

БИОЛОГИЧЕСКИЕ НАУКИ

Физико-химическая биология

УДК 574.24

Сезонные изменения дегидринов в ксилеме и коре *Betula pendula* Roth при формировании устойчивости к холоду в условиях криолитозоны

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

Институт биологических проблем криолитозоны СО РАН, г. Якутск

На примере центрально-якутской популяции березы повислой (*Betula pendula* Roth) показано, что в однолетних побегах при подготовке к покою (август, сентябрь) наблюдается накопление ряда суммарных белков, вероятно, ассоциированных с перезимовкой растений в условиях криолитозоны. Их уровень остается стабильно высоким в течение длительной зимы. В период возобновления роста весной содержание этих полипептидов резко снижается. Обнаружен полиморфизм суммарных белков у отдельных экземпляров берез в двух переменных областях: 23–27 и 16–18 кДа. Впервые изучен состав и сезонные изменения дегидринов в отдельных тканях – ксилеме и коре березы, где выявлены две группы мажорных низкомолекулярных (17, 18 и 21 кДа) и среднемолекулярных (66 и 69 кДа) дегидринов. Низкомолекулярные дегидрины имели более выраженную сезонную динамику, чем среднемолекулярные. Их содержание было самым высоким во время покоя, когда морозоустойчивость растений достигала максимума. Дегидрины 17, 18 и 21 кДа исчезали во время вегетации. Уровень дегидринов в ксилеме во время покоя был выше, чем в коре, что, вероятно, связано с разными стратегиями криотолерантности этих тканей. Выявленные особенности адаптивных изменений дегидринов, а также суммарных белков центрально-якутской популяции *B. pendula* указывают на их важную роль в формировании устойчивости к экстремальным условиям криолитозоны.

Ключевые слова: криолитозона, *Betula pendula*, побеги, ксилема, кора, суммарные белки, дегидрины, сезонная динамика.

Seasonal Changes of Dehydrins in *Betula Pendula* Roth Xylem and Bark During Formation of Resistance to Cold in Permafrost Zone

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

Institute for Biological Problems of Cryolithozone SB RAS, Yakutsk

In the one-year shoots of silver birch (*Betula pendula* Roth) of Central Yakutia population in preparation for dormancy (August, September) we observed the accumulation of a number of total proteins what is probably associated with the plant wintering over under the permafrost zone conditions. Their level remains high for a long winter. The content of these polypeptides is sharply reduced during the resumption of growth in the spring. Polymorphism of total proteins at some birches in two variable domains 23-27 and 16-18 kDa is detected. Two major groups of low molecular weight (17, 18 and 21 kDa) and medium weight (66 and 69 kDa)

ТАТАРИНОВА Татьяна Дмитриевна – к.б.н., с.н.с., anaronomarev@yandex.ru; ВАСИЛЬЕВА Ирина Вениаминовна – вед. инженер, ira_spira_vas@mail.ru; ПЕРК Александр Александрович – н.с., aaperk@mail.ru; БУБЯКИНА Виктория Витальевна – к.б.н., с.н.с.; ПОНОМАРЕВ Анатолий Гаврильевич – к.б.н., с.н.с., anaronomarev@yandex.ru.

*dehydrins are firstly found in the composition of seasonally changing dehydrin specific tissue – xylem and birch bark. Dehydrin of low molecular weight had a more pronounced seasonal dynamics than dehydrins of middle one. Their content was the highest during the dormancy when the plant reaches a maximum freezing tolerance. Dehydrin 17, 18 and 21 kDa disappeared during the growing season. The dehydrins level in the xylem at dormancy was higher than in the cortex, which is probably due to the different tissue strategies for cryotolerance. Dehydrin and total proteins of Central Yakutia population of *B. pendula* showed features of adaptive changes that indicate their important role in resistance to the extreme conditions of the permafrost zone.*

Key words: permafrost, *Betula pendula*, shoots, xylem, bark, total proteins, dehydrins, seasonal dynamics.

Введение

Растения Якутии способны к выживанию в условиях экстремально низких температур и летней засухи. В этой связи весьма актуальным представляется познание механизмов биохимической адаптации, ответственных за формирование морозоустойчивого состояния многолетних растений в уникальных природных условиях криолитозоны.

