

УДК 574.24

ДЕГИДРИНЫ В АДАПТАЦИИ СОСНЫ ОБЫКНОВЕННОЙ И ЕЛИ СИБИРСКОЙ К УСЛОВИЯМ ПРОИЗРАСТАНИЯ В ПЕРИОД ВЕГЕТАЦИИ

Н. Е. Коротаева, М. В. Иванова, Г. Г. Суворова, Г. Б. Боровский

Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН
664033, Иркутск, ул. Лермонтова, 132

E-mail: knev73@yandex.ru, omaria-84@yandex.ru, galina.g.suvor@gmail.com, borovskii@sifibr.irk.ru

Поступила в редакцию 03.08.2020 г.

Участие белков стресса в формировании приспособленности растений к условиям окружающей среды до сих пор не раскрыто полностью. Для выявления роли дегидринов (ДГ) в стратегии биохимической адаптации видов, занимающих различные экологические ниши, сопоставляли количество и сезонную динамику ДГ в хвое сосны обыкновенной *Pinus sylvestris* L. и ели сибирской *Picea obovata* Ledeb. в условиях периода вегетации. Погодные условия в период исследования были благоприятными для фотосинтетической активности хвойных. Если судить по суммарной месячной интенсивности поглощения CO₂, физиологическая активность обоих видов не отличалась от присущих им средних значений этого показателя. Различными в хвое сосны и ели оказались количественное соотношение содержания конститутивных ДГ 72 и 55 кД, которое варьирует в зависимости от сезона, а также накопление «уникальных» для каждого вида ДГ, которые располагались у сосны в высоко- и низкомолекулярных областях, а у ели – в среднемoleкулярной. Полученные результаты позволяют предположить, что приуроченность произрастания сосны обыкновенной к более засушливым условиям вегетации, а ели сибирской – к более влажным, но холодным может быть сопряжена с накоплением определенных ДГ. К способности сосны обыкновенной и ели сибирской занимать разные места обитания может иметь отношение повышенное накопление конститутивных белков ДГ 72 и 70 (у сосны) и 55 кД (у ели), но не различия в составе ДГ.

Ключевые слова: *Pinus sylvestris* L., *Picea obovata* Ledeb., хвоя, белки, сезонная адаптация.

DOI: 10.15372/SJFS20200605

ВВЕДЕНИЕ

Изучение факторов адаптации растений к неблагоприятным условиям среды является одной из приоритетных задач экофизиологии растений. Приуроченность различных видов к определенным климатическим зонам определяется их устойчивостью к неблагоприятным условиям среды. Дифференциальная активность генов и биосинтез различных групп белков – факторы, определяющие устойчивость к неблагоприятным условиям на клеточном уровне. Белки-дегидрины (ДГ) относятся ко II классу LEA-белков (или белков позднего эмбриогенеза, late embryogenesis abundant proteins) и известны как биохимические факторы сезонной холодной акклимации. Накопление ДГ способствует

приобретению устойчивости к стрессам, сопряженным с потерей влаги: охлаждению, замораживанию, засолению или засухе (Welling, Palva, 2006; Cuevas-Velazquez et al., 2014). В составе специфической для всех изученных ДГ К-последовательности, которая обеспечивает этим белкам свойство высокой гидрофильности, сосредоточено большое количество полярных аминокислот. Гидрофильностью объясняется способность ДГ удерживать большое количество молекул воды, связываться с заряженными поверхностями других белков, нуклеиновых кислот и преимущественно с заряженными жирными кислотами клеточных мембран в условиях засухи или почвенного засоления, что предотвращает нарушения структуры и функциональности этих клеточных компонентов (Cuevas-

Velazquez et al., 2014). Накопление отдельных ДГ в клетке вызывается как отдельными внешними стимулами, так и их различными сочетаниями (Bassett et al., 2006).

ДГ древесных растений, особенно голосеменных, остаются слабо исследованными. Разнообразие генетических последовательностей ДГ у отдельных видов голосеменных в 2 раза и более выше, чем у покрытосеменных (Nystedt et al., 2013; Sena et al., 2018), что может указывать на их важную роль для этой группы растений и на сложность системы экспрессии их генов. Организация генома ДГ голосеменных имеет ряд специфических особенностей, отличающих его от организации генома ДГ покрытосеменных (Perdiguero et al., 2012; Sena et al., 2018). К настоящему времени описано несколько ДГ сосны обыкновенной *Pinus sylvestris* L., произрастающей в Прибайкалье (Korotaeva et al., 2015, 2017) и в зоне вечной мерзлоты (Петров и др., 2011; Petrov et al., 2011; Tatarinova et al., 2017), и ДГ ели сибирской *Picea obovata* Ledeb., произрастающей в Норвегии (Kjellsen et al., 2013). Влияние определенных воздействий на экспрессию генов ДГ хвойных описано большей частью для засухи (Perdiguero et al., 2012; Velasco-Conde et al., 2012), однако показана связь между накоплением ДГ и устойчивостью к холоду ели сибирской (Kjellsen et al., 2013) и сосны веймутовой *Pinus strobus* L. (Chang et al., 2016).

К настоящему времени количество полевых сравнительных исследований ДГ отличающихся по устойчивости древесных и кустарниковых растений невелико по сравнению с таковыми травянистых растений. Artlip et al. (1997) показали, что накопление ДГ РСА60 на уровне РНК и белка больше в коре холодостойкой листопадной формы персика *Prunus* по сравнению с его менее стойкой вечнозеленой формой. Уровень экспрессии генов ДГ выше в декабре и январе у холодостойкого сорта роз *Rosa* L. по сравнению с нестойким (OuYang et al., 2019) и у более стойких форм кипариса *Cupressus* L. (Baldi et al., 2011). Различия обнаружены у произрастающих в разной местности сортов персика (Hussain et al., 2015) и абрикоса *Prunus* (Yamane et al., 2006). Таким образом, на уровне транскриптов и белка интенсивность накопления и разнообразие ДГ у древесных растений различаются в зависимости от уровня толерантности к холоду и засухе.

