П. С., Зайцев Д. О., Галибина Н. А., Зыкина Н. С., Плясунова Л. Ю., Романова М. И. Взаимодействие цинк-тетрафенилпорфирина, бромистого пропаргила и пероксидазы хрена с анилинами // Уч. зап. ПетрГУ. Сер. Естеств. и техн. науки. 2011. № 6 (119). С. 7–15.
- Андреев И. М. Функции вакуоли в клетках высших растений // Физиол. раст. 2001. Т. 48. № 5. С. 777–778.
- Баташева С. Н. Нитратный ион в апопласте растения: влияние на фотосинтез и транспорт ассимилятов: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.12. Казань: Ин-т биохим. и биофиз. Казанск. науч. центра РАН, 2006. 24 с.
- Баташева С. Н., Абдрахимов Ф. А., Бакирова Г. Г., Исаева Э. В., Чиков В. И. Влияние донора оксида азота – нитропруссиды натрия – на фотосинтез и ультраструктуру листовых пластинок льна-долгунца // Физиол. раст. 2010. Т. 57. № 3. С. 398–403.
- Викторова Л. В., Максютлова Н. Н., Трифонова Т. В., Андрианов В. В. Образование пероксида водорода и оксида азота при введении нитрата и нитрита в апопласт листьев пшеницы // Биохимия. 2010. Т. 75. № 1. С. 117–124.
- Галибина Н. А., Новицкая Л. Л., Красавина М. С., Мощенская Ю. Л. Активность сахарозсинтазы в тканях ствола карельской березы в период камбиального роста // Физиол. раст. 2015а. Т. 62. № 3. С. 410–419.
- Галибина Н. А., Новицкая Л. Л., Красавина М. С., Мощенская Ю. Л. Активность инвертазы в тканях ствола карельской березы // Физиол. раст. 2015б. Т. 62. № 6. С. 804–813.
- 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.
- Галибина Н. А., Терехова Е. Н. Физико-химические свойства клеточных стенок тканей ствола деревьев *Betula pendula* Roth // Уч. зап. ПетрГУ. Сер. Естеств. и техн. науки. 2014. № 4 (141). С. 19–25.
- Галибина Н. А., Целищева Ю. Л., Андреев В. П., Софронова И. Н., Никерова К. М. Активность пероксидазы в органах и тканях березы повислой // Уч. зап. ПетрГУ. Сер. Естеств. и техн. науки. 2013. № 4 (133). С. 7–13.
- Донцов В. И., Крутько В. Н., Мрикаев Б. М., Уханов С. В. Активные формы кислорода как система: значение в физиологии, патологии и естественном старении // Тр. ИСА РАН. 2006. Т. 19. С. 50–69.
- Дубовская Л. В., Колеснева Е. В., Князев Д. М., Вологовский И. Д. Защитная роль оксида азота при окислительном стрессе, индуцированном в растениях табака пероксидом водорода // Физиол. раст. 2007. Т. 54. № 6. С. 847–855.
- Ермаков В. И. Механизмы адаптации березы к условиям Севера. Л.: Наука. Ленингр. отд-ние, 1986. 144 с.
- Карпец Ю. В., Колупаев Ю. Е., Ястреб Т. О. Влияние нитропруссиды натрия на теплоустойчивость coleoptилей пшеницы: связь эффектов с образованием и обезвреживанием активных форм кислорода // Физиол. раст. 2011. Т. 58. № 6. С. 883–890.
- Коровин В. В., Новицкая Л. Л., Курносков Г. А. Структурные аномалии стебля древесных растений. М.: МГУЛ, 2003. 259 с.
- Любавская А. Я. Карельская береза. М.: Лесн. пром-сть, 1978. 158 с.
- Машина О. С., Табацкая Т. М., Исаков Ю. Н. Клональное размножение березы карельской // Лесн. хоз-во. 2000. № 4. С. 33–34.
- Новицкая Л. Л. Карельская береза: механизмы роста и развития структурных аномалий. Петрозаводск: Verso, 2008. 144 с.
- Новицкая Л. Л., Галибина Н. А., Никерова К. М. Транспорт и запасание сахаров во флоэме двух форм березы повислой, различающихся по текстуре древесины (*Betula pendula* Roth var. *pendula* и var. *carelica*) // Тр. Карельск. науч.