Среди древесных форм растения северных регионов приобрели самую высокую устойчивость [1]. Различные органы и ткани растений обладают разной степенью устойчивости к действию холодного стресса. Клетки коры в деревьях адаптируются к отрицательным температурам посредством внеклеточного замораживания, тогда как клетки ксилемы – путем глубокого переохлаждения [2–4]. Например, среди 30 генов, связанных с переохлаждением клеток паренхимы ксилемы лиственницы, выделяются гены белков позднего эмбриогенеза, экспрессия которых наиболее интенсивна в предзимний период и снижается к лету [5]. К этим стрессовым белкам относятся дегидрины – неструктурированные белки (unstructured proteins) с высокой степенью конформационной лабильности [6]. Сочетание переменных Y-, S-сегментов и консервативного K-сегмента определяет их функциональные свойства [6–8].

Предполагается, что дегидрины обеспечивают защиту биополимеров от денатурации, вызванной нарушением водного режима растений в условиях низких температур, и проявляют криопротекторную, антифризную, антиоксидантную и металлосвязывающую функции [6–9]. Дегидрины накапливаются в процессе акклиматизации к холоду и придают устойчивость к обезвоживанию при внеклеточном замораживании растительных клеток [10, 11]. Так, находящиеся в состоянии глубокого переохлаждения и не потерявшие влаги паренхимные клетки ксилемы лиственницы накапливают больше дегидринов, чем испытывающие высокую степень дегидратации внеклеточно замороженные паренхимные клетки коры. Вероятно, что некоторые белки семейства дегидринов в паренхимных клетках ксилемы в состоянии глубокого

переохлаждения могут функционировать в качестве антифризных белков. В пользу этого предположения косвенно свидетельствуют данные о том, что неочищенные экстракты, содержащие антифризные белки насекомых, участвуют в переохлаждении капель воды [12]. Известно также, что дегидрин персикового дерева РСА60 проявляет не только криопротективную активность в отношении холодочувствительной лактатдегидрогеназы, но и антифризную функцию, ингибируя рост и развитие кристаллов льда при тепловом гистерезисе [13].

Другой возможной причиной значительного накопления дегидринов в паренхимных клетках ксилемы является более высокая внутриклеточная осмотическая концентрация в них ионов по сравнению с клетками коры [14]. В работах финских авторов показано, что в ходе сезонной холодной акклиматизации и сокращения фотопериода индукция в клетках древесных растений накопления дегидринов сопровождается параллельным увеличением внутриклеточной осмотической концентрации [15]. Эти данные приведены для лиственницы в условиях умеренного климата, в то время как механизмы формирования устойчивости тканей лиственных деревьев фактически не изучены, тем более в условиях экстремально сурового климата Центральной Якутии. Среди лиственных пород береза повислая (*Betula pendula* Roth) – вид с широким ареалом, обладает высокой экологической пластичностью и почти не уступает по степени морозоустойчивости лиственнице [16]. Некоторые особенности дегидринов березы повислой (плосколистной) в условиях Якутии изучены нами ранее [17–20].

Целью работы явилось изучение состава и сезонных изменений дегидринов побегов, а также отдельных тканей – ксилемы и коры центрально-якутской популяции березы повислой *B. pendula* при формировании устойчивости к стрессу холодом в условиях криолитозоны.

Материал и методика

В качестве материала исследований использовали прирост побегов первого года (далее в тексте однолетние побеги) и ткани прироста

(кора, ксилема) 30–40-летних деревьев березы повислой (*Betula pendula* Roth). Сбор образцов осуществляли ежемесячно в 2010–2014 гг. на опытных участках в 7 км от г. Якутска (62° с.ш., 130° в.д.).

Для выделения тотальных белков березы применяли метод Сарнигхаузена [21]. Образцы ткани (1,5–2,0 г) измельчали в жидком азоте, далее проводили экстракцию буфером, содержащим 62,5 мМ Трис-НСl, рН 6,8; 2% Ds-Na; 5% β-меркаптоэтанол; 1 мМ PMSF. После охлаждения экстракты центрифугировали 45 мин при 4 °С и 12000 g. Белки осаждали 5 объемами ацетона при –20°С в течение 1 ч. Выпавший осадок белков собирали центрифугированием при 12200 g (30 мин, 4°С). Осадок белка гомогенизировали в электрофоретическом буфере, содержащем 1М Трис-НСl, рН 7,5; 10% Ds-Na; 5% β-меркаптоэтанол; 10% глицерол. Раствор белка просветляли центрифугированием при 17000 g (20 мин, 4°С) и использовали для проведения электрофореза. Электрофорез белков проводили в 13,5% ДДС-ПААГ [22]. Белки из ПААГ переносили на PVDF мембрану в соответствии с рекомендациями фирмы-изготовителя («Bio-Rad», США) [23]. Для идентификации дегидринов использовали поликлональные антитела («Agriser», Швеция) против их консервативного К-сегмента (ЕККGIME/ДКИКЕКLPG) [9, 23]. Данные сканирования гелей и блотов («Cano», Япония) обрабатывали с помощью программы ImageJ 1.41 o/ Java 1.50_09 (США).