Виды хвойных деревьев отличаются по своим экологическим характеристикам, пределам и оптимумам реализации физиологических функций, ширине адаптивного потенциала. Так, по

приуроченности к местам произрастания сосна обыкновенная требовательна к температуре почвы и светолюбива, тогда как ель сибирская теневынослива, требовательна к влажности и богатству почвы, но менее требовательна к теплу (Суворова, 2009). По уровню фотосинтетической продуктивности каждый из видов более требователен к одному из климатических и погодных факторов: ель сильнее зависит от доступности почвенной влаги, тогда как сосна – от охлаждения корневой системы (Суворова, 2009; Иванова, Суворова, 2014). Распространение этих деревьев на территории Евразии указывает на больший потенциал к произрастанию в сухих районах у сосны, тогда как у ели – в более холодных и влажных (Суворова, 2009). Принадлежность сосны обыкновенной и ели сибирской к различным экологическим группам определяется также строением хвои (Загирова, 1999) и функциональными приспособлениями (Иванова, Суворова, 2014). Например, показано, что устойчивость фотосинтетического аппарата хвойных к неблагоприятным внешним факторам определяется количеством мезофилла, доля которого значительно выше в хвое ели по сравнению с хвоей сосны (Иванова, Суворова, 2014). В условиях засухи деревьями также используются различные стратегии для достижения наивысших значений продуктивности фотосинтеза: содержание хлорофилла, от которого зависит продуктивность, у сосны регулируется температурой почвы, тогда как у ели – водным режимом (Иванова, Суворова, 2014). Примечательно, что как охлаждение, так и засуха являются факторами, определяющими накопление ДГ у подвергнутых этим воздействиям растений (Perdiguero et al., 2012; Cuevas-Velazquez et al., 2014). Таким образом, сезонная динамика и состав ДГ хвои этих деревьев также могут различаться в зависимости от экологических характеристик двух видов. Наличие или отсутствие таких различий могло бы позволить сделать вывод о месте ДГ среди адаптаций, позволяющих представителям вида занимать определенные экологические ниши. Сопоставление полиморфизма и динамики ДГ у деревьев таксонов *Picea* и *Pinus* позволило бы в дальнейшем оценить вклад ДГ в возможность распространения этих видов. Задача данной работы – сопоставление количества и разнообразия ДГ, накапливающихся в период вегетации в хвое сосны обыкновенной и ели сибирской, произрастающих в Прибайкалье, с целью выявления связи между особенностями состава ДГ и экологическими характеристиками каждого вида.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проведено в 2012 г. Использовали по три 27-летних дерева сосны обыкновенной и ели сибирской, произрастающих на экспериментальном участке СИФИБР СО РАН, заложенном из однолетних саженцев в 1985 г. Насаждение расположено на окраине г. Иркутска на участке с координатами 52°01'40" с. ш., 104°01'60" в. д., на пологом склоне восточной экспозиции крутизной 2-3°. Почва на участке серая лесная неоподзоленная суглинистая на юрских углистых суглинках, подстилаемых песком. Грунтовые воды залегают на значительной глубине (11–50 м) и не оказывают заметного влияния на режим влажности почв.

При характеристике гидротермических условий измеряли температуру воздуха и почвы, интенсивность солнечной радиации и влажность почвы, как описано ранее (Korotaeva et al., 2015, 2017). Поскольку неблагоприятные условия произрастания, влияющие на накопление ДГ, отражаются и на физиологическом состоянии, в период вегетации в качестве индикационного параметра оценивали поглощение CO_2 в сутки (P_{CO_2}) как интегральный показатель физиологической активности деревьев и влияние на него комплекса внешних условий. Для оценки P_{CO_2} определяли фотосинтетическое поглощение углекислого газа охвоенными побегами 2-го года жизни, которое регистрировали многоканальной установкой, смонтированной на основе ИК-газоанализатора «Infralyt-4» (Germany) (Щербатюк, 1990). Измерения CO_2 -газообмена производили 3-4 дня каждую неделю на 2-летних побегах с момента появления первых признаков ассимиляционной активности в апреле до ее полного прекращения в течение последних 10 дней октября. Цилиндрические полиэтиленовые ассимиляционные кюветы были установлены на южной стороне верхней трети кроны деревьев. Для расчета скорости фотосинтеза на единицу массы навески хвои высушивали до сухой массы в термостате при 105 °С, для расчета использовали формулу из работы (Щербатюк и др., 1991). Значения скорости фотосинтеза для каждого часа суток использовали для расчета дневного (суточного) среднего и среднемесячного P_{CO_2} , на основании которого вычисляли суммарное P_{CO_2} за месяц. Каждый месяц проводили от 50 (в апреле) до 200 измерений (в остальные месяцы) каждого дерева. Данные представляли как среднее арифметическое P_{CO_2} для трех деревьев и стандартное отклонение. Нормаль-

ность распределения оценивали по критерию Колмогорова–Смирнова. Достоверность различий определяли по U-критерию Манна–Уитни ($p < 0.05$). Для статистической обработки использовали программы Excel и Statistica.

Для исследования ДГ использовали хвою 2-го года, собранную с апреля по октябрь 2012 г. в 20-х числах каждого месяца. При выделении общего белка использовали суммарную пробу трех деревьев, содержащую по 0.2 г хвои от каждого дерева. При экстракции общего белка использовали подход, применяемый при подготовке проб для двумерного электрофореза, когда на измельченный образец ткани действуют органическим веществом, вызывающим денатурацию белков, а затем экстрагируют белковый осадок в среду для электрофоретического фракционирования (Rabilloud, Chevallet, 2000). Пробу тщательно растирали с жидким азотом в присутствии кварцевого песка и 0.5 г PVP, затем смешивали с 5 мл охлажденной смеси метанол:хлороформ (5:1, v/v). Смесь делили на 7 порций по 600–650 мкл и центрифугировали с охлаждением (9000 г, 2 мин). Получившийся осадок замораживали и хранили при –70 °С. Выделение каждой пробы проводили в двух повторностях. Для подготовки пробы к электрофоретическому фракционированию осадок 5 мин инкубировали с 500 мкл буфера для образца (0.5 М трис-НСl, pH 6.8, 1 mM ЭДТА, 10 % ДДС и 20 % глицерина) в ультразвуковой ванне (Ферропласт Медикал, Россия) при 20 °С, затем 10 мин в термощейкере (BioSun, Польша) при 25 °С и вновь в ультразвуковой ванне (20 °С), 3 мин держали на кипящей водяной бане и центрифугировали (12 000 г, 3 мин). Содержание белка в пробе оценивали флуориметрически с помощью Qubit™ (Invitrogen, USA) с использованием набора (Quant-iT Protein Assay kits, Invitrogen) по прилагаемой инструкции. Общий белок, выделенный из хвои, использовали для электрофоретического фракционирования в 12%-ном ДДС-Na с последующим Вестерн-блоттом с помощью системы mini-Protean III (Bio-Rad, USA). Для электрофоретического разделения наносили по 30 мкг белка на трек. Нанесение белка нормализовали по окраске Кумасси. Детекцию ДГ проводили иммунохимически с использованием первичных (Agrisera, AS07 206; разведение 1 : 1000) и вторичных антител, конъюгированных со щелочной фосфатазой (Sigma, USA; разведение 1 : 1000) (Timmons, Dunbar, 1990). Каждую пробу детектировали с помощью двух повторностей Вестерн-блотта. Молекулярные массы ДГ

