

ОСОБЕННОСТИ БЕЛКОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С ФОРМИРОВАНИЕМ МОРОЗОУСТОЙЧИВОСТИ У ДВУХ ПОПУЛЯЦИЙ *BETULA PLATYPHYLLA* ЯКУТИИ

Пономарев А. Г., Татарина Т. Д., Перк А. А., Васильева И. В., Бубякина В. В.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки, Институт биологических проблем криолитозоны Сибирского отделения Российской академии наук, Якутск, Россия (677980, г. Якутск, пр. Ленина, 41), e-mail: anaponomarev@yandex.ru

Впервые изучена внутривидовая изменчивость суммарных белков и дегидринов в почках березы плосколистной *Betula platyphylla* Sukacz., испытывающей экстремально холодные климатические условия Восточной Сибири, с помощью ДДС-электрофореза в ПААГ и иммуноблоттинга. В популяциях берез Центральной и Южной Якутии выявлены две области варибельности суммарных белков (14–16 и 22–25 кД) и две группы низко- и среднемoleкулярных дегидринов (15–21 и 56–73 кД). Найдено, что полиморфизм группы низкомолекулярных дегидринов более выражен у центральноякутской популяции берез, чем у алданской. 17 кД-дегидрин встречался у всех изученных экземпляров растений. Низкомолекулярные дегидрины, предположительно связанные с морозоустойчивостью, имели стабильно высокий уровень в зимний период и не определялись в период роста в популяции берез Центральной Якутии. Группа дегидринов с молекулярными массами от 56 до 73 кД количественно не отличалась у обеих популяций и обнаруживалась круглогодично, хотя ее содержание уменьшалось летом.

Ключевые слова: *Betula platyphylla*, Якутия, морозоустойчивость, внутривидовой полиморфизм, дегидрины.

CHARACTERISTICS OF PROTEINS ASSOCIATED WITH FROST HARDINESS DEVELOPMENT IN TWO POPULATIONS OF *BETULA PLATYPHYLLA* OF YAKUTIA

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

Institute of Biological Problems of Cryolithozone, Siberian Branch, Russian Academy of Science, Yakutsk, Russia (pr. Lenina 41, Yakutsk, 677980) e-mail: anaponomarev@yandex.ru

Intraspecific variability of total proteins and dehydrins in buds of *Betula platyphylla* Sukacz. experiencing extremely cold climatic conditions of Eastern Siberia was studied by SDS-electrophoresis in PAAG and western immunoblot analysis. Two variable regions (14–16 and 22–25 kD) in total protein spectra and two groups of low (15–21 kD) and medium (56–73 kD) molecular mass dehydrins were found in Central and Southern Yakutia populations of birches. Polymorphism of dehydrins with molecular masses 15–21 kD was greater in Central Yakutia population than in Southern Yakutia one. The dehydrin of 17 kD occurred in all birches of both populations. Dehydrins of 15–21 kD supposedly associated with the frost hardiness had high stable level in winter and were not identified in growing season in Central Yakutia population of birches. Dehydrins of 56–73 kD were not quantitatively different in both populations and were detected all year round, decreasing in summer.

Key words: *Betula platyphylla*, Yakutia, frost hardiness, intraspecific polymorphism, dehydrins.

Введение

Особенность климата Якутии определяется, в первую очередь, экстремально низкими температурами зимнего периода. В разных районах республики температурный фактор может достигать разной степени интенсивности (от -25 °C до -60 °C). Он ограничивает количественный состав древесных видов растений, генеративные органы которых переживают морозы в незащищенном надснежном состоянии. Среди лиственных деревьев Якутии наибольший ареал занимает береза плосколистная *Betula platyphylla* Sukacz., что связано с ее феноменальной зимостойкостью. Выбранные для исследования районы ее произрастания (Центральная и Южная Якутия) являются наиболее контрастными по своим

климатическим характеристикам. В Центральной Якутии суммы летних температур воздуха выше 10 °С достигают более 1500 °С. Годовые суммы осадков – 200–250 мм. Средняя температура января – -43 °С. Высота снежного покрова – всего 20–30 см. Многолетняя мерзлота имеет повсеместное распространение. В Южной Якутии (Алдан) суммы температур воздуха вегетационного периода выше 10 °С доходят до 1200–1300 °С. Годовые суммы осадков – 500–600 мм. Зима – менее суровая. Средняя температура января – -28 °С. Высота снежного покрова – 40–60 см. Значительная часть территории Южной Якутии занята прерывистой и слабо прерывистой мерзлотой.

