



ХИМИЧЕСКАЯ ПЕРЕРАБОТКА ДРЕВЕСИНЫ

УДК 577.15.08: 58.01:581.5

К.Г. Боголицын, М.В. Сурсо, М.А. Гусакова, И.Н. Зубов

Институт экологических проблем Севера УрО РАН

Боголицын Константин Григорьевич родился в 1949 г., окончил в 1971 г. Архангельский лесотехнический институт, доктор химических наук, профессор, директор Институт экологических проблем Севера УрО РАН, проректор по научной работе, зав. кафедрой теоритической и прикладной химии Северного (Арктического) федерального университета имени М.В. Ломоносова, засл. деятель науки РФ. Имеет более 480 научных работ в области развития фундаментальных принципов «зеленой» химии и разработки физико-химических основ процесса переработки древесины.

Тел.: (8182) 28-55-40

Сурсо Михаил Вольдемарович родился в 1961 г., окончил в 1983 г. лесохозяйственный факультет Архангельского лесотехнического института, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник Института экологических проблем Севера УрО РАН. Имеет 60 научных работ в области эмбриологии, анатомии и морфологии голосеменных, генетики популяций, лесного семеноведения.

E-mail: surso@ierp.ru

Гусакова Мария Аркадьевна окончила в 1989 г. Архангельский лесотехнический институт, кандидат технических наук, старший научный сотрудник лаборатории химии растительных биополимеров Института экологических проблем Севера УрО РАН. Имеет более 80 научных трудов в области химии древесины.

Тел.: (8182) 28-55-40

Зубов Иван Николаевич родился в 1988 г., окончил в 2010 г. Северный (Арктический) федеральный университет, аспирант лаборатории химии растительных биополимеров Института экологических проблем Севера УрО РАН. Имеет более 10 научных трудов в области химии древесины.

E-mail: zubov.ivan@bk.ru

ДИНАМИКА СЕЗОННЫХ И ВОЗРАСТНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ ПАРАМЕТРА АКТИВНОСТИ ПЕРОКСИДАЗЫ В ХВОЕ МОЖЖЕВЕЛЬНИКА ОБЫКНОВЕННОГО (*JUNIPERUS COMMUNIS* L.)*

В процессе роста и развития древесных растений происходит изменение состава и, как следствие, свойств и строения древесного композита, а также ферментативных комплексов – неотъемлемых составляющих живой клетки. Одними из наиболее

* Исследования выполнены на оборудовании ЦКП КТ РФ-Арктика (ИЭПС, ИФПА УрО) в рамках проекта УрО РАН 12-М-45–2012 «Влияние абиотических факторов на структуру и свойства надмолекулярных комплексов биополимеров растительной клетки» (Программа междисциплинарных фундаментальных исследований, выполняемых в нескольких организациях УрО РАН, относящихся к разным объединенным ученым советам УрО РАН).

© Боголицын К.Г., Сурсо М.В., Гусакова М.А., Зубов И.Н., 2013

важных и распространенных ферментов высших растений являются пероксидазы. Возрастные изменения параметра активности пероксидазы и содержания лигнина имеют схожий характер, однако сезонные колебания активности фермента могут нивелировать возрастную динамику. Цель данной работы – определение сезонных колебаний параметра активности пероксидазы в хвое можжевельника и оценка их вклада в возрастную динамику.

Показано, что при относительно ровном течении климатических факторов северной подзоны тайги динамика сезонных изменений параметра пероксидазной активности в хвое можжевельника зависит от пола растения и стадии репродуктивного развития. Созреванию шишкоягод сопутствует рост пероксидазной активности, однако возраст можжевельника оказывает определяющее воздействие на данный параметр.

Ключевые слова: ферментативная активность, пероксидаза, сезонные колебания, возрастная динамика, можжевельник.

Анализ ферментативной активности имеет особое значение при оценке уровня физиологического состояния растений [2]. Одними из наиболее важных и распространенных ферментов высших растений являются пероксидазы (ПО), которые представлены генетически разнородными белками [1, 10]. Повсеместное присутствие ПО в растительных и животных тканях, а также в составе метаболитов грибов и бактерий дает основание считать этот фермент жизненно важным соединением высших и низших организмов.