определяли по пробегу белка от старта (Rf) с помощью белковых маркеров (PageRuler Marker 26614, ThermoScientific).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В период исследования среднемесячная температура воздуха была выше среднемноголетних значений, а уровень солнечной радиации незначительно отличался от среднемноголетних значений (см. таблицу).

В апреле, мае и июле общее количество осадков значительно превышало среднемноголетние значения, в другие месяцы их уровень был оптимальным. Среднемесячная температура почвы на глубине 20 см на протяжении всего вегетационного периода была ниже среднемноголетних значений из-за высокого уровня влажности. Таким образом, погодные условия в период исследования были благоприятными для вегетации хвойных.

Показатель (P_{CO_2}) использовали для оценки и сопоставления физиологической активности деревьев. Для сравнительной оценки P_{CO_2} приведены данные наименее благоприятного (жаркого и сухого) 2003 г. и максимально благоприятного по климатическим условиям теплого и влажного 2004 г. (рис. 1).

Как видно, значения P_{CO_2} 2003 и 2004 гг. при попарном сравнении одноименных месяцев достоверно отличаются друг от друга для каждого вида (см. рис. 1, А). P_{CO_2} обоих видов все годы в середине периода вегетации закономерно увеличивается по сравнению с его началом и окончанием, за исключением показателя сосны

обыкновенной в 2003 г. В первой половине вегетационного периода 2012 г. P_{CO_2} сосны оказывается значительно выше, чем ели сибирской, остается стабильно высоким в первую половину вегетации и значительно снижается в августе (см. рис. 1, Б). P_{CO_2} ели в первой половине 2012 г. оказывается невысоким, а начиная с весны стабильно увеличивается и достигает наибольших значений к концу вегетационного периода. В конце вегетационного периода 2012 г. его показатели для обоих деревьев оказались средними относительно других лет наблюдений и близкими по значению. P_{CO_2} сосны обыкновенной и ели сибирской не имеют существенных отличий в конце вегетационного периода в благоприятный год, неблагоприятный и в год исследования. Таким образом, значения P_{CO_2} в 2012 г. не всегда достоверно отличаются от 2003 или 2004 гг., но оказываются в пределах значений 2003 и 2004 гг.

В хвое сосны в октябре (рис. 2, а) и в мае (рис. 2, б) обнаружено 7 ДГ с молекулярными массами 130, 120, 72, 55, 47, 26 и 14.5 кД, из них содержание белков с мол. массами 120, 72 и 14.5 кД преобладало в пробе («мажорные» белки) по сравнению с другими ДГ («минорные» белки). В хвое ели в октябре (см. рис. 2, а) и в мае (см. рис. 2, б) обнаружено 7 ДГ с мол. массами 72, 55, 47, 40, 38, 34 и 14.5 кД. Причем в мае не были найдены ДГ 34 и 38 кД. Из найденных ДГ отмечено наибольшее содержание белков с мол. массами 55 и 47 кД. ДГ с мол. массами 72, 55, 47 и 14.5 кД обнаружены в хвое обоих деревьев, остальные белки оказались «уникальными» для каждого вида. Все перечисленные ДГ,

Гидротермические условия вегетационного периода 2012 г.

Фактор	Год	Апрель	Май	Июнь	Июль	Август	Сентябрь	Октябрь
Осадки, мм	2012	54	63	42	185	59	31	20
	Среднее многолетнее ¹	16	31	69	99	84	46	20
Среднемесячная температура воздуха, °С	2012	2.3	9.5	16.8	18.0	13.7	10.3	1.3
	Среднее многолетнее ¹	1.4	9.1	15.3	17.9	15.3	8.4	0.8
Среднемесячная температура почвы на глубине 20 см, °С	2012	–	2.6	10.2	13.8	13.5	11.3	6.4
	Среднее многолетнее ²	0.7	7.4	13.9	17.4	16.3	10.6	3.7
Среднемесячная суммарная солнечная радиация, моль · м ⁻²	2012	1473	2818	2994	2310	2114	2253	1246
	Среднее многолетнее ³	2150	2720	2808	2637	2219	1647	1076

Примечание. ¹ – для периода с 1882 по 2008 г.; ² – для периода с 1963 по 2008 г. (для обоих периодов данные получены из базы Всероссийского исследовательского института гидрометеорологической информации); ³ – для периода с 1880 по 1980 г. (Барт и др., 1981).

