

УДК 574*24

ОСОБЕННОСТИ СТРЕССОВЫХ БЕЛКОВ-ДЕГИДРИНОВ БЕРЕЗЫ *Betula L.* В УСЛОВИЯХ КРИОЛИТОЗОНЫ

Т. Д. Татарнинова, А. А. Перк, А. Г. Пономарев, И. В. Васильева

Институт биологических проблем криолитозоны СО РАН
677980, Якутск, просп. Ленина, 41

E-mail: t.tatarinova@gmail.com, aaperk@mail.ru, anaponomarev@yandex.ru, Ira_Spira_Vas@mail.ru

Поступила в редакцию 17.09.2019 г.

С использованием специфических антител исследованы особенности состава стрессовых белков-дегидринов некоторых видов рода *Betula L.*: березы повислой *B. pendula* Roth, березы кустарниковой *B. fruticosa* Pall., березы карликовой *B. nana* L., произрастающих в условиях экстремального климата криолитозоны Центральной Якутии. Для сравнения изучали состав дегидринов березы повислой из регионов, отличающихся более умеренными климатическими показателями (Южная Якутия и Прибайкалье). Показано, что у разных видов березы в условиях криолитозоны выявлено значительное сходство состава дегидринов. Из двух групп идентифицированных дегидринов в диапазоне молекулярной массы 15–21 и 56–73 кДа независимо от видовых особенностей березы наибольшим сезонным изменениям подвержены низкомолекулярные, преимущественно 17 кДа. Высокий уровень этих белков в побегах и почках, а также в тканях ксилемы и коры березы повислой выявлялся в период зимнего покоя, когда морозоустойчивость растений достигала максимальных значений при наиболее низких отрицательных температурах, тогда как в летний период они исчезали. Дегидрины в области 15–21 кДа в побегах и почках березы в условиях Центральной Якутии характеризовались более выраженным внутривидовым полиморфизмом, их содержание, в первую очередь 17 кДа дегидрина, заметно превышало таковое у деревьев южно-якутской и иркутской популяций. Среднемолекулярные дегидрины березы 66–69 кДа представлены круглогодично почти на одном уровне. Данные дегидрины в листьях, мужских соцветиях, пыльце и проростках из семян березы повислой наблюдались во время вегетации, хотя в меньшем количестве. Значительное сходство состава и представленность дегидринов в органах и тканях изученных популяций березы могут указывать на их важную роль в общих механизмах формирования низкотемпературной устойчивости растений рода *Betula L.* к условиям северо-востока Евразии.

Ключевые слова: береза, органы, ткани, низкие температуры, устойчивость, многолетняя мерзлота, Якутия.

DOI: 10.15372/SJFS20200203

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что общим свойством всех живых организмов, включая растения, в ответ на стресс-факторы различной природы является экспрессия генов стрессовых белков. Важным звеном в защитных реакциях растений в условиях таких абиотических стрессов, как засуха, низкие температуры, засоление, вызывающих нарушение водного обмена, служит синтез гидрофильных белков. Наиболее многочисленную группу среди них представляют дегидрины, или белки водного стресса, иначе называемые LEA (Late Embryogenesis Abundant) – белки позд-

него эмбриогенеза (Close, 1996; Аллагулова и др., 2003; Allagulova et al., 2003). Стрессовые белки-дегидрины обнаружены у многих видов растений различных таксономических групп. Дегидрины представляют собой семейство белков, характеризующихся высокой гидрофильностью, термостабильностью и наличием в них консервативных последовательностей (Y-, S- и K-сегментов), обогащенных гидрофильными аминокислотами, особенно лизином и пролином (Close, 1996; Eriksson et al., 2011; Malik et al., 2017). Предполагается, что дегидрины могут проявлять криопротекторную, антифризную, антиоксидантную и металлосвязывающую

функции (Hara et al., 2001; Fujikawa et al., 2006; Kosova et al., 2010; Hanin et al., 2011; Cuevas-Velazquez et al., 2014).

Растения, произрастающие в природно-климатических условиях Центральной Якутии, для которой характерны экстремально низкие зимние температуры и наличие многолетней мерзлоты (криолитозона), подвержены наибольшему воздействию стрессовых факторов. На территории Якутии наиболее распространенным древесным видом березы является береза повислая *Betula pendula* Roth, а среди кустарников – береза кустарниковая *B. fruticosa* Pall. и карликовая *B. nana* L. (Тимофеев, 2003).

Стрессовым белкам отводится важная роль в приобретении растениями устойчивости к действию неблагоприятного температурного фактора (Rorat, 2006; Welling, Palva, 2006; Kosova et al., 2010; Hanin et al., 2011). Формирование морозоустойчивости у древесных растений инициируется коротким фотопериодом и низкими закалывающими температурами, запускающими экспрессию специфических генов холодовой акклимации растений и синтез стрессовых белков во время осеннего перехода растений к покою (Peng et al., 2008; Welling, Palva, 2008).

Значительную часть времени ткани растений в осенне-зимний период находятся в состоянии глубокого, а затем и вынужденного покоя. Структурные особенности дегидринов обуславливают их защитную роль в сохранении целостности клеточных структур и мембран от повреждений, вызванных дегидратацией при воздействии низких температур.

В этой связи весьма актуальным представляется познание свойств стрессовых белков-дегидринов, вероятно участвующих в формировании криоустойчивости разных видов березы, что позволит выявить общие закономерности адаптации к природно-климатическим условиям, отличающимся, прежде всего, по температурному параметру.

Цель данной работы – изучение особенностей состава стрессовых белков-дегидринов древесных растений на примере рода *Betula* L. при формировании их низкотемпературной устойчивости в условиях Сибири, в том числе криолитозоны Якутии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследовали древесные и кустарниковые виды рода береза *Betula* L., широко представленные в Северо-Восточной Евразии (Коропа-

чинский, 1983; Тимофеев, 2003): березу повислую (Центральная и Южная Якутия, Иркутская обл.), а также березу кустарниковую и тощую *Betula nana* subsp. *exilis* (Sukacz.) Hulten (подвид березы карликовой *B. nana* L.) (Центральная Якутия). В качестве близкородственного вида изучали ольху кустарниковую *Alnus fruticosa* Rupr. (подвид ольхи зеленой *Alnus alnobetula* subsp. *fruticosa* (Rupr.) Raus) (Центральная Якутия), относящуюся к семейству Betulaceae Gray.