Развитие морозоустойчивости древесных растений запускается коротким фотопериодом и низкой температурой. Холодовая акклимация растений ассоциируется со специфическими генами, индукция которых приводит к большому количеству физиолого-биохимических изменений. Таковые затрагивают уровни фитогормонов и антиоксидантов, осмолитов и защитных белков, в том числе и шаперонов, а также белков с неизвестными пока функциями [10]. Среди защитных белков повышенный интерес вызывают дегидрины, которые представляют собой группу II белков позднего эмбриогенеза [8]. Они накапливаются в тканях растений в ответ на осмотический стресс, вызванный дефицитом воды, низкой температурой, высокой засоленностью. Дегидрины представляют собой высокогидрофильные белки, которые содержат консервативные K-, Y- и S-сегменты. Эксперименты *in vitro* показали, что дегидрины проявляют много функций (шаперонную, криопротективную, антифризную, радикал-собирающую, ион-связывающую). Есть также прямые свидетельства о защитной роли дегидринов. Имеется ряд исследований древесных растений умеренных зон, в которых показано, что уровни дегидринов являются высокими в течение зимы и низкими в течение активного роста. Предполагается, что дегидрины участвуют в защите клеток у зимующих деревьев, когда идет отток воды из цитоплазмы и формируется экстраклеточный лед [10]. Дегидрины могут быть использованы в качестве не прямых стресс-маркеров, в том числе маркеров морозоустойчивости [8]. Ранее мы идентифицировали ряд дегидринов из отдельных органов березы [1, 5]. Экологическая пластичность берез непосредственно связана с генетическим полиморфизмом, наблюдаемым также в картине полиморфизма ряда белков [2]. Полиморфизм создает мобилизационный резерв вида, обеспечивая оптимальную приспособленность отдельных популяций в каждый конкретный момент времени. Изучение изменчивости дегидринов у индивидуальных экземпляров берез ранее ни кем не проводилось. Целью настоящей работы явилось выявление особенностей внутривидового полиморфизма суммарных белков и дегидринов, ассоциированных с процессом криотолерантности почек – наиболее устойчивого органа *B. platyphylla* в разных по климату условиях Центральной и Южной Якутии.

Материалы и методы

Пробы отбирали от постоянных экземпляров растений *B. platyphylla* в период покоя (ноябрь 2009 г.) с двух участков площадью около 1000 м² каждый, расположенных в Центральной Якутии – окрестности г. Якутска (62° N, 129° E) и Южной Якутии – окрестности г. Алдана (58° N, 125° E). Все индивидуальные растения были морфологически описаны по основным критериям согласно методике [2]. Для исследования полиморфизма дегидринов образцы были собраны с 14 индивидуальных деревьев якутской популяции и 10 таковых алданской популяции. В настоящей работе представлены данные по 7 индивидуальным деревьям каждой популяции. Для выделения суммарных белков почки березы (1,5 г) измельчали в ступке в жидком азоте в присутствии нерастворимого поливинилпирролидона (“Serva”, Германия, 2,5% по отношению к объему буфера) и буфера (20 мл), содержавшего 0,1 М Трис–HCl, pH 7,5, 12 mM 2-меркаптоэтанол, 1% ДДС, 10 mM ЭДТА, 3 mM фенилметилсульфонилфторид [7]. Гомогенат центрифугировали 20 мин при 50000 g. К супернатанту, профильтрованному через капроновую ткань, добавляли поливинилпирролидон (2,5 %) и центрифугировали 20 мин при 50000 g. Все процедуры проводили при 4 °C. Белки осаждали пятью объемами ацетона при -20 °C. Содержание белка определяли методом Лоури с помощью набора (“Bio-Rad”, США). Электрофорез проводили в 12,5 % ПААГ с ДДС с использованием маркеров молекулярной массы (“Fermentas”, Литва) и последующим окрашиванием белков Кумасси R-250. На треки наносили равное количество белка (15 мкг). Белки из ПААГ переносили на ПВДФ (поливинилиденфторид) мембрану (“Bio-Rad”, США).