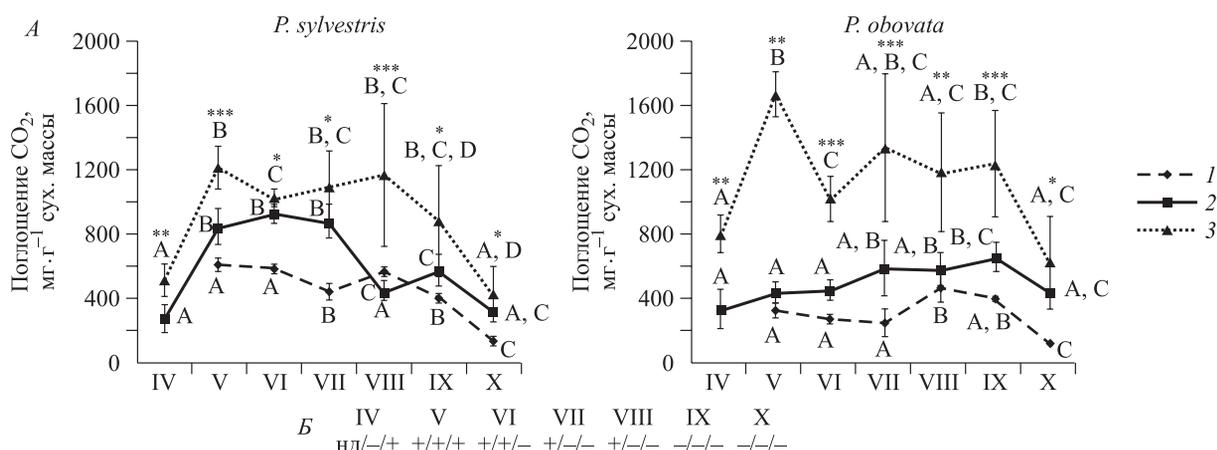


Рис. 1. А – изменение уровня поглощения CO_2 сосны обыкновенной и ели сибирской в период вегетации в разные годы исследований: 1 – 2003; 2 – 2012; 3 – 2004. Представлены средние арифметические значения и стандартные отклонения ($n = 3$). По оси X римскими цифрами обозначены номера календарных месяцев. Латинскими буквами на графике обозначена достоверность различий между месяцами одного сезона. Одинаковые буквы обозначают отсутствие значимых различий. * – различия между 2003 и 2012 гг. в данный месяц достоверны. ** – различия между 2004 и 2012 гг. в данный месяц достоверны. Различия между 2003 и 2004 гг. достоверны для каждого вида в каждый одноименный месяц. Б – значимость различий в поглощении CO_2 между видами сосна обыкновенная и ель сибирская по месяцам в 2003/2012/2004 гг. «нд» – нет данных (измерений не проводилось); «+» – различия между видами достоверны; «-» – различия между видами недостоверны. Для выявления достоверности различий использован U-критерий Манна-Уитни ($p < 0.05$).

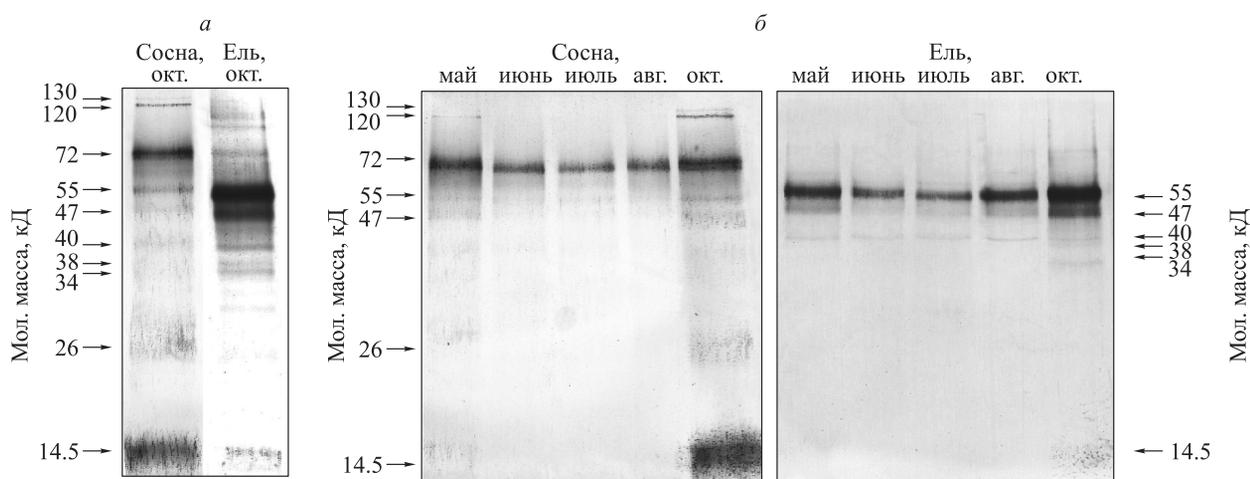


Рис. 2. Содержание ДГ в октябре (а) и динамика изменения содержания ДГ в период вегетации (б) в хвое сосны обыкновенной и ели сибирской.

кроме ДГ 130, 120, 34, 26 и 14.5 кД, присутствуют в хвое постоянно, т. е. являются «конstitutивными» белками (см. рис. 2, б). Для обоих видов деревьев характерны рост содержания ДГ в холодные месяцы вегетационного периода (май, октябрь) и его снижение в середине летнего периода (июль).

Фотосинтетическая активность является одним из индикаторов «комфортности» условий существования растительных организмов, а также показателем функциональной активности хвои. P_{CO_2} сосны обыкновенной и ели сибирской

зависит от условий периода вегетации и предшествующих климатических условий. В более благоприятный для вегетации 2004 г. разброс значений P_{CO_2} в середине вегетационного периода между деревьями одного вида оказался больше, чем в менее благоприятные 2003 и 2012 гг., причем для обоих видов (см. рис. 1, А). Очевидно, в благоприятных условиях в большей степени раскрылись потенциальные возможности отдельных деревьев, которые повлияли на разброс значений P_{CO_2} . Различия в P_{CO_2} между видами оказались несущественными в конце периода

вегетации независимо от условий каждого года и больше всего были выражены в неблагоприятный для вегетации год (см. рис. 1, Б). Таким образом, межвидовые различия в уровне поглощения CO_2 сосны обыкновенной и ели сибирской проявлялись в большей степени в неблагоприятных условиях. Возможно, это объясняется меньшим разбросом значений P_{CO_2} в 2003 г. Как видно, у ели сибирской по сравнению с сосной обыкновенной больше величина различий P_{CO_2} между благоприятным и неблагоприятным годами. Большее количество мезофилла в хвое ели по сравнению с хвоей сосны (Иванова, Суворова, 2014) позволяет ели сибирской достигать больших значений P_{CO_2} в благоприятный для вегетации год. В менее благоприятный сухой 2003 г. P_{CO_2} ели сибирской закономерно оказалась подавленной в большей степени, чем сосны обыкновенной, которая лучше приспособлена к засухе. Вегетационный период 2012 г. был теплым и влажным, с неравномерным распределением осадков, что повлияло на величину P_{CO_2} , но в целом благоприятным для P_{CO_2} хвойных, которая находилась в пределах значений 2003 и 2004 гг. Если судить по P_{CO_2} , физиологическая активность обоих видов деревьев в год исследования находилась в пределах границ инвариантности, для которых характерны средняя интенсивность обменных процессов и отсутствие структурных изменений (Кайбияйнен, 2003), что позволяет в этот год сравнивать содержание ДГ хвои ели и сосны. Как известно, оптимальный уровень реализации физиологических процессов достигается в широких пределах вариации внешних факторов (Кайбияйнен, 2003). P_{CO_2} сосны в августе значительно снизилась в результате того, что в июле выпало очень большое количество осадков, после чего в июле и августе понизилась температура почвы и из-за облачной погоды уменьшился уровень падающей солнечной радиации, что привело к снижению фотосинтетической активности сосны обыкновенной, так как она очень чувствительна к температурным условиям и количеству солнечного света (Baldi et al., 2011). К началу вегетации температура почвы была недостаточно высока для полной реализации фотосинтетической активности ели сибирской, корневая система которой, как известно, очень чувствительна к влажности и температуре почвы (Baldi et al., 2011), поэтому P_{CO_2} ели в этот период оказалась низкой.