- центра РАН. Сер. Эксперимент. биол. 2015. № 11. С. 35–47.
- Попов В. К., Авраменко Р. С., Филоненко Е. В. Способ диагностики узорчатой древесины карельской березы // Описание изобретения к патенту Российской Федерации. 1996. № 2063679.
- Туркина М. В., Павлинова О. А., Курсанов А. И. Развитие исследований природы флоэчного транспорта: активность проводящих элементов // Физиол. раст. 1999. Т. 46. № 5. С. 811–822.
- Хамидуллина Л. А., Абдрахимов Ф. А., Баташева С. Н., Фролов Д. А., Чиков В. И. Влияние введения нитратов в апопласт побега на фотосинтез и транспорт ассимилятов у симпластных и апопластных растений // Физиол. раст. 2011. Т. 58. № 3. С. 420–426.
- Харитонашвили Е. В., Лебедева Г. В., Плюснина Т. Ю., Ризниченко Г. Ю., Алехина Н. Д. Эмпирическая модель регуляции метаболизма нитрата в корнях проростков пшеницы // Физиол. раст. 1997. Т. 44. № 4. С. 568–575.
- Agati G., Azzarello E., Pollastri S., Tattini M. Flavonoids as antioxidants in plants: location and functional significance // Plant Sci. 2012. V. 196. P. 67–76.
- Batasheva S. N., Abdrakhimov F. A., Bakirova G. G., Chikov V. I. Effect of nitrates supplied with the transpiration flow on assimilate translocation // Rus. J. Plant Physiol. 2007. V. 54. N. 3. P. 373–380.
- Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding // Anal. Biochem. 1976. V. 72. N. 1–2. P. 248–254.
- Chikov V. I., Avvakumova N. Yu., Bakirova G. G. Postphotosynthetic utilization of labeled assimilates in fiber flax // Biol. Bull. 2003. V. 30. N. 4. P. 377–382.
- Chikov V. I., Bakirova G. G. Role of the apoplast in the control of assimilate transport, photosynthesis, and plant productivity // Rus. J. Plant Physiol. 2004. V. 51. N. 3. P. 420–431.
- Correa-Aragunde N., Foresi N., Delledonne M., Lamattina L. Auxin induces redox regulation of ascorbate peroxidase 1 activity by S-nitrosylation/denitrosylation balance resulting in changes of root growth pattern in *Arabidopsis* // J. Exp. Bot. 2013. V. 64. N. 11. P. 3339–3349.
- Couee I., Sulmon C., Gouesbet G., El Amrani A. Involvement of soluble sugars in reactive oxygen species balance and responses to oxidative stress in plants // J. Exp. Bot. 2006. V. 57. N. 3. P. 449–459.
- Dani V., Simon W. J., Duranti M., Croy R. R. Changes in the tobacco leaf apoplast proteome in response to salt stress // Proteomics. 2005. V. 5. N. 3. P. 737–745.
- Duroux L., Welinder K. G. The peroxidase gene family in plants: a phylogenetic overview // J. Mol. Evol. 2003. V. 57. N. 4. P. 397–407.
- Friemann A., Lange M., Hachtel W., Brinkmann K. Induction of nitrate assimilatory enzymes in the tree *Betula pendula* // Plant Physiol. 1992. V. 99. N. 3. P. 837–842.
- Gechev T. S., Van Breusegem F., Stone J. M., Denev I., Laloi C. Reactive oxygen species as signals that modulate plant stress responses and programmed cell death // Bioessays. 2006. V. 28. N. 11. P. 1091–1101.
- Hachtel W., Strater T. The nitrate reductase promoter of birch directs differential reporter gene expression in tissues of transgenic tobacco // Plant and Soil. 2000. V. 221. N. 1. P. 33–38.
- Hiraga S., Sasaki K., Ito H., Ohashi Y., Matsui H. A large family of class III plant peroxidases // Plant Cell Physiol. 2001. V. 42. N. 5. P. 462–468.
- Jansen M. A. K., Van den Noort R. E., Tan M. Y., Prinsen E., Lagrimini L. M., Thorneley R. N. Phenoloxidizing peroxidases contribute to the protection of plants from ultraviolet radiation stress // Plant Physiol. 2001. V. 126. N. 3. P. 1012–1023.
- Le Hir R., Leduc N., Jeannette E., Viemont J. D., Pelleschi-Travier S. Variations in sucrose and ABA concentrations are concomitant with heteroblastic leaf shape changes in a rhythmically growing species (*Quercus robur*) // Tree Physiol. 2006. V. 26. N. 2. P. 229–38.
- 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. N. 1. P. 18–29.
- Rizhsky L., Hallak-Herr E., Van Breusegem F., Rachmilevitch S., Barr J. E., Rodermel S., Inzé D., Mittler R. Double antisense plants lacking ascorbate peroxidase and catalase are less sensitive to oxidative stress than single antisense plants lacking ascorbate peroxidase or catalase // Plant J. 2002. V. 32. N. 3. P. 329–342.
- Wellen K. E., Thompson C. B. Cellular metabolic stress: considering how cells respond to nutrient excess // Mol. Cell. 2010. V. 40. N. 2. P. 323–332.
- Wilson I. D., Neill S. J., Hancock J. T. Nitric oxide synthesis and signaling in plants // Plant, Cell and Environ. 2008. V. 31. N. 5. P. 622–631.