Результаты и обсуждение

Перед определением дегидринов был проведен мониторинг накопления суммарных белков в однолетних побегах, а также тканях ксилемы и коры *B. pendula* в течение годового цикла, который позволил идентифицировать при электрофорезе в 13,5 % ПААГ мажорные белки с молекулярными массами 14, 17, 26, 27, 39, 42, 49, 51 кДа. Уровень данных белков увеличивался при подготовке растений к покою (август, сентябрь) и оставался стабильно высоким в течение продолжительной зимы, а в период возобновления роста побегов весной резко снижался. Это может свидетельствовать о возможном участии этих полипептидов в процессах, ассоциированных с перезимовкой и приобретением устойчивости к холоду в условиях криолитозоны. При сравнении спектров белков между отдельными экземплярами березы повислой установлено наличие переменных участков, расположенных в двух областях: 23–27 и 16–18 кДа, в которых число переменных полос изменялось у разных образцов от 1 (Ya13) до 5 (Ya10) (рис.1). Выявленные полиморфные участки могут слу-

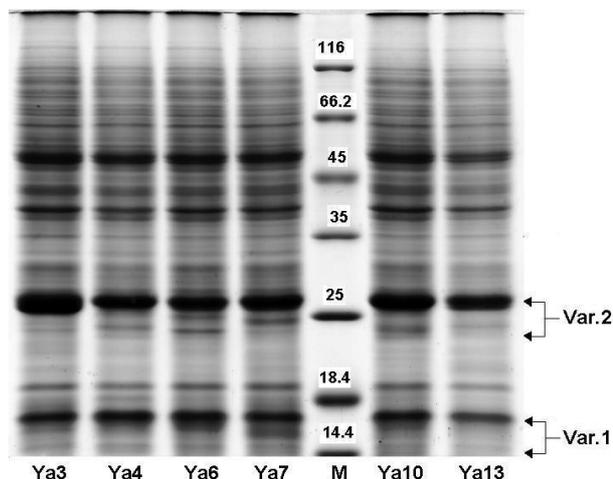


Рис. 1. Электрофорез суммарных белков побегов отдельных растений *B. pendula*: М – молекулярные массы полипептидов (кДа); внизу – код индивидуальных растений; справа – Var. 1, 2 – переменные участки

жить в качестве индивидуальных маркеров изученных берез.

Среди суммарных белков в тканях ксилемы и коры выраженной сезонной динамикой характеризовались низкомолекулярные 14, 17, 26–27 кДа полипептиды. Их количество существенно уменьшалось во время вегетации. В целом, летом в спектрах белков ксилемы и коры преобладают средне- и высокомолекулярные полипептиды, а зимой – низко- и среднемолекулярные. Вместе с тем, состав суммарных белков в ксилеме был более разнообразен, чем в коре. Так, в ксилеме в период покоя растений преобладают белки 13, 17–18, 23, 26, 33, 35, 40, 49 кДа, в коре, напротив, несколько преобладают белки с молекулярными массами 14–15, 25 и 50 кДа. С использованием специфических антител в побегах *B. pendula* выявлены две группы мажорных низкомолекулярных (17, 18 и 21 кДа) и среднемолекулярных (66 и 69 кДа) дегидринов, стабильно высокое содержание которых в период покоя растений совпадает с наибольшей морозостойкостью деревьев.