Обнаруженные в данной работе ДГ сосны обыкновенной близки по молекулярной массе белкам, выявленным нами ранее (Korotaeva et

al., 2015, 2017), хотя массы белков немного отличаются. Так, набор ДГ сосны, накапливающихся в период с мая по октябрь, в наших прежних работах включал белки с мол. массами 76, 73, 72, 45, 44 и 17 кД. В данной работе массы белков составляли 72, 55, 47, 26 и 14.5 кД. Очевидно, что в обоих исследованиях обнаружены белки высоко- (76–72 кД), средне- (47–26 кД) и низкомолекулярной групп (17–14.5 кД). Мы связываем различия ДГ по составу и по молекулярной массе, во-первых, с погрешностями определения молекулярной массы белка по пробегу в геле при электрофорезе, во-вторых, с использованием другого способа выделения, в-третьих, с использованием других антител против ДГ (Agriseria), что может повлиять на состав выявленных ДГ (Боровский и др., 2019).

В мае и во второй половине вегетационного периода у сосны обнаружено 7 ДГ, в хвое ели – 6. Возможно, большее разнообразие ДГ в хвое сосны связано с ее большей ксерофитностью, так как накопление ДГ тесно связано с приобретением засухоустойчивости (Cuevas-Velazquez et al., 2014). Функции ДГ при этом заключаются в связывании воды и защите белков от агрегации в период весенней засухи либо при холодовом обезвоживании внутриклеточной среды осенью (Cuevas-Velazquez et al., 2014). Однако различия в разнообразии ДГ хвои при использовании одномерного электрофоретического фракционирования у сосны и ели оказались небольшими как по количеству конститутивно накапливающихся, так и по количеству «уникальных» ДГ. Причина может быть в том, что выровненность условий в год исследования, отсутствие специфических стрессовых нагрузок в виде сильного охлаждения (для ели), либо засухи (для сосны) не позволили обоим видам проявить характерные механизмы приспособляемости. Возможно также, что роль ДГ в формировании способности к переживанию засухи или холода для древесного растения не столь велика, как может быть для травянистых растений, поскольку древесное растение обладает большими приспособительными и компенсаторными ресурсами. Например, для хвои важную защитную и адаптационную роль могут играть такие факторы, как толщина клеточных стенок, объем мезофилла, соотношение количества мезофилла, защитных и проводящих структурных элементов (Загирова, 1999). С другой стороны, двумерное разделение, которое обнаруживает большее количество белковых форм, могло бы позволить уловить больше различий.

И у ели, и у сосны обнаружены ДГ, которые присутствуют в хвое постоянно, независимо от смены условий вегетационного периода, хотя количество этих ДГ в летние месяцы все-таки немного меньше. У сосны это белок 72 кД, у ели – 55 кД. Похожие результаты получены для ДГ 69, 66, 64 кД из почек березы плосколистной, произрастающей в Якутии (Пономарев и др., 2014; Ponomarev et al., 2014). Роль такого постоянного присутствия ДГ пока не ясна. Известно, что накопление некоторых ДГ в отсутствие стресса возможно на определенных этапах развития растения (Rodriguez et al., 2005) или в определенных органах (Hara et al., 2011). Вероятность зависимости накопления ДГ 55 кД ели от этапа развития не очень велика, так как белок похожей массы обнаруживался в хвое разного возраста (Kjellsen et al., 2013). Конститутивное накопление ДГ может быть связано и с их способностью связывать двухвалентные металлы и участвовать в их транспорте в нестрессовых условиях (Hara et al., 2011). В этом случае ДГ накапливаются в проводящей системе растения. Можно предположить, что ДГ 72 кД сосны и 55 кД ели либо специфичны для хвои, либо участвуют в транспортных процессах в проводящих элементах. Как видно из рис. 2, межвидовые различия ДГ хвои обнаруживаются именно для конститутивных белков. Если предположить, что эти конститутивные ДГ задействованы в системе транспорта, то, возможно, ДГ имеют отношение к межвидовым различиям в части особенностей реализации транспортной функции.

Наибольшее содержание ДГ у обоих деревьев закономерно отмечалось в самые холодные месяцы периода наблюдений – в мае и октябре. В хвое ели впервые показано на протеомном уровне накопление в эти месяцы низкомолекулярного ДГ (нмДГ) с массой 14.5 кД. Белок схожей мол. массы обнаружен ранее в хвое сосны (Петров и др., 2011; Petrov et al., 2011; Korotaeva et al., 2015; Tatarinova et al., 2017), у березы плосколистной *Betula platyphylla* Sukaczew (Пономарев и др., 2012, 2013; Боровский и др., 2019) и березы повислой *Betula pendula* Roth (Татаринова и др., 2013). Низкомолекулярный ДГ определялся у зимующих деревьев исключительно в холодные месяцы (май и октябрь), что говорит в пользу его тесной связи с сезонной холодовой акклимацией и подтверждается рядом фактов. Например, содержание нмДГ в почках акклиматизированной к холоду березы плосколистной уменьшалось при искусственном раззакалива-

нии (Пономарев и др., 2012); накопление нмДГ хвои сосны Мг 16 кД тесно коррелировало с приобретением морозоустойчивости (Chang et al., 2016). Для генов нмДГ ели сизой *Picea glauca* (Moench) Voss показано, что их экспрессия возрастала в ответ на дефицит влаги (Sena et al., 2018). Таким образом, можно предположить, что необходимость в появлении нмДГ в хвое в период сезонной акклимации к холоду может быть обусловлена зимним обезвоживанием клеток и это общая особенность хвойных.