Береза повислая – самый распространенный на территории не только Якутии, но и всей Сибири и на Дальнем Востоке древесный вид березы, достигающий в высоту 20–25 м и более. Встречается как в составе древостоев лиственных и сосновых лесов, так и образует чистые березняки в долинах и вокруг аласов (термокарстовых понижений). Береза кустарниковая распространена почти по всей таежной зоне, где образует ерники – заросли кустов высотой до 1.0–2.5 м на открытых местах, а также под пологом светлохвойных и мелколиственных лесов. Береза тощая – арктический полиморфный вид, представленный кустарником высотой 0.1–1.2 м с небольшими округлыми листьями, встречается почти по всей территории региона, где также образует ерники. Ольха (ольховник, душекия) кустарниковая – крупный кустарник высотой до 3–5 м, реже деревце высотой до 6 м. Представляет бореальный восточно-азиатский вид с обширным ареалом, образующий подлесок в хвойных и мелколиственных лесах, а также чистые и смешанные кустарниковые заросли по долинам рек и высоко в горах.

Сбор биологического материала, главным образом березы повислой (растения обозначены региональным индексом и индивидуальным номером), проводили в 2009–2016 гг. на постоянных пробных площадях в пригородных зонах г. Якутска (Ya, Центральная Якутия, 62° с. ш., 129° в. д.) и г. Алдана (Al, Южная Якутия, 58° с. ш., 125° в. д.), а также в окрестностях г. Иркутска (Ir, Иркутская обл., 52° с. ш., 104° в. д.). Материалом для исследований служили побеги (однолетний прирост) и почки березы. У березы повислой кроме цельного побега для анализа отбирали его отдельные ткани – ксилемную (древесина) и флоэмную (кора). В период вегетации данного вида собирали листья в фазе их полного распускания, мужские соцветия (сережки), а также пыльцу (пыльцевые зерна) из лопнувших мужских соцветий. У кустарниковых видов березы и ольхи отбирали только цельные побеги во время покоя. Сбор материала для изучения

сезонной динамики белков проводили круглогодично (не реже одного раза в месяц), для выявления полиморфизма – во время покоя растений в феврале, во время вегетации – в июле. Пробы материала исследований отбирали индивидуально для каждого изучаемого дерева березы. Всего изучено отдельных экземпляров березы повислой: центральная якутская популяция – 3 (сезонная динамика) и 26 (полиморфизм) образцов; алданская популяция – 3 (сезонная динамика) и 7 (полиморфизм) образцов; иркутская популяция – 3 (полиморфизм) образца; и 3 экз. кустарниковых видов березы и ольхи.

Проростки березы (до 1–1.5 см) для анализа проращивали из семян в чашках Петри на влажном субстрате (фильтровальная бумага) при комнатной температуре и естественном освещении.

Климат Центральной Якутии (г. Якутск) характеризуется экстремальными условиями: среднемесячная температура воздуха в январе составляет -38.6 °С, годовое количество осадков – 237 мм (Погода и климат, 2019). В других регионах изучения березы климат умеренно континентальный, среднемесячная температура воздуха в январе в г. Алдане (Южная Якутия) -26.3 °С и годовое количество осадков – 718 мм, в г. Иркутске -17.8 °С и 480 мм соответственно. Значительная часть территории Южной Якутии занята прерывистой и слабопрерывистой мерзлотой, частично заходящей на север Иркутской обл. При анализе экспериментальных данных использовали показатели температуры воздуха, представленные на сайте Всероссийского НИИ гидрометеорологической информации – Мирового центра данных (2019), а также показатели долготы дня – на сайте Weather Underground (2019). Климатические показатели в регионах в период исследований в целом не отличались от среднеголетних.

Для выделения суммарных белков из образцов различных органов березы – побегов, листьев, пыльцы, сережек, проростков и тканей (ксилема, кора) использовали метод E. Sarnighausen et al. (2002). Образцы растительного материала (1.5–2.0 г) измельчали в жидком азоте, далее проводили экстракцию буфером, содержащим 62.5 мМ Трис-НСl, pH 6.8, 2 % ДДС-Na, 5 % β -меркаптоэтанол, 1 мМ PMSF (фенилметилсульфонилфторид). При выделении суммарных белков из почек березы, согласно методике (Korotaeva et al., 2012), навеску ткани (1.5–1.7 г) измельчали в ступке в жидком азоте в присутствии нерастворимого поливинилпирролидона («Serva», Германия, 2.5 % по отношению

к объему буфера). Гомогенат центрифугировали при 50 000 g в течение 40 мин. К супернатанту, профильтрованному через капроновую ткань, добавляли поливинилпирролидон (2.5 %) и центрифугировали при 50 000 g в течение 35 мин. Все процедуры проводили при температуре +4 °С. Белки экстрагировали буфером, содержащим 0.1 М Трис-НСl, pH 7.5, 12 мМ β -меркаптоэтанол, 1 % ДДС-Na, 10 мМ ЭДТА, 3 мМ PMSF. В использованных методиках выделения белки осаждали пятью объемами ацетона при температуре -20 °С в течение 1 ч. Осадок белка гомогенизировали в электрофоретическом буфере, содержащем 1 М Трис-НСl, pH 7.5, 10 % ДДС-Na, 5 % β -меркаптоэтанол, 10 % глицерол. Раствор белка просветляли центрифугированием при 17 000 g (20 мин, +4 °С) и использовали для проведения электрофореза. Содержание белка определяли по методу M. M. Bradford (1976). Электрофорез белков проводили в 13.5 % ПААГ (Laemmli, 1970) с использованием маркеров молекулярной массы («Thermo Scientific», США) и последующим окрашиванием Кумасси G-250 («Serva», Германия). На треки наносили равное количество белка (10–15 мкг). Выравнивание белков в треках ПААГ проводилось опытным путем по интенсивности окраски белковых полос в сравнении с контрольным образцом, в качестве которого вносили известное количество белка (10–15 мкг). Перенос белков из ПААГ на ПВДФ (поливинилидендифторид)-мембрану («Bio-Rad», США) проводили по методу T. M. Timmons и B. S. Dunbar (1990). Идентификацию дегидринов выполняли с помощью поликлональных антител против их консервативного K-сегмента (EKKGIME/DKIKEKLPQ) (Svensson et al., 2002) в разведении 1 : 500 («Agrisera», Швеция).