При изучении распределения дегидринов в тканях коры и ксилемы побегов березы также наблюдали две группы дегидринов, уровень которых в каждой из тканей также оказался самым высоким в период покоя (рис. 2, 3). Низкомолекулярные дегидрины имели более выраженную сезонную динамику, чем среднемолекулярные. В ходе сезонных изменений отмечается исчезновение 17, 18, 21 кДа дегидринов в период роста и развития растений (июнь, июль) и постепенное их нарастание в августе. В начале августа в тканях коры, в отличие от ксилемы, данные дегидрины практически не выявляются. Дегидрины 66 и 69 кДа в тканях коры и ксилемы

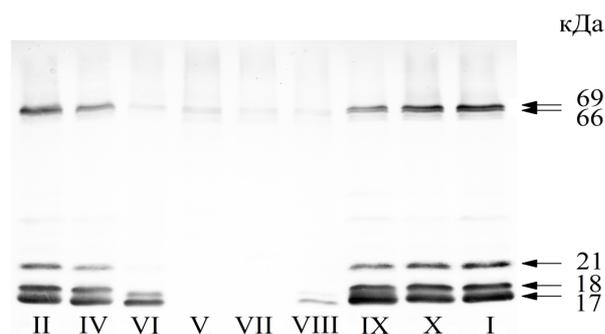


Рис. 2. Сезонная динамика дегидринов ксилемы *B. pendula*: внизу – месяцы отбора проб; справа – молекулярные массы дегидринов

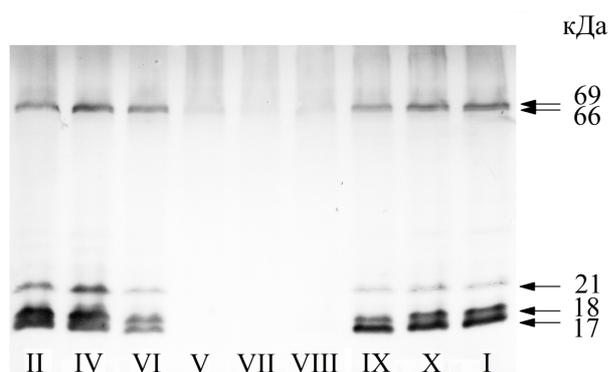


Рис. 3. Сезонная динамика дегидринов коры *B. pendula*: внизу – месяцы отбора проб; справа – молекулярные массы дегидринов

присутствуют круглогодично со стабильно высоким содержанием во время покоя и с некоторым уменьшением содержания летом. В целом, уровень дегидринов в ксилеме, как среднемолекулярных, так и низкомолекулярных, превышает таковой в коре. Можно предположить, что ткани ксилемы и коры побегов березы имеют разные стратегии формирования морозоустойчивости.

Вероятно, в ксилеме березы в условиях Центральной Якутии происходят процессы, подобные глубокому переохлаждению в аналогичных тканях других видов хвойных и лиственных растений умеренных широт, а коре свойственно формирование внеклеточного льда при низких отрицательных температурах, позволяющее избежать его образование внутри клеток [5, 14].

Таким образом, выявленные особенности адаптивных изменений стрессовых белков – дегидринов в тканях ксилемы и коры центрально-якутской популяции *B. pendula* указывают на их важную роль в формировании устойчивости данного вида к экстремальным условиям криолитозоны.

Работа выполнена в рамках НИР по проекту № 0376-2014-0006, тема 56.1.6. «Продукционный процесс и физиолого-биохимические меха-

низмы устойчивости растений в криолитозоне», № гос. регистрации 01201282193.

Литература

1. Sakai A., Larcher W. Frost survival of plants. – 1987. – V. 62. – P. 210–213.
2. Quamme H.A., Chen P.M., Gusta L.V. Relationship of deep supercooling and dehydration resistance to freezing injury in dormant stem tissues of «Starkrimson Delicious» apple and «Siberian C» peach // J. Amer. Soc. Hort. Sci. – 1982. – V. 107. – P. 299–304.
3. Ashworth E.N., Echlin P., Pearce R.S., Hayes T.L. Ice formation and tissue response in apple twigs // Plant, Cell and Environment. – 1988. – V. 11. – P. 703–710.
4. Malone S.R., Ashworth E.N. Freezing stress response in woody tissues observed using low-temperature scanning electron microscopy and freeze substitution techniques // Plant Physiol. – 1991. – V. 95. – P. 871–881.
5. 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, № 13. – P. 3731–3742.
6. 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.
7. Welling A., Palva E.T. Molecular control of cold acclimation in trees // Physiol. Plant. – 2006. – V. 127. – P. 167–181.
8. Kosova K., Prasil I.T., Vitamvas P. Role of dehydrins in plant stress response // Handbook of plant and crop stress. – CRC Press, Tucson. – 2010. – P. 239–285.
9. Svensson J., Ismail A.M., Palva E.T., Close T.J. Dehydrins // Cell and molecular responses to stress. – Amsterdam, NL: Elsevier Press. – 2002. – V. 8. – P. 155–171.
10. Close T.J. Dehydrins: a commonality in the response of plants to dehydration and low temperature // Physiol. Plant. – 1997. – V. 100. – P. 291–296.
11. Danyluk J., Perron A., Houde M., Limin A., Fowler B., Benhamou N., Sarhan F. Accumulation of an acidic dehydrin in the vicinity of the plasma membrane during cold acclimation of wheat // The Plant. Cell. – 1998. – V. 10. – P. 623–638.
12. Patterson J.L., Duman J.G. The role of the thermal hysteresis factor in *Tenebrio molitor* larvae // J. Exp. Biol. – 1978. – V. 74. – P. 37–45.
13. Wisniewski M., Webb R., Balsamo R., Close T.J., Yu X.M., Griffith M. Purification, immunolocalization, cryoprotective, and antifreeze activity of PCA60: a dehydrin from peach (*Prunus persica*) // Physiol. Plant. – 1999. – V. 105. – P. 600–608.