ДГ ели с мол. массами 53, 35 и 33 кД ранее обнаружены в работе T. D. Kjellsen et al. (2013). Эти ДГ появлялись и накапливались в хвое в наиболее холодные месяцы года. ДГ с похожими мол. массами 55, 38 и 34 кД обнаружены нами в хвое ели в мае и октябре. Можно предположить, что эти ДГ наряду с нмДГ 14 кД могут обеспечивать холодоустойчивость хвои ели в зимний период.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При характеристике содержания ДГ хвои сосны и ели в период вегетации с помощью одномерного электрофореза удалось обнаружить как общие черты (сезонная динамика изменения содержания, наличие мажорных, минорных и конститутивных ДГ), так и различия в разнообразии и количественном соотношении ДГ. Различия в разнообразии ДГ оказались невелики, однако ДГ одинаковой массы накапливались у двух видов в разном количестве. Полученные на примере хвои результаты говорят в пользу того, что приспособленность сосны обыкновенной и ели сибирской к различным условиям среды может быть сопряжена не столько с количеством и разнообразием ДГ, сколько с различиями в накоплении определенных белков. Обнаруженные различия в составе конститутивных ДГ сосны и ели указывают на возможную связь этих белков с приспособлением к засушливым (для сосны) или влажным, но холодным (для ели) условиям обитания и требуют дальнейших исследований. Согласно нашим сведениям, впервые в сравнительном опыте показано, что сосна обыкновенная и ель сибирская качественно различаются по накоплению ДГ хвои в вегетационном периоде.

Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП «Биоаналитика» СИФИБР СО РАН, Иркутск.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ
(REFERENCES)

- Барт А. А., Брекен Н. С., Каменщикова В. И. Климат Иркутска / Под ред. Ц. А. Швер, Н. П. Форманчук. Л.: Гидрометеиздат, 1981. 246 с. [Bart A. A., Breken N. S., Kamenshchikova V. I. Klimat Irkutsk (Climate of Irkutsk) / Ed. Ts. A. Shver, N. P. Formanchuk. Leningrad: Gidrometeoizdat, 1981. 246 p. (in Russian)].
- Боровский Г. Б., Иванова М. В., Кондакова М. А., Коротаева Н. Е., Суворова Г. Г., Уколова И. В., Федяева А. В. Методические рекомендации в использовании антител против дегидринов в агробиотехнологиях // ИВУЗ. Прикл. хим. и биотехнол. 2019. Т. 9. № 2 (29). С. 277–287 [Borovskiy G. B., Ivanova M. V., Kondakova M. A., Korotaeva N. E., Suvorova G. G., Ukolova I. V., Fedyayeva A. V. Metodicheskie rekomendatsii v ispol'zovanii antitel protiv degidrinov v agrobiotekhnologiyakh (Guidelines for using antibodies against dehydrins in agrobiotechnology) // IVUZ. Prikl. khim. i biotekhnol. (Proc. Higher Educat. Inst. Appl. Chem. Biotechnol.). 2019. V. 9. N. 2 (29). P. 277–287 (in Russian with English abstract)].
- Загирова С. В. Структура ассимиляционного аппарата и CO₂-газообмен у хвойных. Екатеринбург: УрО РАН, 1999. 108 с. [Zagirova S. V. Struktura assimilyatsionnogo apparata i SO₂-gazoobmen u khvoynykh (The structure of the assimilation apparatus and SO₂-gas exchange in conifers). Yekaterinburg: Ural Br., Rus. Acad. Sci.), 1999. 108 p. (in Russian)].
- Иванова М. В., Суворова Г. Г. Структура и функция фотосинтетического аппарата хвойных в условиях юга Восточной Сибири. Иркутск: Ин-т геогр. СО РАН, 2014. 102 с. [Ivanova M. V., Suvorova G. G. Struktura i funktsiya fotosinteticheskogo apparata khvoynykh v usloviyakh yuga Vostochnoy Sibiri (The structure and function of the photosynthetic apparatus of conifers in the conditions of the south of Eastern Siberia). Irkutsk: Inst. Geogr. Rus. Acad. Sci. Sib. Br., 2014. 102 p. (in Russian)].
- Кайбияйнен Л. К. Эколого-физиологические исследования сосны и сосновых древостоев // Тр. Карел. науч. центра РАН. 2003. Вып. 5. С. 65–73 [Kaiyyaynen L. K. Ekologo-fiziologicheskie issledovaniya sosny i sosnovykh drevostoev (Ecophysiological studies of pine and pine stands) // Tr. Karel. nauch. tsentra RAN (Proc. Karel. Sci. Center Rus. Acad. Sci.). 2003. Iss. 5. P. 65–73 (in Russian with English abstract)].
- Петров К. А., Софронова В. Е., Бубякина В. В., Перк А. А., Татарнинова Т. Д., Пономарев А. Г., Чепалов В. А., Охлопкова Ж. М., Васильева И. В., Максимов Т. Х. Древесные растения Якутии и низкотемпературный стресс // Физиол. раст. 2011. Т. 58. № 6. С. 866–874 [Petrov K. A., Sofronova V. E., Bubyakina V. V., Perk A. A., Tatarinova T. D., Ponomarev A. G., Chepalov V. A., Okhlopkova Zh. M., Vasilyeva I. V., Maksimov T. Kh. Drevesnye rasteniya Yakutii i nizkotemperaturny stress (Woody plants of Yakutia and low-temperature stress) // Fiziol. rast. (Plant Physiol.). 2011. V. 58. N. 6. P. 866–874 (in Russian with English abstract)].
- Пономарев А. Г., Татарнинова Т. Д., Перк А. А., Васильева И. В., Бубякина В. В. Сезонная динамика суммарных белков и дегидринов в почках березы плосколистной, растущей в криолитозоне // Изв. Самар. науч. центра РАН. 2012. Т. 14. № 1. С. 2005–2007 [Ponomarev A. G., Tatarinova T. D., Perk A. A., Vasilyeva I. V., Bubyakina V. V. Sezonnaya dinamika summarnykh belkov i degidrinov v pochkakh berezy ploskolistnoy, rastushchey v kriolitozone (Seasonal dynamics of integral proteins and dehydrins in *Betula pendula* var. *platyphylla* buds growing in cryolitozone) // Izv. Samar. nauch. tsentra RAN (Bull. Samara Sci. Center Rus. Acad. Sci.). 2012. V. 14. N. 1. P. 2005–2007 (in Russian with English abstract)].
- Пономарев А. Г., Татарнинова Т. Д., Перк А. А., Васильева И. В., Бубякина В. В. Особенности белков, ассоциированных с формированием морозоустойчивости у двух популяций *Betula platyphylla* Якутии // Совр. пробл. науки и образования. 2013. № 1. С. 341–350 [Ponomarev A. G., Tatarinova T. D., Perk A. A., Vasilyeva I. V., Bubyakina V. V. Osobennosti belkov, assotsiirovannykh s formirovaniem morozoustoychivosti u dvukh populyatsiy *Betula platyphylla* Yakutii (Characteristics of proteins associated with frost hardiness development in two populations of *Betula platyphylla* of Yakutia) // Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya (Contemp. Probl. Sci. Educat.). 2013. N. 1. P. 341–350 (in Russian with English abstract)].
- Пономарев А. Г., Татарнинова 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. Degidrinny, assotsiirovannyye s formirovaniem morozoustoychivosti berezy ploskolistnoy (Dehydrins associated with the development of frost resistance of the Asian white birch) // Fiziol. rast. (Plant Physiol.). 2014. V. 61. N. 1. P. 114–120 (in Russian with English abstract)].
- Суворова Г. Г. Фотосинтез хвойных деревьев в условиях Сибири. Новосибирск: Акад. изд-во «Гео», 2009. 192 с. [Suvorova G. G. Fotosintez khvoynykh derev'ev v usloviyakh Sibiri (Photosynthesis of coniferous trees in the conditions of Siberia). Novosibirsk: Geo Acad. Publ., 2009. 192 p. (in Russian)].
- Татарнинова Т. Д., Перк А. А., Бубякина В. В., Пономарев А. Г., Ветчинникова Л. В., Васильева И. В. Дегидрины в почках *Betula pendula* Roth.: особенности сезонной динамики // Изв. Самар. науч. центра РАН. 2013. Т. 15. № 3 (2). С. 799–801 [Tatarinova T. D., Perk A. A., Bubyakina V. V., Ponomarev A. G., Vetchinnikova L. V., Vasilyeva I. V. Degidrinny v pochkakh *Betula pendula* Roth.: osobennosti sezonnoy dinamiki (Dehydrins of *Betula pendula* Roth. buds: characteristics of a seasonal dynamics) // Izv. Samar. nauch. tsentra RAN (Bull. Samara Sci. Center Rus. Acad. Sci.). 2013. V. 15. N. 3 (2). P. 799–801 (in Russian with English abstract)].
- Щербатюк А. С. Многоканальные установки с CO₂-газоанализаторами для лабораторных и полевых исследований // Инфракрасные газоанализаторы в изучении газообмена растений: сб. науч. ст. М.: Наука, 1990. С. 38–54 [Shcherbatyuk A. S. Mnogokanal'nye ustanovki s CO₂-gazoanalizatorami dlya laboratornykh i polevykh issledovaniy (Multichannel installations with CO₂ gas analyzers for laboratory and field studies) // Infkrasnye gazoanalizatory v izuchenii gazoobmena rasteny: sb. C. 38–54].