Дегидрины визуализировали при помощи антикроличьих антител, конъюгированных с щелочной фосфатазой в разведении 1 : 2500 («Sigma», США). В качестве хромогенных субстратов использовали 5-бromo-4-хлоро-3-индолил фосфат и нитротетразолий синий («Amresco», США). Данные электрофореза и сканирования мембран обрабатывали с помощью программы ImageJ 1.41o/Java 1.50_09 (США). На рис. 1 и 2 представлены типичные мембраны с результатами иммунодетекции дегидринов.

Количественные показатели содержания дегидринов в органах и тканях оценивали по интенсивности окраски мембраны в относительных единицах денситометрической плотности

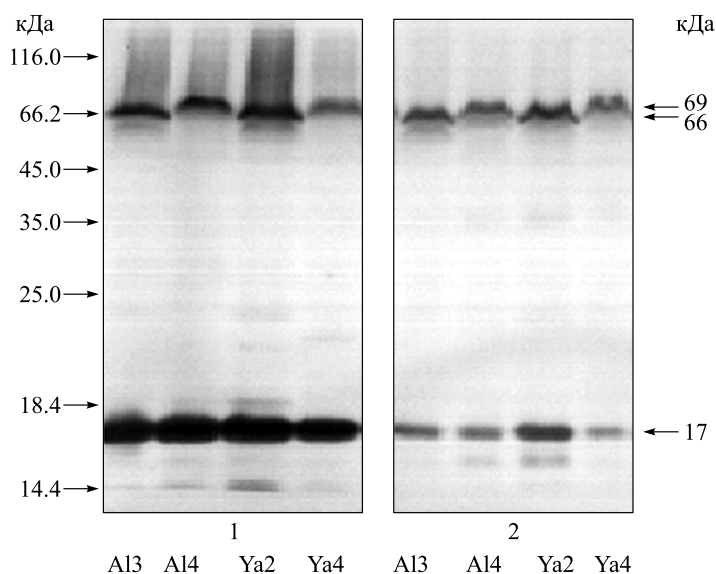


Рис. 1. Сравнение разных методов выделения дегидринов из почек березы повислой Центральной (Ya) и Южной Якутии (Al): 1 – Sarnighausen et al., 2002; 2 – Korotaeva et al., 2012. Здесь и на рис. 2, 5, 6 указаны молекулярные массы: слева – маркеров, справа – дегидринов. Иммунодетекция дегидринов выполнена на общей ПВДФ-мембране («Bio-Rad», США).

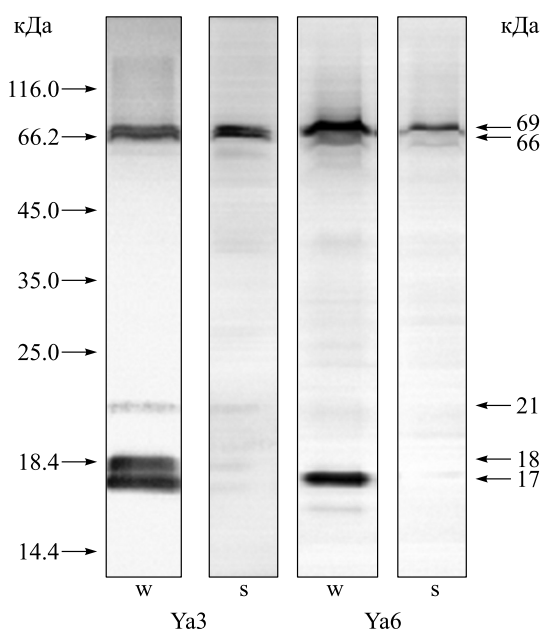


Рис. 2. Результаты иммуноблоттинга с антителами на дегидрины березы повислой Центральной Якутии во время покоя (W) и вегетации (S): Ya3 – однолетние побеги, Ya6 – почки. Приведены результаты двух отдельных мембран.

(ОДП, отн. ед. D). За стандарт принято значение денситометрической плотности 17 кДа дегидрина в июле, когда он отсутствовал полностью, т. е. его ОДП была равна нулю и являлась фоновой. Эксперименты проводили в трехкратной биологической повторности с привлечением статистического пакета Microsoft Excel. На рис. 3 и 4 данные представлены в виде средних арифметических значений и их ошибки.

В работе обсуждаются величины, достоверные при $P \leq 0.05$.

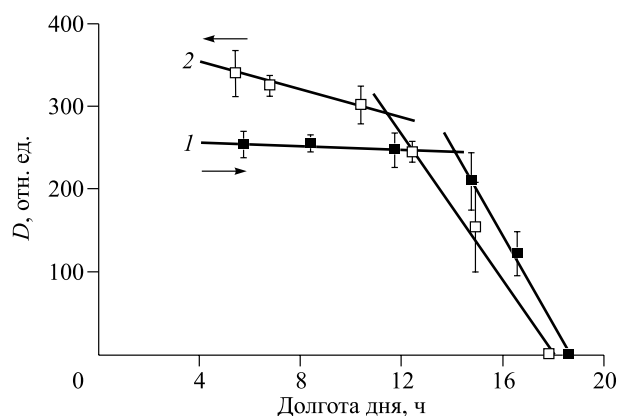


Рис. 3. Зависимость содержания 17 кДа дегидрина в почках березы повислой Центральной Якутии от долготы дня: 1 – весенний спад, 2 – осенний подъем.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее нами при изучении березы повислой были идентифицированы две группы стрессовых белков-дегидринов в диапазоне молекулярных масс (мол. м.) 15–21 и 56–73 кДа (Бубякина и др., 2011; Bubyakina et al., 2011; Пономарев и др., 2014; Ponomarev et al., 2014; Татарина и др., 2017; Tatarinova et al., 2017). В данной работе впервые приводится сравнение двух методов выделения дегидринов из образцов почек двух

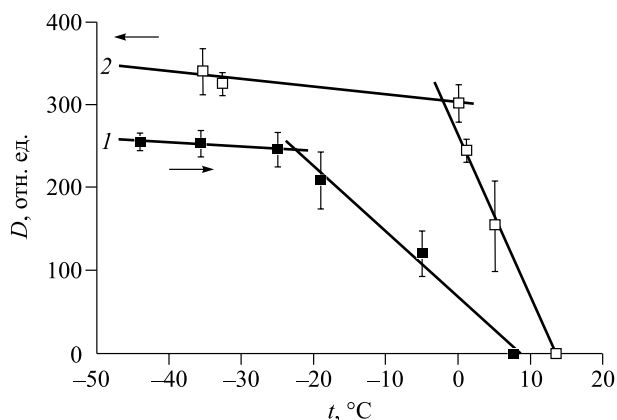


Рис. 4. Зависимость содержания 17 кДа дегидрина в почках березы повислой Центральной Якутии от минимальной температуры воздуха: 1 – весенний спад, 2 – осенний подъем.