Изменение активности пероксидазы (АПО) и спектров ее изоформ изучено при действии низких и высоких температур, гормонов, в условиях дефицита минерального питания, засухи, засоления, в отклике на поранение и другие неблагоприятные факторы [6, 11, 12, 14, 15, 18]. Универсальность активизации ПО при различных стрессах, а также участие во многих физиологических процессах в растениях связана с разнообразием генов, кодирующих этот фермент [17, 19].

Согласно общепринятому представлению, основной функцией ПО является защита организма от вредного действия активных форм кислорода, образующихся при фотосинтезе и дыхании [11, 13]. Активизация ПО под влиянием неблагоприятных воздействий – характерная ответная реакция растений, обеспечивающая нормальный ход окислительных процессов. Таким образом, показатель активности ПО можно использовать в качестве диагностического признака жизненного состояния растений.

В процессе роста и развития древесного растения происходят как качественные, так и количественные изменения состава, свойств и строения древесного композита, а также ферментативных комплексов – неотъемлемых составляющих живой клетки. Ранее нами уже проводились исследования по оценке возрастной изменчивости активности растительных ПО [4]. Однако сезонные колебания пероксидазной активности могут нивелировать ее возрастную динамику.

Целью данной работы являлась оценка сезонных колебаний параметра АПО в хвое можжевельника и их вклада в возрастную динамику.

В качестве объекта исследования нами был выбран можжевельник обыкновенный (*Juniperus communis* L.) как наименее изученный, представитель хвойных видов тундровой зоны [3, 7, 8, 16].

На основе анализа ландшафтно-геологических факторов нами была выбрана тестовая площадка в окрестностях д. Ижма Приморского района Архангельской области (географические координаты: 64°43' с.ш., 40°48' в.д.). Площадка находится вне зоны техногенного воздействия (рис. 1). Участок представляет собой опушку производного смешанного разновозрастного сосново-елово-березового древостоя с редкой примесью ивы козьей (*Salix caprea*) в древесном ярусе. Тип леса – сосняк черничный. Участок граничит с заброшенными сенокосными угодьями. Почва среднеподзолистая, слабо оглеенная, легко суглинистая на среднем моренном суглинке.

На участке произрастают можжевельники преимущественно семенного происхождения. Возраст наиболее старых растений от 60...70 до 80...90 лет. Растения представляют собой типичную форму можжевельника обыкновенного (*Juniperus communis* L. f. *typica*): кустарники или невысокие деревца, стволы начинают ветвиться на некоторой высоте от поверхности почвы или не ветвятся. Крона плотная, густо охвоенная, узко эллипсовидная (кипарисовидная), заостренная кверху. Максимальная высота растений 6 ... 8 м.

Образцы хвои отбирали с растений можжевельника обыкновенного разных возрастов в период с июня по сентябрь 2012 г. Возраст растений определяли на поперечных спилах или по кернам, взятым вблизи шейки корня стволиков. Подсчет годовичных колец производили при помощи бинокулярного микроскопа МБС-10 (увеличение окуляра ×8, объектива – ×2). Возраст исследованных можжевельников варьировался от 17 до 82 лет.

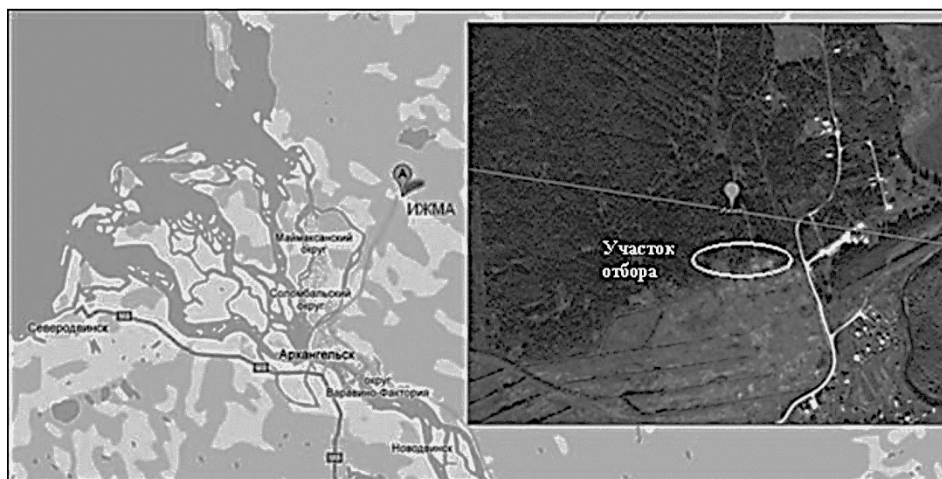


Рис. 1. Участок отбора проб хвои и древесины можжевельника

Параметр АПО хвои определяли по методике [9], доработанной и адаптированной нами для растительного сырья.