- nauch. st. (Infrared gas analyzers in the study of plant gas exchange: coll. sci. articles). Moscow: Nauka, 1990. P. 38–54 (in Russian)].
- Щербатюк А. С., Русакова Л. В., Суворова Г. Г., Янькова Л. С. Углекислотный газообмен хвойных Предбайкалья. Новосибирск: Наука. Сиб. отд-ние, 1991. 132 с. [Shcherbatyuk A. S., Rusakova L. V., Suvorova G. G., Yan'kova L. S. Uglekislotny gazoobmen khvoynykh Predbaykalya (Carbon dioxide gas exchange in conifers in Cisbaikalia). Novosibirsk: Nauka. Sib. Br., 1991. 132 p. (in Russian)].
- Artlip T. S., Callahan A. M., Bassett C. L., Wisniewski M. E. Seasonal expression of a dehydrin gene in sibling deciduous and evergreen genotypes of peach (*Prunus persica* [L.] Batsch) // *Plant Mol. Biol.* 1997. V. 33. Iss. 1. P. 61–70.
- Baldi P., Pedron L., Hietala A. M., La Porta N. Cold tolerance in cypress (*Cupressus sempervirens* L.): a physiological and molecular study // *Tree Genet. Genom.* 2011. V. 7. P. 79–90.
- Bassett C. L., Wisniewski M. E., Artlip T. S., Norelli J. L., Renaut J., Farrell R. E. Global analysis of genes regulated by low temperature and photoperiod in peach bark // *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 2006. V. 131. N. 13. P. 551–563.
- Chang C. Y., Fréchet 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 (2). P. 802–818.
- Cuevas-Velazquez C. L., Rendón-Luna D. F., Covarrubias A. A. Dissecting the cryoprotection mechanisms for dehydrins // *Front. Plant Sci.* 2014. V. 5. P. 1–6.
- Hara M., Shinoda Y., Kubo M., Kashima D., Takahashi I., Kato T., Horiike T., Kuboi T. Biochemical characterization of the *Arabidopsis* KS-type dehydrin protein, whose gene expression is constitutively abundant rather than stress dependent // *Acta Physiol. Plant.* 2011. V. 33. P. 2103–2116.
- Hussain S., Liu G., Liu D., Ahmed M., Hussain N., Teng Y. Study on the expression of dehydrin genes and activities of antioxidative enzymes in floral buds of two sand pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai) cultivars requiring different chilling hours for bud break // *Turk. J. Agr. For.* 2015. V. 39. P. 930–939.
- 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., Romanenko A., Suvorova G., Ivanova M. V., Lomovatskaya L., Borovskii G., Voinikov V. Seasonal changes in the content of dehydrins in mesophyll cells of common pine needles // *Photosynth. Res.* 2015. V. 124 (2). P. 159–169.
- Korotaeva N., Ivanova M. V., Suvorova G. G., Borovskii G. B. The impact of the environmental factors on the photosynthetic activity of common pine (*Pinus sylvestris*) in spring and in autumn in the region of Eastern Siberia // *J. For. Res.* 2017. V. 29 (6). P. 1465–1473.
- Nystedt B., Street N. R., Wetterbom A., Zuccolo A., Lin Y.-C., Scofield D. G., Vezzi F., Delhomme N., Giacomello S., Alexeenko A., Vicedomini R., Sahlin K., Sherwood E., Elfstrand M., Gramzow L., Holmberg K., Hällman J., Keech O., Klasson L., Koriabine M., Kucukoglu M., Käller M., Luthman J., Lysholm F., Niitylä T., Olson A., Rilakovic N., Ritland C., Rosselló J. A., Sena J., Svensson T., Talavera-López C., Theißen G., Tuominen H., Vanneste K., Wu Z.-Q., Zhang B., Zerbe P., Arvestad L., Bhalerao R., Bohlmann J., Bousquet J., Gil R. G., Hvidsten T. R., de Jong P., MacKay J., Morgante M., Ritland K., Sundberg B., Thompson S. L., de Peer Y. V., Andersson B., Nilsson O., Ingvarsson P. K., Lundberg J., Jansson S. The Norway spruce genome sequence and conifer genome evolution // *Nature.* 2013. V. 497(7451). P. 579–584.
- Ouyang L., Leus L., De Keyser E., Van Labeke M.-C. Seasonal changes in cold hardiness and carbohydrate metabolism in four garden rose cultivars // *J. Plant Physiol.* 2019. V. 232. P. 188–199.
- Perdigueró P., Barbero M. C., Cervera M. T., Soto A., Collada C. Novel conserved segments are associated with differential expression patterns for Pinaceae dehydrins // *Planta.* 2012. V. 236 (6). P. 1863–1874.
- Petrov K. A., Sofronova V. E., Bubyakina V. V., Perk A. A., Tatarinova T. D., Ponomarev A. G., Chepalov V. A., Okhlopko Zh. M., Vasilyeva I. V., Maksimov T. Kh. Woody plants of Yakutia and low-temperature stress // *Rus. J. Plant Physiol.* 2011. V. 58. N. 6. P. 1011–1019 (Original Rus. text © K. A. Petrov, V. E. Sofronova, V. V. Bubyakina, A. A. Perk, T. D. Tatarinova, A. G. Ponomarev, V. A. Chepalov, Zh. M. Okhlopko, I. V. Vasilyeva, T. Kh. Maksimov, 2011, publ. in *Fiziologiya rasteniy.* 2011. V. 58. N. 6. P. 866–874).
- 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. N. 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 rasteniy.* 2014. V. 61. N. 1. P. 114–120).
- Rabilloud T., Chevallet M. Solubilization of proteins in two-dimensional electrophoresis // *Proteome research: two-dimensional gel electrophoresis and identification methods.* Berlin; Heidelberg: Springer, 2000. P. 9–31.
- Rodriguez E. M., Svensson J. T., Malatrasi M., Choi D.-W., Close T. J. Barley Dhn13 encodes a KS-type dehydrin with constitutive and stress responsive expression // *Theor. Appl. Genet.* 2005. V. 110. Iss. 5. P. 852–858.
- Sena J. S., Giguère I., Rigault P., Bousquet J., Mackay 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.
- Tatarinova T. D., Perk A. A., Bubyakina V. V., Vasilyeva I. V., Ponomarev A. G., Maximov T. C. Dehydrin stress proteins in *Pinus sylvestris* L. needles under conditions of extreme climate of Yakutia // *Dokl. Biochem. Biophys.* 2017. V. 473. P. 98–101.
- Timmons T. M., Dunbar B. S. Protein blotting and immunodetection // *Meth. Enzymol.* 1990. V. 182. P. 679–688.
- Velasco-Conde T., Yakovlev I., Majada J. P., Aranda I., Johnsen O. Dehydrins in maritime pine (*Pinus pinaster*) and their expression related to drought stress response // *Tree Genet. Genom.* 2012. V. 8. P. 957–973.
- Welling A., Palva E. T. Molecular control of cold acclimation in trees // *Physiol. Plant.* 2006. V. 127 (2). P. 167–181.