14. Kasuga J., Arakawa K., Fujikawa S. High accumulation of soluble sugars in deep supercooling Japanese white birch xylem parenchyma cells // *New Phytologist*. – 2007. – V. 174. – P. 569–579.

15. Welling A., Moritz T., Palva E.T., Junttila O. Independent activation of cold acclimation by low temperature and short photoperiod in hybrid aspen // *Plant Physiol*. – 2002. – V. 129. – P. 1633–1641.

16. Уткин А.И. Леса Республики Саха (Якутия) – феномен таежного пояса Северной Евразии // *Хвойные бореальной зоны*. – 2006. – Вып.3. – С. 7–14.

17. Пономарев А.Г., Татарина Т.Д., Перк А.А., Бубякина В.В., Алексеев В.А. Физиолого-биохимические характеристики *Betula platyphylla* в связи с условиями произрастания на многолетней мерзлоте // *Вестник Московского гос. ун-та Леса* – Лесной вестник. – 2009. – № 2. – С. 12–16.

18. 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.

19. Татарина Т.Д., Пономарев А.Г., Перк А.А., Васильева И.В., Бубякина В.В. Сезонные изменения дегидринов почек *Betula platyphylla* Sukacz., связанных с формированием устойчивости к экстремальному климату Якутии // *Вестник Санкт-Петербургского гос. ун-та*. – Сер. 3. – 2011. – Вып. 4. – С. 107–114.

20. Пономарев А.Г., Татарина Т.Д., Перк А.А., Васильева И.В., Бубякина В.В. Дегидрины, ассоциированные с формированием морозоустойчивости березы плосколистной // *Физиология растений*. – 2014. – Т. 61, № 1. – С. 114–120.

21. 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.

22. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage. T.4 // *Nature*. – 1970. – V. 227. – P. 680–685.

23. Timmons T.M., Dunbar B.S. Protein blotting and immunodetection // *Methods enzymol*. – 1990. – V. 182. – P. 679–701.

Поступила в редакцию 04.02.2016

УДК 612.821

Иллюзия подвижки фрагментов зрительного образа неподвижных картин

И.Э. Рабичев*, А.В. Котов****, К.Д. Дорофеев**

*Московский педагогический государственный университет, г. Москва

**Научно-исследовательский институт нормальной физиологии им. П.К. Анохина, г. Москва

***Новгородский государственный университет им. Ярослава Мудрого, г. Великий Новгород

Описаны эксперимент и вероятный механизм субъективного феномена зрительной иллюзии подвижки фрагментов зрительного образа неподвижных картин. Выявлены условия возникновения иллюзий подвижки фрагментов зрительного образа. Вероятным механизмом возникновения иллюзии подвижки фрагментов зрительного образа является нейродинамический конфликт в структурах центральной нервной системы, возникающий при неадекватной переработке зрительной информации, приходящей с периферических магноцеллюлярных рецептивных полей сетчатки во время саккад.

Ключевые слова: зрительные иллюзии подвижки, рецептивные поля сетчатки, саккады.

Illusion of Shifting of Parts of a Visual Image of Static Pictures

I.E. Rabichev*, A.V. Kotov****, K.D. Dorofeev**

*Moscow State Pedagogical University, Moscow

** Anokhin Institute of Normal Physiology, Moscow

***Yaroslav-the-Wise Novgorod State University, Velikiy Novgorod

The article describes an experiment and a probable mechanism of a subjective phenomenon of visual illusion of shifting of visual image's parts of static pictures. Conditions of origin of this illusion of shifting of vis-