популяций березы Центральной и Южной Якутии. Как показывают данные иммунодетекции, оба метода позволяют выявить достаточные для анализа количества белков (см. рис. 1). Однако в случае их выделения по методике (Korotaeva et al., 2012) используемый при экстракции ПВП (поливинилпирралидон), вероятно, связывает не только смолистые (фенольные) соединения, в большом количестве присутствующие в почках и препятствующие иммунодетекции белков, но и частично деградировавшие белки. Вследствие этого данный метод значительно эффективнее для исследования органов и тканей растений с большим содержанием смолистых веществ, например почек и хвои.

Изучение состава дегидринов в годичном цикле центрально- и южно-якутской популяций березы повислой показало, что данные белки являются сезонно-зависимыми. Так, наибольшая представленность и устойчиво высокий уровень дегидринов выявлялись в побегах и почках березы повислой в течение всего периода покоя, когда отмечались самые низкие отрицательные температуры (см. рис. 2). Поэтому для изучения особенностей дегидринов в работе использованы образцы органов и тканей березы, отобранные, как правило, в зимние месяцы (кроме листьев и генеративных органов во время вегетации растений).

Низкомолекулярные дегидрины (15–21 кДа) почти полностью исчезали в начале вегетации (май) и отсутствовали в летние месяцы, но появлялись осенью в период акклимации растений, стабилизируясь на определенном уровне в зимний период. Эти вариации хорошо согласуются с изменениями долготы дня (см. рис. 3) и температуры воздуха (см. рис. 4). Такие графики могут быть представлены различными *S*-образными функциями (сигмоидами), конкретный выбор которых усложняется их значительным многообразием. Поэтому для первичного анализа достаточно, на наш взгляд, использовать разбиение суммарных кривых на два прямолинейных участка (зимнее плато и осенний подъем – весенний спуск) с аппроксимацией простыми линейными уравнениями. Тогда зависимость уровня содержания 17 кДа дегидрина (в отн. ед. *D*) от долготы дня можно представить весной как $y = -1309.8x + 1018.6$ ($R^2 = 0.99$), осенью – $y = -1090.7x + 817.1$ ($R^2 = 0.99$); от минимальной температуры воздуха весной – $y = -7.8x + 68.4$ ($R^2 = 0.98$), осенью – $y = -19.3x + 261.0$ ($R^2 = 0.99$). Нами предполагается, что уровень низкомолеку-

лярных дегидринов при выходе на зимнее плато в разные годы может варьировать в зависимости от погодных условий и особенностей акклимации растений. Как видно из рис. 3 и 4, содержание 17 кДа дегидрина достигает половинных значений весной при долготе дня около 16 ч и минимальной температуре воздуха -10 °С, а осенью – 14–15 ч и $+5$ °С соответственно. Отсюда следует, что основным фактором, отвечающим за весенний спад стрессовых белков, может быть увеличение температуры, когда прямая солнечная инсоляция даже при относительно холодной погоде приводит к локальному нагреву органов и тканей растений, запуская процессы деструкции дегидринов. При подготовке растений к покою определяющим фактором их осеннего подъема является фотопериодическая реакция, способствующая индукции синтеза стрессовых белков, в том числе дегидринов, заблаговременно, до достижения относительно низких температур.

Экологическая пластичность растений во многом обуславливается генетическим полиморфизмом, создающим мобилизационный резерв вида и обеспечивающим оптимальную приспособленность отдельных популяций к разным климатическим условиям произрастания.

При сравнении побегов деревьев из двух популяций березы обнаружено их значительное сходство по составу дегидринов, хотя регион Южной Якутии характеризуется в зимний период более умеренными температурными показателями по сравнению с Центральной Якутией. Мажорные дегидрины березы распределены в основном в двух областях молекулярных масс – низко- и средномолекулярной. Дегидрины с мол. м. 17 кДа в достаточном количестве представлены у всех исследованных растений (рис. 5).

У некоторых экземпляров березы дегидрины в средномолекулярной области варьировали по количеству изоформ, также встречались и низкомолекулярные дегидрины – 15, 18 и 21 кДа. Сходный состав дегидринов выявлен в образцах побегов березы повислой в Прибайкалье (Иркутская обл.), географическое положение и климатические факторы которого близки району произрастания южно-якутской популяции березы. Вместе с тем в условиях Центральной Якутии спектры дегидринов в побегах березы повислой в зимний период характеризовались более выраженным внутривидовым полиморфизмом, особенно в области 15–21 кДа. У отдельных де-

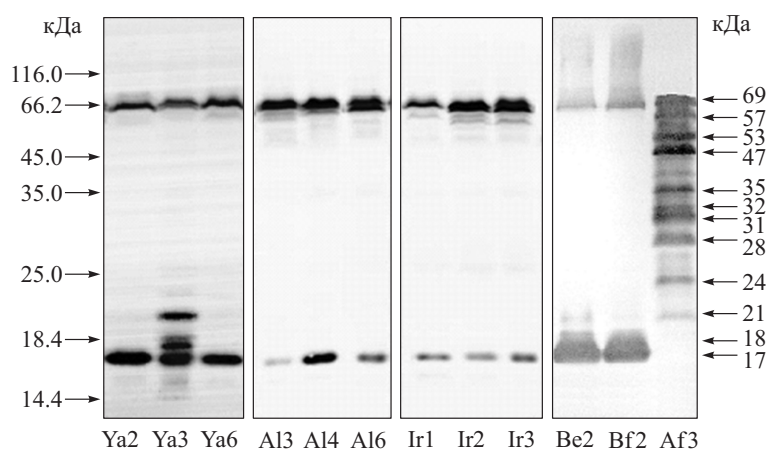


Рис. 5. Полиморфизм дегидринов в побегах отдельных экземпляров березы повислой: Ya – Центральная Якутия; Al – Южная Якутия; Ir – Иркутская обл.; а также Be – береза карликовая; Bf – береза кустарниковая; Af – ольха кустарниковая. Приведены результаты отдельных мембран.