Yamane H., Kashiwa Y., Kakehi E., Yonemori K., Mori H., Hayashi K., Iwamoto K., Tao R., Kataoka I. Differential expression of dehydrin in flower buds of two Japanese

apricot cultivars requiring different chilling requirements for bud break // *Tree Physiol.* 2006. V. 26. Iss. 12. P. 1559–1563.

DEHYDRINS IN THE ADAPTATION OF COMMON PINE AND SIBERIAN SPRUCE TO GROWING CONDITIONS DURING VEGETATION PERIOD

N. E. Korotaeva, M. V. Ivanova, G. G. Suvorova, G. B. Borovskii

Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry Russian Academy of Sciences, Siberian Branch Lermontov str., 132, Irkutsk, 664033 Russian Federation

E-mail: knev73@yandex.ru, omaria-84@yandex.ru, galina.g.suvor@gmail.com, borovskii@sifibr.irk.ru

The role of stress proteins in the formation of plant adaptability to environmental conditions has not yet been fully revealed. To identify the role of dehydrins (DH) in the strategy of biochemical adaptation in species occupying different ecological niches, we compared the amount and seasonal dynamics of DH in coniferous Scots pine *Pinus sylvestris* L. and the Siberian spruce *Picea obovata* Ledeb. during the growing season. Weather conditions during the study period were favorable for photosynthetic activity of conifers. Based on the total monthly intensity of CO₂ uptake, the physiological activity of both species did not differ from the average values of this indicator for these species. The quantitative ratio of the constitutive DH content of 72 and 55 kD, which varies depending on the season, as well as the accumulation of «unique» DH for each species, which were located in the high- and low-molecular area of pine and in the medium-molecular area of spruce, turned out to be different in pine and spruce conifers. The obtained results suggest that the occurrence of Scots pine in more arid vegetation conditions, and Siberian spruce in wetter but colder conditions may be associated with the accumulation of certain DH. The ability of Scots pine and Siberian spruce to occupy different habitats may be related to the increased accumulation of constitutive proteins DG 72 and 70 (in pine) and 55 kD (in spruce), but not differences in the composition of DH.

Keywords: *Pinus sylvestris* L., *Picea obovata* Ledeb., needles, proteins, seasonal adaptation.

How to cite: Korotaeva N. E., Ivanova M. V., Suvorova G. G., Borovskii G. B. Dehydrins in the adaptation of common pine and Siberian spruce to growing conditions during vegetation period // *Sibirskij Lesnoj Zhurnal* (Sib. J. For. Sci.). 2020. N. 6. P. 54–63 (in Russian with English abstract and references).