Навеску хвои массой 20...200 мг с небольшим количеством 0,1 М калий-фосфатного буфера (рН 7,0) растирали в фарфоровой ступке и доводили до 25 мл. Гомогенат выдерживали 15 мин при температуре 25 °С, после чего фильтровали через двойной бумажный фильтр, фильтрат использовали в качестве препарата ПО.

АПО хвои определяли при температуре 25 °С по скорости окисления 1,5 мМ гваякола («Sigma») 0,68 мМ пероксидом водорода в 0,1 М калий-фосфатном буфере (рН 7,0) при $\lambda = 417$ нм на УФ-спектрофотометре Shimadzu UV-1800.

Концентрацию пероксида водорода определяли спектрофотометрически при $\lambda = 240$ нм. Оптическая плотность раствора относительно воды должна составлять 0,40...0,41.

Для расчета АПО хвои (в условных единицах, принятых в пределах данного исследования) использовали следующую формулу:

$$\text{АПО} = (4RV_i\Delta A) / (\varepsilon m), \quad (1)$$

где 4 – переводной коэффициент;

R – разбавление;

V_i – объем реакционной смеси в кювете, $V_i = 3$ мл;

ΔA – изменение оптической плотности во времени, ед. опт. плотности/мин;

ε – микромолярный коэффициент экстинкции тетрагваякола, $\text{см}^2/\text{мкМ}$;

m – масса навески хвои, мг.

Данные об АПО в хвое можжевельника, произрастающего в Приморском районе Архангельской области и отобранного в период с июня по сентябрь 2012 г., представлены в таблице.

№ образца	Возраст дерева, лет	АПО	ΔАПО	АПО ср
		е.а.		
1	67	9,32...15,36	6,04	11,86
2	82	14,36...23,06	8,70	17,74
3	63	5,74...12,36	6,62	8,03
4	45	1,53...8,44	6,91	3,89
5	32	4,78...10,91	6,13	6,75
6	25	6,20...20,91	14,71	16,95
7	47	3,09...4,72	1,63	4,16
8	33	10,80...17,20	6,40	13,86
9	34	8,13...10,49	2,36	9,23
10	71	7,62...16,57	8,95	11,76
11	17	13,37...19,30	5,93	16,25
12	27	7,95...16,09	8,14	12,37
13	32	8,12...11,84	3,72	10,57
14	35	6,85...8,95	2,71	8,48

Из данных таблицы видно, что колебания АПО в хвое можжевельника имеют довольно широкий диапазон. Например, сезонные изменения АПО варьируют от 1,63 до 14,71 е.а., однако для основной массы анализируемых образцов этот параметр составляет 6...9 е.а.

Можно предположить, что при относительно ровном течении климатических факторов (отсутствие сильной жары, заморозков, засухи и избыточного переувлажнения почвы) вегетационного периода 2012 г. на участках леса вне зоны техногенных эмиссий и минимизированного антропогенного воздействия основными факторами сезонных колебаний АПО в хвое можжевельника являются развитие и созревание семян.

Примордии макростробилов закладываются на женских особях в пазухах хвои побегов второго года жизни. Семена созревают на третий год к середине вегетационного периода, когда шишкочагоды все еще остаются зелеными. Зрелые шишкочагоды темно-синие, позднее – иссиня-черные.

Сроки созревания шишкочагод исследованных можжевельников представлены ниже.

Сроки созревания № образца	Июнь	Июль	Август	Сентябрь
	–	6, 12, 13	1, 3, 7, 14	5

С учетом сроков созревания исследуемые особи можжевельника были разбиты на три группы (рис. 2): I – деревья, на которых шишкочагоды не были обнаружены; II – деревья с шишкочагодами, созревшими в июле; III – деревья с шишкочагодами, созревшими в августе – сентябре

Для большинства исследованных образцов АПО хвои можжевельника имеет максимум в начале вегетационного периода (конец мая – начало июня), после чего наблюдается снижение ферментативной активности. Особенно ярко эта тенденция проявляется для деревьев I группы. Таким образом, к этой группе отнесены мужские растения, а также растения, не вступившие в репродуктивную стадию.