ревьев выявлялись дегидрины с мол. м. 15, 18 и 21 кДа, не обнаруженные в почках изученных берез из более южных регионов. Кроме того, уровень дегидрина 17 кДа в побегах березы центрально-якутской популяции был значительно выше, чем у южно-якутской (алданской) и иркутской популяций – в 3.4 и 5.5 раза (в отн. ед. *D*) соответственно. Из этих данных следует, что самый высокий уровень мажорного 17 кДа дегидрина в побегах березы повислой выявляется во время зимнего покоя в период экстремально низких температур. Максимальное накопление дегидринов происходило к концу фенологической осени и устойчиво сохранялось в холодный период года у всех изученных берез, независимо от их видовой принадлежности и региона, что указывает на их тесную связь с низкотемпературной адаптацией.

Спектры дегидринов разных видов березы, произрастающих в условиях холодного климата Якутии, – повислой, кустарниковой и карликовой показали значительное сходство их состава, несмотря на различие жизненных форм растений (от дерева до кустарника) (см. рис. 5).

В побегах этих видов березы в зимний период присутствовал низкомолекулярный дегидрин с мол. м. 17 кДа, реже встречались дегидрины 18 и 21 кДа. Дегидрины с мол. м. 66–69 кДа варьировали по количеству изоформ у каждого отдельного растения. Дегидрины березы резко отличались от дегидринов ольхи. В побегах ольхи не выявлялись дегидрины в области 15–18 кДа, наиболее низкомолекулярный дегидрин ольхи кустарниковой имел мол. м. 21 кДа. У дан-

ного вида ольхи в отличие от березы преобладающая часть мажорных дегидринов была представлена в среднеммолекулярной области (24–57 и 69 кДа). Существенные различия в спектрах дегидринов между представителями двух родов *Betulaceae* могут быть обусловлены разной трофической стратегией внутри семейства. В условиях Якутии ольха в отличие от березы до глубокой осени сохраняет хлорофилл в листьях. Она обладает актиноризой и является азотфиксатором (Тимофеев, 2003). Наличие значительного числа дегидринов у ольхи кустарниковой может быть связано с вероятным их участием в поддержании функционирования и защите фотосинтетического аппарата в условиях низких температур.

У других видов древесных растений, например у кизила блестящего *Cornus sericea* L., дегидрины накапливались при уменьшении содержания воды в тканях при подготовке к зиме (Karlson et al., 2003). В условиях Финляндии в листьях березы повислой ранее был обнаружен кислый 36 кДа дегидрин, индуцируемый низкими температурами (Puhakainen et al., 2004). Максимум содержания 24 кДа дегидрина в почках березы пушистой *Betula pubescens* Ehrh. в тех же условиях отмечался в течение всего осенне-зимнего периода, 30 кДа дегидрина – только в холодные месяцы года, в то время как 33 кДа дегидрина – в течение всего года (Rinne et al., 1998). По данным авторов (Welling et al., 2004, 2008), последовательный характер экспрессии двух дегидринов (34 и 36 кДа) в ответ на фотопериод и температуру также указывает на их

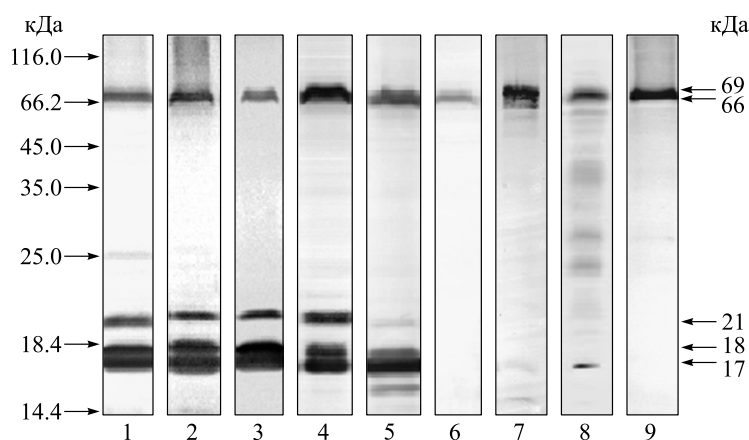


Рис. 6. Результаты иммуноблоттинга дегидринов некоторых органов и тканей березы повислой Центральной Якутии (Ya3, кроме смешанных образцов): 1 – побеги однолетние; 2 – ксилема; 3 – кора; 4 – почки; 5 – почки (смесь, трансекта); 6 – листья; 7 – мужские соцветия (смесь); 8 – пыльца (смесь); 9 – проростки (смесь). Приведены результаты отдельных мембран.

определенную роль в механизмах адаптации разных видов *Betula* к климату Фенноскандии. Подобная динамика в накоплении дегидринов обнаружена и у хвойных растений (Kjellsen et al., 2013; Strimbeck et al., 2015). Так, значительное накопление дегидрина 16 кДа в хвое коррелировало с приобретением морозоустойчивости сосны веймутовой *Pinus strobus* L. (Chang et al., 2016). В условиях Прибайкалья к специфичным для зимнего покоя сосны обыкновенной *Pinus sylvestris* L. относят дегидрины с мол. м. 17, 26 и 32 кДа (Korotaeva et al., 2012). Возрастание уровня экспрессии низкомолекулярных дегидринов в условиях дефицита влаги наблюдали в хвое ели сизой *Picea glauca* (Moench) Voss (Sena et al., 2018).

Из представленных данных следует, что внутривидовой полиморфизм дегидринов, более выраженный у березы повислой в условиях экстремального климата Центральной Якутии, в отличие от более умеренно континентального климата Южной Якутии и Прибайкалья, вероятно, характеризует уровень ее адаптационной пластичности и обусловлен особенностями формирования устойчивости древесных растений к низким зимним температурам, характерным для этих регионов. Сведения о внутривидовом полиморфизме данного типа белков у других видов древесных растений, а также их предполагаемой связи с адаптацией в настоящее время отсутствуют.

Повсеместная встречаемость 17 кДа дегидрина у берез Якутии и Прибайкалья, вероят-

но, может указывать на универсальность его функциональной роли в растениях по сравнению с другими белками в той же области молекулярных масс. Вместе с тем некоторые различия в составе дегидринов, наблюдаемые в образцах разных видов сем. Betulaceae, носят преимущественно количественный характер и могут быть обусловлены их видовыми особенностями.