Идентификацию дегидринов выполняли с помощью поликлональных антител против их консервативного К-сегмента 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 (“AppliChem”, Германия).

Эксперименты проводили в трехкратной биологической повторности.

Результаты исследования и их обсуждение

Морфология побегов отобранных экземпляров берез была проанализирована по 16 признакам, включающих оценку степени опушенности, бородавчатости и наличия липидов (смолянистости) стебля молодых побегов, почечных чешуй и листовой пластинки в целом и ее отдельных частей, а также текстуры, формы и соотношения элементов листа (табл.). Степень выраженности каждого из признаков оценивали в баллах от 0 до 4, что в сумме дает величину гибридного индекса (ГИ) березы, позволяющего судить об уровне фенотипических

изменений отдельных растений. Растения обеих местообитаний выявили достаточно плотные и весьма близкие распределения ГИ: для центральноякутских образцов они составили 30–35, для алданских – 29–38 балла. Это указывает на большую схожесть признаков *B. platyphylla* в изученных популяциях с типичными признаками березы повислой (*B. pendula*), в связи с чем ряд авторов считает березу плосколистную лишь ее разновидностью [3].

Таблица. Морфологические признаки *Betula platyphylla* центральноякутской и алданской популяций

№№ пп	Морфологические признаки	Якутск, Ya							Алдан, A						
		1	2	3	4	5	6	7	3	4	5	6	8	9	10
1	Бородавчатость стебля молодых побегов	2	2	2	0	1	1	2	2	1	1	1	0	2	2
2	Опушенность стебля молодых побегов	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
3	Опушенность черешка листовых пластинок	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	3	4	4	4
4	Бородавчатость листовых пластинок	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	Опушенность в углах жилок листовых пластинок	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
6	Опушенность листовых пластинок	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
7	Контрастность жилок на нижней стороне листовых пластинок	2	2	2	2	3	2	2	2	3	2	2	3	3	3
8	Текстура листовых пластинок	2	2	2	2	2	3	2	2	3	2	2	3	2	2
9	Форма вершины листовых пластинок	2	2	2	1	2	3	2	2	3	2	1	1	2	2
10	Характер очертания линий вершины листовых пластинок	3	2	3	3	2	3	4	3	3	3	1	3	3	3
11	Длина центральной жилки до широкой части листовых пластинок	2	2	2	0	2	2	2	2	1	1	2	1	3	1
12	Форма листовых пластинок	2	1	3	2	0	0	1	3	1	1	1	3	3	1
13	Характер зубчатости листовых пластинок	2	2	2	1	3	4	2	2	3	3	2	2	2	3
14	Длина черешка (относительно длины центр жилки)	2	2	1	3	3	1	2	2	1	1	2	1	2	3
15	Сумма:	35	33	35	30	34	35	32	36	35	32	29	33	38	36

Одним из инструментов выявления специфики адаптационного процесса растений служит исследование белковых спектров, в том числе их сезонных изменений [1]. В общем спектре суммарных белков покоящихся побегов *B. platyphylla* из Центральной Якутии и Алдана было идентифицировано около 60 полипептидов (рис. 1). Были найдены общие мажорные белки с молекулярной массой 17, 26, 27, 49 и 51 кД, которые накапливались в осенний период и

имели стабильно высокое содержание во время всего покоя [6]. Одной из характерных черт спектров суммарных белков являлись сдвоенные полосы белков с молекулярной массой 26–27 и 49–51 кД. Причем выраженную сезонную динамику с максимальным содержанием во время покоя и исчезновением в середине вегетации (июль) имели белки с молекулярной массой 26–27 кД. Белки с молекулярной массой 49–51 кД наблюдались круглогодично, но имели повышенное содержание осенью и зимой. Мажорный полипептид с молекулярной массой 17 кД также имел сходную сезонную вариабельность [6].

Не исключается, что обнаруженные нами в спектре суммарных белков якутской березы полипептиды с молекулярной массой 26 и 27 кД имеют отношение к запасным белкам и постепенное их исчезновение весной связано с синтезом *de novo*. Например, белки с молекулярной массой 30 и 31 кД были найдены в белковых тельцах хранения *B. pubescens* Финляндии [9]. У других видов растений также описаны запасные белки со сходными молекулярными массами [10].