THE INFLUENCE OF NITRATE NITROGEN ON THE PEROXIDASE ACTIVITY IN TISSUES OF *Betula pendula* Roth var. *pendula* and *B. pendula* var. *carelica* (Mercklin)

K. M. Nikerova, N. A. Galibina

Forest Research Institute, Karelian Research Centre, Russian Academy of Sciences
Pushkinskaya str., 11, Petrozavodsk, Republic of Karelia, 185910 Russian Federation

E-mail: knikerova@yandex.ru, galibina@krc.karelia.ru

We studied the peroxidase activity during the period of active cambial growth in two forms of 8-year-old Silver birch trees with different degrees of manifestation of wood grain figure: *Betula pendula* var. *pendula* and *Betula pendula* var. *carelica*. We selected leaves from short shoots and leaves from long shoots, small roots, xylem and phloem for the analysis. It was determined that peroxidase activity in *B. pendula* var. *carelica* was higher than in *B. pendula* var. *pendula*. The more the degree of manifestation of wood grain figure was in *Betula pendula* var. *carelica*, the more the peroxidase activity in xylem was. It was suggested that local violation of cambial activity in *Betula pendula* var. *carelica* leads to increased quantity of reactive oxygen species and it can enhance the peroxidase activity. To identify the response of birch plants under the excess of nitrogen fertilizers, we studied the influence of nitrate on the peroxidase activity. This investigation was made for the first time. Application of nitrate had led to the increase in the peroxidase activity in xylem and phloem only in *Betula pendula* var. *carelica*. In *Betula pendula* var. *pendula* the peroxidase activity in xylem and phloem has not changed under the application of nitrogen fertilizers. Application of KNO_3 gave multidirectional changes in leaves in both forms. Peroxidase activity in *B. pendula* var. *pendula* increased, but activity of the enzyme in *B. pendula* var. *carelica* decreased.

Keywords: Karelian birch, abnormal xylogenesis, peroxidase, application of nitrate.

How to cite: Nikerova K. M., Galibina N. A. The influence of nitrate nitrogen on the peroxidase activity in tissues of *Betula pendula* Roth var. *pendula* and *B. pendula* var. *carelica* (Mercklin) // *Sibirskij Lesnoj Zhurnal* (Siberian Journal of Forest Science). 2017. N. 1: 15–24 (in Russian with English abstract).