Помимо общей устойчивости растений к неблагоприятным факторам среды необходимо выделять устойчивость отдельных органов и тканей, что позволяет более целенаправленно изучать их механизмы. Например, различные органы и ткани растений обладают разной степенью адаптации к действию холодового стресса. Клетки коры в деревьях адаптируются к отрицательным температурам посредством внеклеточного замораживания, тогда как клетки ксилемы – путем глубокого переохлаждения (Takata et al., 2007).

Нами изучен состав стрессовых белков-дегидринов в различных органах и тканях побегов березы повислой, произрастающей в условиях криолитозоны Якутии (рис. 6).

Иммунодетекция белков показала, что в ксилеме и коре побегов, как и в почках, выявляются две группы дегидринов. Для них также характерен высокий уровень дегидринов в период глубокого покоя растений в зимние месяцы. Однако в ксилеме содержание дегидринов в это время несколько превышало таковое в коре, в среднем до 1.3 раза (в отн. ед. D), что, вероятно, обуслов-

лено разными механизмами формирования морозоустойчивости этих тканей.

Данные по полиморфизму дегидринов отдельных берез были дополнены и подтверждены суммарным анализом 80 растений (отбор по одной почке от каждой березы), собранных вдоль более чем километровой маршрута (трансекты).

Основным лимитирующим фактором, определяющим развитие генеративных органов в весенний период, является температура, поскольку раскрытие мужских соцветий у березы происходит до начала распускания листьев весной или одновременно с ним. При формировании генеративных органов растений могут происходить значительные изменения в их метаболизме, в том числе в экспрессии специфических белков. Как и следовало ожидать, во время вегетации в мужских соцветиях, пыльце, листьях и проростках, выращенных из семян, выявлялись в основном 66 и 69 кДа дегидрины. В пыльцевых зернах обнаруживались и низкомолекулярные дегидрины, что может быть связано с их ксероморфными свойствами.

Низкотемпературный стресс и вызываемые им повреждения являются факторами, ограничивающими рост, развитие и распространение растений на земном шаре. У всех изученных в данной работе видов березы, произрастающих в разных природно-климатических регионах ареала (Центральная и Южная Якутия, Прибайкалье), где встречаются низкие температуры различной интенсивности, обнаруживаются общие черты в составе дегидринов. Значительных различий по составу среднемолекулярных дегидринов в разных органах, в том числе генеративных, в ксилеме и коре березы повислой не выявлено. Как и предполагалось, сезонно-зависимые низкомолекулярные дегидрины отсутствуют в обводненных органах (например, листьях), а также в органах и тканях во время вегетации. Таким образом, наличие двух групп дегидринов, обнаруженных у разных видов березы, по-видимому, является необходимым условием для достижения оптимального уровня устойчивости и успешного выживания при низкой температуре. Сходство состава и характера сезонных изменений, а также устойчиво высокое содержание дегидринов, в первую очередь низкомолекулярных, в зимний период могут указывать на их участие в общих механизмах адаптации изученных видов березы к условиям холодного климата северо-востока Евразии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследованы особенности стрессовых белков-дегидринов некоторых видов *Betula L.*, произрастающих на северо-востоке Евразии, в том числе в условиях многолетней мерзлоты (криолитозоны). С использованием специфических антител обнаружено значительное сходство их состава у разных видов березы, а также в изученных органах и тканях березы повислой. Одинаковый характер сезонных изменений и стабильно высокий уровень дегидринов в течение низкотемпературного периода предполагает участие этих белков в общих механизмах формирования устойчивости древесно-кустарниковых растений к разным природно-климатическим условиям.

Финансовое обеспечение исследований осуществлялось из средств федерального бюджета на выполнение государственного задания ИБПК СО РАН (регистрационный № АААА-А17-117020110054-6) и при частичной финансовой поддержке РФФИ (проект № 09-04-98556-р_восток_a).

Авторы считают своим долгом отметить особый вклад в становление и развитие данных исследований в условиях Якутии канд. биол. наук [Виктории Витальевны Бубякиной].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ (REFERENCES)

- Аллагулова Ч. Р., Гималов Ф. Р., Шакирова Ф. М., Вахитов В. А. Дегидрины растений: их структура и предполагаемые функции // Биохимия. 2003. Т. 68. № 9. С. 1157–1165 [Allagulova Ch. R., Gimalov F. R., Shakirova F. M., Vakhitov V. A. Degidrinny rasteniy: ikh struktura i predpolagayemye funktsii (The plant dehydrins: structure and putative functions) // Biokhimiya (Biochemistry). 2003. V. 68. N. 9. P. 1157–1165 (in Russian with English abstract)].
- Бубякина В. В., Татарина Т. Д., Пономарев А. Г., Перк А. А., Соломонов Н. Г. Особенности сезонной динамики дегидринов *Betula platyphylla* Sukacz., ассоциированные с формированием морозоустойчивости в условиях криолитозоны // ДАН. 2011. Т. 439. № 6. С. 844–847 [Bubyakina V. V., Tatarinova T. D., Ponomarev A. G., Perk A. A., Solomonov N. G. Osobennosti sezonnoy dinamiki degidrinov *Betula platyphylla* Sukacz., assotsiirovannye s formirovaniem morozoustoychivosti v usloviyakh kriolitozony (Characteristics of seasonal dynamics of *Betula platyphylla* Sukacz. dehydrins associated with frost hardiness development under the cryolitic zone conditions) // DAN (Rep. Acad. Sci.). 2011. V. 439. N. 6. P. 844–847 (in Russian with English abstract)].