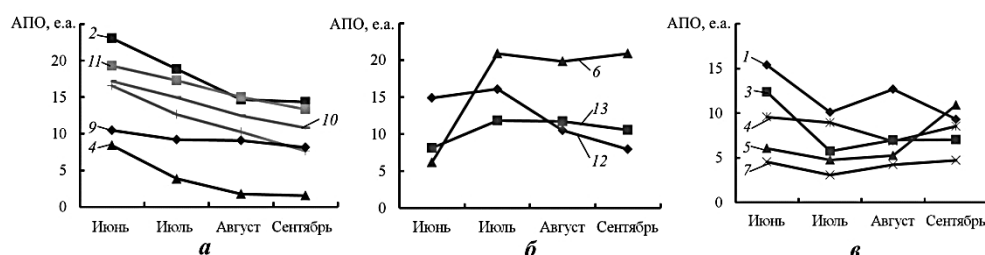


Рис. 2. Сезонное изменение АПО в хвое можжевельника: а – деревья без шишкочагод (группа I); б – деревья с шишкочагодами, созревшими в июле (II); в – деревья с шишкочагодами, созревшими в августе – сентябре (III) (см. обозначения в таблице)

Для двух других групп (II и III) наблюдается появление пика (максимума) АПО, его смещение и рассеивание в течение вегетационного периода. Так, для образцов 6, 12, 13 и 1, 3, 5, 7, 14 максимум АПО приходится соответственно на июль и август–сентябрь, что по времени совпадает с периодом созревания шишкоягод.

Вероятно, процессу созревания семян на женских особях можжевельника сопутствует активизация растительных ПО, которая поддерживается на протяжении периода дозревания шишкоягод, после чего наблюдается снижение АПО. Размывание максимума АПО, а следовательно, и сроков созревания шишкоягод можно объяснить неравномерностью сроков прохождения фаз женского генеративного цикла у разных особей можжевельника.

Помимо сезонных колебаний АПО отдельных растений, для можжевельника характерен широкий интервал средних значений: от 3,89 до 17,74 е. а., вероятно связанный с возрастом исследуемых деревьев [4]. Поэтому после конечного (в сентябре) отбора образцов хвои нами были получены образцы древесины для определения возраста исследуемых деревьев можжевельника и проверки этого предположения. Данные о возрасте исследованных образцов приведены в таблице.

На рис. 3 представлена динамика возрастных изменений АПО в период с июня по сентябрь.

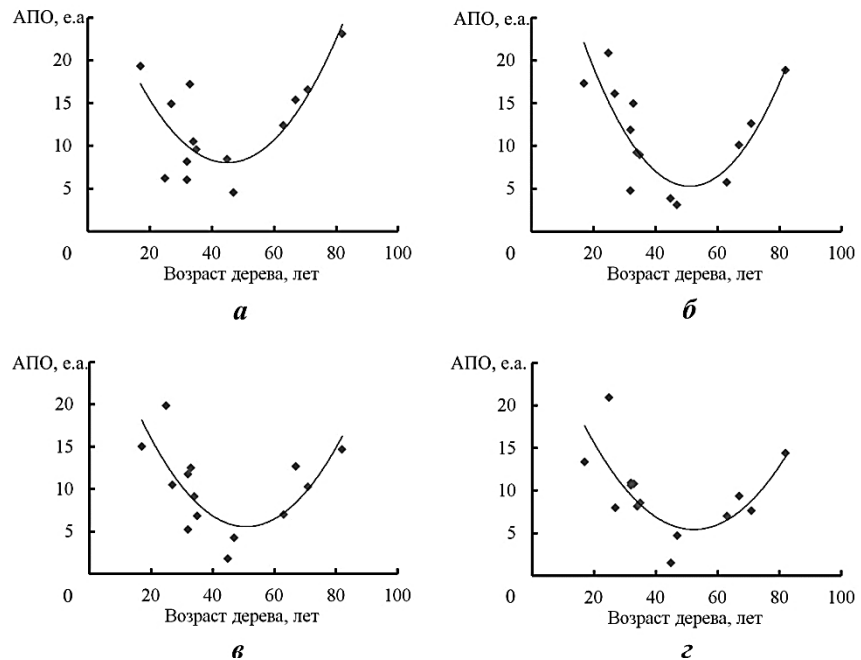


Рис. 3. Возрастная изменчивость АПО в хвое можжевельника:
а – июнь; *б* – июль; *в* – август; *з* – сентябрь