Заметных качественных и количественных различий в накоплении полипептидов между двумя популяциями не было найдено. В спектре суммарных белков почек у якутской и алданской популяций наблюдались два вариабельных участка с молекулярной массой 14–16 и 22–25 кД (рис. 1). Прежде всего, это относится к белкам с молекулярной массой 22–25 кД, в данной области выявляются от 1 до 4 минорных белковых полос у разных образцов растений. Другой вариабельный полиморфный участок представлен в области с молекулярной массой 14–16 кД. Таким образом, выявленные полиморфные участки могут служить маркерами отдельных экземпляров берез, но не позволяют выявить достоверные различия между исследованными популяциями.

Сравнение спектров дегидринов показало, что у изученных популяций берез наблюдались две области распределения мажорных дегидринов: низкомолекулярная – в интервале от 15 до 21 кД и среднемолекулярная – в интервале от 56 до 73 кД (рис. 2). Группа дегидринов с низкой молекулярной массой была более разнообразна у берез якутской популяции. Идентифицировались мажорные дегидрины с молекулярной массой 17, 18, 21 кД и минорные дегидрины с молекулярной массой 15 и 19 кД. У берез алданской популяции встречались только мажорный 17 кД- и минорный 15 кД-полипептиды. Причем дегидрин с молекулярной массой 17 кД выявлен у всех исследованных берез. Однако в достаточном количестве он содержался у всех берез только якутской популяции. Половина берез алданской популяции характеризовалось сниженным содержанием данного белка. Относительно высокомолекулярные дегидрины имели множество форм (не менее 15). Причем мажорные 66- и 69 кД-дегидрины выявлены у большинства берез, другие мажорные белки – у отдельных экземпляров. Эта группа дегидринов имела более сглаженную сезонную

вариабельность, присутствовала во все сезоны и не исчезала полностью летом, хотя ее количество падало во время ростового сезона [6]. Группа низкомолекулярных дегидринов имела выраженную динамику, исчезая полностью весной. Они не обнаруживались в течение летних месяцев и появлялись вновь в начале цикла подготовки к покою [6].

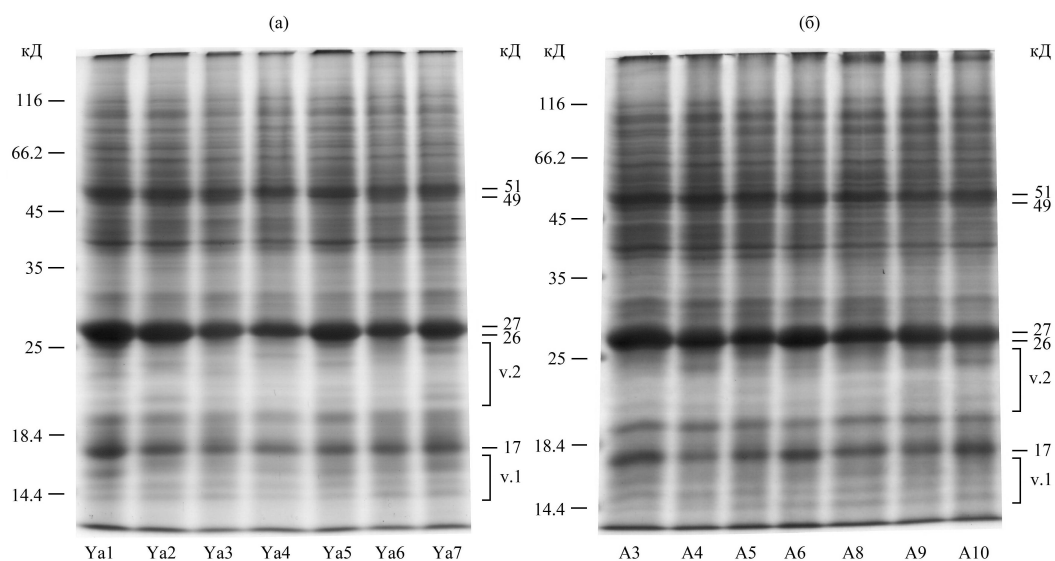


Рис. 1. Спектры суммарных белков почек индивидуальных берез якутской (а) и алданской популяций (б) в период покоя. Слева указаны молекулярные массы стандартов, справа – молекулярные массы некоторых полипептидов с сезонной динамикой и вариабельные участки (v.1 и v.2).