- Всероссийский НИИ гидрометеорологической информации – Мировой центр данных, 2019. <http://meteo.ru/>
- Коропачинский И. Ю. Древесные растения Сибири. Новосибирск: Наука. Сиб. отд-ние, 1983. 284 с. [*Koropachinskiy I. Yu. Drevesnye rasteniya Sibiri (Woody plants of Siberia). Novosibirsk: Nauka. Sb. Br., 1983. 284 p. (in Russian).*].
- Погода и климат, 2019. <http://www.pogodaiklimat.ru/>
- Пономарев А. Г., Татаринова Т. Д., Перк А. А., Васильева И. В., Бубякина В. В. Дегидрины, ассоциированные с формированием морозоустойчивости березы плосколистной // Физиол. раст. 2014. Т. 61. № 1. С. 114–120 [*Ponomarev A. G., Tatarinova T. D., Perk A. A., Vasilyeva I. V., Bubyakina V. V. Degidrin, assotsirovannyye s formirovaniyem morozoustoychivosti berezy ploskolistnoy (Dehydrins associated with the development of frost resistance of Asian white birch) // Fiziologiya rasteniy (Physiol. Plants). 2014. V. 61. N. 1. P. 114–120 (in Russian with English abstract).*].
- Татаринова Т. Д., Бубякина В. В., Ветчинникова Л. В., Перк А. А., Пономарев А. Г., Васильева И. В. Стрессовые белки-дегидрины в почках березы в контрастных по климату регионах // Цитология. 2017. Т. 59. № 2. С. 156–160 [*Tatarinova T. D., Bubyakina V. V., Vetchinnikova L. V., Perk A. A., Ponomarev A. G., Vasilyeva I. V. Stressovye belki-degidriny v pochkakh berezy v kontrastnykh po klimatu regionakh (Dehydrin stress proteins in birch buds in regions with contrasting climate) // Tsitologiya (Cytology). 2017. V. 59. N. 2. P. 156–160 (in Russian with English abstract).*].
- Тимофеев П. А. Деревья и кустарники Якутии. Якутск: Бичик, 2003. 59 с. [*Timofeyev P. A. Derevyu i kustarniki Yakutii (Trees and shrubs of Yakutia). Yakutsk: Bichik, 2003. 59 p. (in Russian).*].
- Allagulova Ch. R., Gimalov F. R., Shakirova F. M., Vakhitov V. A. The plant dehydrins: structure and putative functions // Biochemistry. 2003. V. 68. Iss. 9. P. 945–951 (Original Rus. text © Ch. R. Allagulova, F. R. Gimalov, F. M. Shakirova, V. A. Vakhitov, 2003, publ. in Biokhimiya. 2003. V. 68. N. 9. P. 1157–1165).
- 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. P. 248–254.
- Bubyakina V. V., Tatarinova T. D., Ponomarev A. G., Perk A. A., Solomonov N. G. Characteristics of seasonal dynamics of *Betula platyphylla* Sukacz. dehydrins associated with frost hardiness development under the cryolitic zone conditions // Dokl. Biol. Sci. 2011. V. 439. Iss. 1. Article 258 (Original Rus. text © V. V. Bubyakina, T. D. Tatarinova, A. G. Ponomarev, A. A. Perk, N. G. Solomonov, 2011, publ. in Doklady Akademii Nauk. 2011. V. 439. N. 6. P. 844–847).
- Chang C. Y., Frechette E., Unda F., Mansfield S. D., Ensminger I. Elevated temperature and CO₂ stimulate late-season photosynthesis but impair cold hardening in pine // Plant Physiol. 2016. V. 172. P. 802–818.
- Close T. J. Dehydrins: emergence of a biochemical role of a family of plant dehydration proteins // Physiol. Plant. 1996. V. 97. Iss. 4. P. 795–803.
- Cuevas-Velazquez C. L., Rendon-Luna D. F., Covarrubias A. A. Dissecting the cryoprotection mechanisms for dehydrins // Front. Plant Sci. 2014. V. 5. P. 1–6.
- Eriksson S. K., Kutzer M., Procek J., Gröbner G., Harryson P. Tunable membrane binding of the intrinsically disordered dehydrin LtI30, a cold-induced plant stress protein // The Plant Cell. 2011. V. 23. P. 2391–2404.
- Fujikawa S., Ukaji N., Nagao M., Yamane K., Takezawa D., Arakawa K. Functional role of winter-accumulating proteins from mulberry tree in adaptation to winter-induced stresses. Cold Hardiness in Plants: Mol. Gen., Cell Biol. and Physiol., 2006. P. 181–202.
- Hanin M., Brini F., Ebel C., Toda Y., Takeda S. Masmoudi K. Plant dehydrins and stress tolerance: versatile proteins for complex mechanisms // Plant Signal. Behav. 2011. V. 6 (10). P. 1503–1509.
- Hara M., Terashima S., Kuboi T. Characterization and cryoprotective activity of cold-responsive dehydrin from *Citrus unshiu* // J. Plant Physiol. 2001. V. 158. P. 1333–1339.
- Karlson D. T., Zeng Y., Stirm V. E., Joly R. J., Ashworth E. N. Photoperiodic regulation of a 24-kD dehydrin-like protein in red-osier dogwood (*Cornus sericea* L.) in relation to freeze-tolerance // Plant. Cell. Physiol. 2003. V. 44. P. 25–34.
- Kjellsen T. D., Yakovlev I. A., Fossdal C. G., Strimbeck G. R. Dehydrin accumulation and extreme low-temperature tolerance in Siberian spruce (*Picea obovata*) // Tree Physiol. 2013. V. 33. Iss. 12. P. 1354–1366.
- Korotaeva N. E., Oskorbina M. V., Kopytova L. D., Suvorova G. G., Borovskii G. B., Voinikov V. K. Variations in the content of stress proteins in the needles of common pine (*Pinus sylvestris* L.) within an annual cycle // J. For. Res. 2012. V. 17. N. 1. P. 89–97.
- Kosova K., Prasil I. T., Vitamvas P. Role of dehydrins in plant stress response. Handbook of Plant and Crop Stress. Tucson: CRC, 2010. P. 239–285.
- Laemmli U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature. 1970. V. 227. P. 680–685.
- Malik A. A., Veltri M. A., Boddington K. F., Singh K., Graether S. P. Genome analysis of conserved dehydrin motifs in vascular plants // Front. Plant Sci. 2017. V. 8. P. 1–18.
- Peng Y., Reyes J. L., Wei H., Yang Y., Karlson D., Covarrubias A. A., Krebs S. L., Fessehaie A., Arora R. RcDhn5, a cold acclimation-responsive dehydrin from *Rhododendron catawbiense* rescues enzyme activity from dehydration effects in vitro and enhances freezing tolerance in RcDhn5-overexpressing *Arabidopsis* plants // Physiol. Plant. 2008. V. 134. P. 583–597.
- Ponomarev A. G., Tatarinova T. D., Perk A. A., Vasilyeva I. V., Bubyakina V. V. Dehydrins associated with the development of frost resistance of Asian white birch // Rus. J. Plant Physiol. 2014. V. 61. Iss. 1. P. 105–111 (Original Rus. text © A. G. Ponomarev, T. D. Tatarinova, A. A. Perk, I. V. Vasilyeva, V. V. Bubyakina, 2014, publ. in Fiziologiya Rastenii. 2014. V. 61. N. 1. P. 114–120).
- Puhakainen T., Hess M. W., Mäkelä P., Svensson J., Heino P., Palva E. T. Overexpression of multiple dehydrin genes enhances tolerance to freezing stress in *Arabidopsis* // Plant Mol. Biol. 2004. V. 54. Iss. 5. P. 743–753.
- Rinne P., Welling A., Kaikuranta P. Onset of freezing tolerance in birch (*Betula pubescens* Ehrh.) involves LEA proteins and osmoregulation and is impaired in an ABA-deficient genotype // Plant Cell Environ. 1998. V. 21. P. 601–611.
- Rorat T. Plant dehydrins-tissue location, structure and function // Cell. Mol. Biol. Lett. 2006. V. 11. Iss. 4. P. 536–556.