Из рис. 3 видно, что хвоя молодых можжевельников характеризуется наивысшим значением АПО. По достижении возраста 45...50 лет наблюдается спад ферментативной активности, после которого наступает ее рост. Учитывая, что данная тенденция характерна для всех периодов отбора хвои, можно говорить о незначительном вкладе сезонных колебаний в возрастную зависимость АПО в хвое можжевельника.

Из ряда публикаций [5, 20] известно, что в растениях на ранних стадиях роста процессы биосинтеза протекают наиболее интенсивно, следовательно, для них характерен повышенный уровень активности ферментативных комплексов, вовлеченных в процесс формирования древесного вещества. С увеличением возраста дерева процессы биосинтеза в нем замедляются и по достижении 45...50 лет (середина жизненного цикла большинства можжевеловых деревьев, произрастающих в этом регионе) АПО начинает возрастать, проходя перед этим через промежуточный минимум. Из-за ограниченности жизненного цикла исследованных можжевельников и для продолжения зависи-

мости, представленной на рис. 4, нами использовались ранее полученные данные об АПО в хвое более высоковозрастных образцов можжевельника обыкновенного (*Juniperus communis* L.), также произрастающих в северной подзоне тайги Архангельской области.

Дальнейший рост АПО продолжается до возраста 90 лет. По достижении 90...110 лет в древесине можжевельника отмечается снижение общего содержания лигнина, но при этом запас экстрактивных веществ резко возрастает [4]. По-видимому, это связано с нарушением окислительно-восстановительного баланса и преобладанием окислительных и дегидрогенизационных процессов, а также с образованием хинонных форм при достижении можжевельником возраста зрелой древесины.

Выводы

1. При относительно ровном течении климатических факторов северной подзоны тайги динамика сезонных изменений АПО в хвое можжевельника зависит от пола растения и стадии репродуктивного развития.

2. Определяющее воздействие на АПО в хвое можжевельника оказывает возраст дерева.

3. АПО в хвое можжевельника может быть использована в качестве диагностического признака жизненного состояния можжевеловых деревьев.

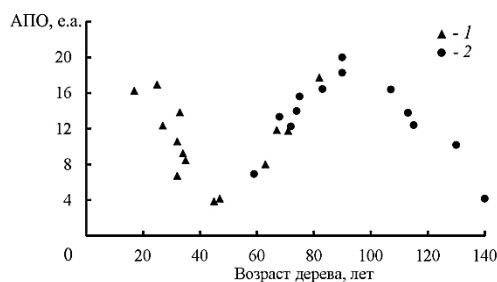


Рис. 4. Возрастная изменчивость средних значений АПО в хвое можжевельника: 1 – Ижма, 2 – северная тайга