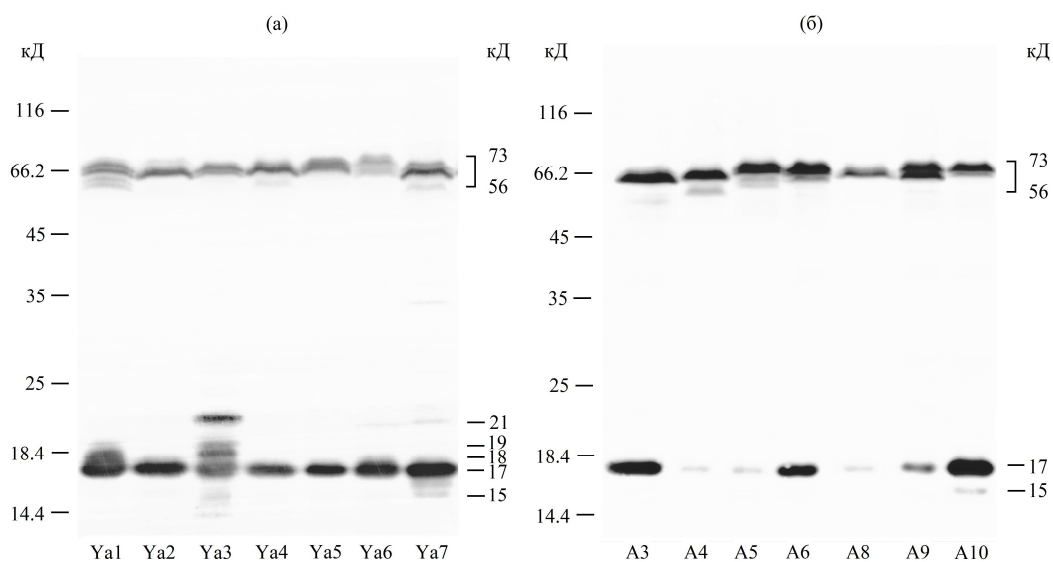


Рис. 2. Спектры дегидринов почек индивидуальных берез якутской (а) и алданской популяций (б) в период покоя. Слева указаны молекулярные массы стандартов, справа – молекулярные массы дегидринов.

Выявленные особенности в содержании 17 кД-дегидрина в изученных популяциях могут быть связаны с адаптационным потенциалом, необходимым для их перезимовки в конкретных условиях Центральной и Южной Якутии. Уровни морозоустойчивости были измерены нами по тканевой проницаемости с помощью игольчатых электродов в побегах центрально- и южноякутской популяций берез [4]. Малая тканевая проницаемость связана с высокой морозоустойчивостью растений. Центральная якутские березы имели более низкую проницаемость тканей по сравнению с южноякутскими. Это коррелирует с минимальными температурами воздуха, которые зимой в Центральной Якутии в среднем бывают ниже на 10 °С по сравнению с Южной Якутией.

Впервые в березах Центральной Якутии были обнаружены низкомолекулярные дегидрины с молекулярной массой 15–21 кД со стабильно высоким содержанием в период покоя. Эта группа дегидринов может быть использована в качестве маркеров морозоустойчивости. Ранее другими авторами на основании данных по изучению криотолерантности и уровня дегидринов были предложены в качестве маркеров холодоустойчивости некоторые дегидрины двух видов винограда (*Vitis vinifera*, *Vitis riparia*), ряда сортов пшеницы (*Triticum aestivum*) и ячменя (*Hordeum vulgare*) [8]. Можно предположить, что высокий уровень дегидринов с молекулярной массой 15–21 кД будет наблюдаться у берез более северных регионов, подверженных действию экстремально низких температур. Повсеместное наличие 17 кД-дегидрина у берез Якутии может указывать на более древний и эволюционно консервативный его характер по сравнению с другими полипептидами, наблюдаемыми в той же области молекулярных масс.