- Sarnighausen E., Karlson D., Ashworth E. Seasonal regulation of a 24-kDa protein from red-osier dogwood (*Cornus sericea*) xylem // *Tree Physiol.* 2002. V. 22. P. 423–430.
- Sena J. S., Giguère I., Rigault P., Bousquet J., Mackay J. J. Expansion of the dehydrin gene family in the Pinaceae is associated with considerable structural diversity and drought-responsive expression // *Tree Physiol.* 2018. V. 38. Iss. 3. P. 442–456.
- Strimbeck G. R., Schaberg P. G., Fossdal C. G., Schroder W. P., Kjellsen T. D. Extreme low temperature tolerance in woody plants // *Front. Plant Sci.* 2015. V. 6. P. 1–15.
- Svensson J., Ismail A. M., Palva E. T., Close T. J. Dehydrins // *Cell and molecular responses to stress.* Book Ser. Amsterdam, Netherlands: Elsevier Press, 2002. V. 3. P. 155–171.
- Takata N., Kasuga J., Takezawa D., Arakawa K., Fujikawa S. Gene expression associated with increased supercooling capability in xylem parenchyma cells of larch (*Larix kaempferi*) // *J. Exp. Bot.* 2007. V. 58. N. 13. P. 3731–3742.
- Tatarinova T. D., Bubyakina V. V., Vetchinnikova L. V., Perk A. A., Ponomarev A. G., Vasilieva I. V. Dehydrin stress proteins in birch buds in regions with contrasting climate // *Cell Tiss. Biol.* 2017. V. 11. Iss. 6. P. 483–488 (Original Rus. text © T. D. Tatarinova, V. V. Bubyakina, L. V. Vetchinnikova, A. A. Perk, A. G. Ponomarev, I. V. Vasilieva, 2017, publ. in *Tsitologiya*. 2017. V. 59. N. 2. P. 156–160).
- Timmons T. M., Dunbar B. S. Protein blotting and immunodetection // *Methods enzymol.* 1990. V. 182. P. 679–688.
- Weather Underground, 2019. <https://www.wunderground.com/>
- Welling A., Palva E. T. Molecular control of cold acclimation in trees // *Physiol. Plant.* 2006. V. 127. Iss. 2. P. 167–181.
- Welling A., Palva E. T. Involvement of CBF transcription factors in winter hardiness in birch // *Plant Physiol.* 2008. V. 147. P. 1199–1211.
- Welling A., Rinne P., Vihera-Aarnio A., Kontunen-Soppela S., Heino P., Palva E. T. Photoperiod and temperature differentially regulate the expression of two dehydrin genes during overwintering of birch (*Betula pubescens* Ehrh.) // *J. Exp. Bot.* 2004. V. 55. P. 507–516.

SPECIFICS OF STRESS PROTEINS-DEHYDRINS OF BIRCH *Betula* L. IN THE CONDITIONS OF CRYOLITHOZONE

T. D. Tatarinova, A. A. Perk, A. G. Ponomarev, I. V. Vasilieva

*Institute for Biological Problems of Cryolithozone, Russian Academy of Sciences, Siberian Branch
Lenin str., 41, Yakutsk, Republic of Sakha (Yakutia), 677980 Russian Federation*

E-mail: t.tatarinova@gmail.com, aaperk@mail.ru, anaponomarev@yandex.ru, Ira_Spira_Vas@mail.ru

The compositional features of stressful dehydrin proteins of some species of *Betula* L.: silver birch *B. pendula* Roth, dwarf bog birch *B. fruticosa* Pall., dwarf birch *B. nana* L., growing under extreme climate conditions in the cryolithozone of Central Yakutia were studied using specific antibodies. The composition of birch dehydrins hanging from regions differing in more moderate climatic indices (South Yakutia and Pribaikalye) was studied for comparison. The composition of dehydrins in different species of birch under the conditions of cryolithozone has significant similarities. Low molecular weight dehydrins, mainly 17 kDa from two groups of identified dehydrins in the range with mol. m. 15–21 and 56–73 kDa, regardless of the species characteristics of birch, are subject to the greatest seasonal changes. These proteins in shoots and buds, as well as in the tissues of the bark and xylem of silver birch, have a high level during winter dormancy at the lowest negative temperatures, when frost resistance of plants reached maximum values, while they almost disappeared in the summer period. Dehydrins in the region of 15–21 kDa in birch shoots and buds were characterized by more pronounced intraspecific polymorphism in the conditions of Central Yakutia, their content, predominantly 17 kDa of dehydrin, significantly exceeded that of birches of the South Yakutia and Irkutsk populations. The middle molecular weight dehydrins of birch 66–69 kDa are presented round whole year at almost the same level. These dehydrins in leaves, male inflorescences, pollen and seedlings from silver birch seeds were observed during the growing season, although they were found in smaller quantities. Significant similarities in the composition and representation of dehydrins in the organs and tissues of the studied birch populations may indicate their important role in the general mechanisms of the formation of the low-temperature resistance of *Betula* L. plants to the conditions of Northeast Eurasia.

Keywords: birch, organs, tissues, low temperatures, resistance, permafrost, Yakutia.

How to cite: Tatarinova T. D., Perk A. A., Ponomarev A. G., Vasilieva I. V. Specifics of stress proteins-dehydrins of birch *Betula* L. in the conditions of cryolithozone // *Sibirskij Lesnoj Zhurnal* (Sib. J. For. Sci.). 2020. N. 2. P. 21–30 (in Russian with English abstract and references).