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алексеев В.Г., Кершенгольц Б.М., Попов А.А. О характере изменения свойств пероксидазы при адаптации растений к экстремальным условиям Севера // Физиология растений. 1983. № 6. С. 1094–1101.
2. Андреева В.А. Фермент пероксидаза: Участие в защитном механизме растений. М.: Наука, 1988. 128 с.
3. Барзут О.С. Эколого-географическая изменчивость можжевельника обыкновенного (*Juniperus communis* L.) в лесах Архангельской области: автореф. ... канд. с-х. наук. Архангельск: Изд-во АГТУ, 2007. 18 с.
4. Влияние абиотических факторов на формирование лигноуглеводной матрицы древесины можжевельника / И.Н. Зубов [и др.] // Лесн. журн. 2012. № 1. С. 113–120. (Изв. высш. учеб. заведений).
5. Горшкова Т.А. Биогенез растительных волокон / Под ред. Т.А. Горшковой; Казан. ин-т биохимии и биофизики КазНЦ. М.: Наука, 2009. 260 с.
6. Структурно-функциональные особенности изопероксидаз растений / И.В. Максимов [и др.] // Биохимия. 2011. Т. 76, № 6. С. 749–763.
7. Сурсо М.В., Барзут О.С. Особенности роста и развития хвойных в Большеземельской тундре. Можжевельник в урочище Пым-Ва-Шор // Лесн. вестник / МГУЛ. 2010. № 6 (75). С. 18–21.
8. Сурсо М.В. Лесообразующие хвойные Европейского Севера России. Екатеринбург: УрО РАН, 2007. 256 с.
9. Bergmeyer H.U. Methods of enzymatic analysis. I Academic Press New York, 2nd Edition, 1974. 495 p.
10. Biotechnology in trees: Towards improved paper pulping by lignin engineering / C.Y. Chen, M. Baucher, J.H. Christensen, W. Boergan // Euphytica. 2001. Vol. 118. P.185–195.
11. Cosio C., Dunand C. Specific functions of individual class III peroxidase genes // Journal of Experimental Botany. 2009. Vol. 60. P. 391–408.
12. Enhanced ethylene production and peroxidase activity in IAA-overproducing transgenic tobacco plants is associated with increased lignin content and altered lignin composition // F. Sitbon, S. Hennion, C.H.A. Little, B. Sundberg // Plant Science. 1999. Vol. 141. P.165–173.
13. Galves-Valdivieso, Mullineaux P.M G. The role of reactive oxygen species in signalling from chloroplasts to the nucleus // Phisiol. Plant. 2010. Vol. 138. P. 430–439.
14. Lehner G. Cardemil L. Differences in wound-induced changes in cell-wall peroxidase activities and isoform patterns between seedlings of *Prosopis tamarugo* and *Prosopis chilensis* // Tree Phisiology. 2003. Vol. 23. P. 443–452.
15. Morkunas I., Gmerek J. The possible involvement of peroxidase in defense of yellow lupine embryo axes against *Fusarium oxysporum* // Journal of Plant Phisiology. 2007. Vol.164. P.185–194.
16. Pan-Arctic variation in *Juniperus communis*: historical biogeography based on DNA fingerprinting / R.P. Adams [et al.] // Biochemical Systematics and Ecology. 2003. N 31. P. 181–192.
17. Preparation and Application of Cd Te Nanocrystals / H. Zhao, B.C. Wang, H.C. Zhao, J.B. Wang // Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 2005. Vol. 44. P. 36–40.

18. Reactive oxygen species generation and peroxidase activity during *Oidium neolycopersici* infection on *Lycopersicon* species / K. Mlickova [et al.] // *Plant Physiol. Biochem.* 2004. Vol. 42. P. 753–761.

19. Wyrwicka A., Sklodowska M. Influence of repeated acid rain treatment on antioxidative enzyme activities and on lipid peroxidation in cucumber leaves // *Environmental and Experimental Botany.* 2006. Vol. 56. P. 198–204.

20. Vermerris W., Nicholson R. *Phenolic Compound Biochemistry* Published by Springer, 2006. 280 p.

Поступило 03.12.12

K.G. Bogolitsyn, M.V. Surso, M.A. Gusakova, I.N. Zubov

Institute of Ecological Problems of the North, Ural Branch
of the Russian Academy of Sciences

**Peroxidase Activity Within the Needles of Common Juniper (*Juniperus Communis* L.):
Dynamics of Seasonal and Age-Related Changes**

During growth and development of woody plants their composition changes and, consequently, properties and structure of a plant, together with enzymatic complexes, change too, being integral parts of the living cell. One of the most important and common enzymes of higher plants is peroxidase. Age-related changes in peroxidase activity and lignin content are of a similar nature, but seasonal variations in the enzyme can level the age dynamics. The paper aimed to determine seasonal variations in peroxidase activity of juniper needles and evaluate their contribution to the age dynamics.

It was shown that the dynamics of seasonal changes in peroxidase activity of juniper needles depends on the plant's gender and stage of reproductive development. Ripening of the berry-like cones is accompanied by increasing peroxidase activity; however the age of juniper is a determinant of this parameter value.

Keywords: enzymatic activity, peroxidase, seasonal variations, age-related dynamics, juniper.