В работе впервые найдено, что полиморфизм группы низкомолекулярных дегидринов с молекулярной массой 15–21 кД более выражен у центральнаякутской популяции берез, чем у алданской. Выявлены различия по количественной представленности этой группы белков у популяций. У центральнаякутских растений она состоит из белков со стабильно высоким содержанием в период покоя. Однако единственный представитель этой группы белков – 17 кД-дегидрин встречался у некоторых экземпляров берез алданской популяции в небольших количествах. Предполагается, что эта группа белков ассоциирована с морозоустойчивостью *B. platyphylla*. Группа дегидринов с молекулярными массами от 56 до 73 кД количественно не отличалась у обеих популяций и обнаруживалась круглогодично, хотя ее содержание уменьшалось летом.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ №09-04-98556-р_восток_а.

Список литературы

1. Бубякина В. В. Особенности сезонной динамики дегидринов *Betula platyphylla* Sukacz., ассоциированные с формированием морозоустойчивости в условиях криолитозоны / В. В. Бубякина, Т. Д. Татарина, А. Г. Пономарев, А. А. Перк, Н. Г. Соломонов // Доклады академии наук. – 2011. – Т. 439, № 6. – С. 844-847.
2. Ветчинникова Л. В. Береза: вопросы изменчивости (морфо-физиологические и биохимические аспекты). – М.: Наука, 2004. – 183 с.
3. Коропачинский И. Ю., Встовская Т. Н. Древесные растения Азиатской России. – Новосибирск: Изд-во СО РАН, филиал “Гео”, 2002. – 707 с.
4. Перк А. А. Физиолого-биохимические характеристики *Betula platyphylla* в условиях Центральной и Южной Якутии / А. А. Перк, А. Г. Пономарев, Т. Д. Татарина, В. В. Бубякина // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. – 2011. – Т. 13, № 1(4). – С. 874-877.
5. Петров К. А. Древесные растения Якутии и низкотемпературный стресс / К. А. Петров, В. Е. Софронова, В. В. Бубякина, А. А. Перк, Т. Д. Татарина, А. Г. Пономарев, В. А. Чепалов, Ж. М. Охлопкова, И. В. Васильева, Т. Х. Максимов // Физиология растений. – 2011. – Т. 58, № 6. – С. 866-874.
6. Татарина Т. Д. Сезонные изменения дегидринов почек *Betula platyphylla* Sukacz., связанных с формированием устойчивости к экстремальному климату Якутии / Т. Д. Татарина, А. Г. Пономарев, А. А. Перк, И. В. Васильева, В. В. Бубякина // Вестник Санкт-Петербургского государственного университета (СПбГУ). – 2011. – Сер. 3, Вып. 4. – С. 107-114.
7. Korotaeva N. E. Variations in the Content of Stress Proteins in the Needles of Common Pine (*Pinus sylvestris* L.) within an Annual Cycle / N. E. Korotaeva, M. V. Oskorbina, L. D. Kopytova, G. G. Suvorova, G. B. Borovskii, V. K. Voinikov // J. For. Res. – 2011. – Doi 10.1007/s10310-011-0260-y.
8. Kosova K., Prasil I. T., Vitamvas P. Role of Dehydrins in Plant Stress Response // Handbook of Plant and Crop Stress / Ed. Pessarakli M. – Tucson: CRC Press, 2010. – P. 239-285.
9. Rinne P. Dehydrins in Cold-Acclimated Apices of Birch (*Betula pubescens* Ehrh.): Production, Localization and Potential Role in Rescuing Enzyme Function during Dehydration / P. Rinne, P. Kaikuranta, L. van der Plas, C. van der Schoot // Planta. – 1999. – V. 209. – P. 377-388.
10. Welling A., Palva E. T. Molecular Control of Cold Acclimation in Trees // Physiol. Plantarum. – 2006. V. 127. – P. 167-181.

Рецензенты:

Ануфриев Андрей Иванович, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник
Института биологических проблем криолитозоны СО РАН, г. Якутск.

Петров Клим Алексеевич, доктор биологических наук, старший научный сотрудник
Института биологических проблем криолитозоны СО РАН, г. Якутск.