

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ
СТАТЬИ

УДК 581.1

СВЯЗЬ ДЕГИДРИНОВ С АДАПТАЦИЕЙ ЛИСТВЕННИЦЫ КАЯНДЕРА
К УСЛОВИЯМ КРИОЛИТОЗОНЫ ЯКУТИИ

© 2023 г. Т. Д. Татарина^а*, А. А. Перк^а, А. Г. Пономарев^а, И. В. Васильева^а

^а Институт биологических проблем криолитозоны Сибирского отделения Российской академии наук, Якутск, Россия

*e-mail: t.tatarinova@gmail.com

Поступила в редакцию 22.02.2023 г.

После доработки 13.03.2023 г.

Принята к публикации 17.03.2023 г.

Исследованы особенности состава и сезонных изменений стрессовых белков-дегидринов лиственницы Каяндера (*Larix cajanderi* Mayr), произрастающей в условиях экстремально холодного климата криолитозоны Центральной Якутии и отличающейся необычайно высокой морозостойкостью. С использованием технологии иммуноблоттинга впервые в побегах *L. cajanderi* выявлены мажорные дегидрины в интервале мол. м. 17–20, 37–42 и 73 кД. Установлен высокий уровень полиморфизма дегидринов внутри популяции *L. cajanderi*, различия между изученными экземплярами деревьев обнаружены, в основном, в области мол. м. 20–37 кД. В годичном цикле лиственницы наибольшим сезонным изменениям подвержены низкомолекулярные дегидрины, их содержание возрастало в конце фенологической осени и достигало постоянного уровня в период максимально низких зимних температур. Особенности сезонных изменений и значительное разнообразие состава дегидринов в побегах лиственницы могут указывать на их вероятное участие в формировании уникальной морозостойкости *L. cajanderi* при адаптации данного вида хвойных растений к условиям криолитозоны.

Ключевые слова: *Larix cajanderi*, адаптация, дегидрины, криолитозона, низкие температуры, стрессовые белки

DOI: 10.31857/S001533032360016X, **EDN:** WWJMZE

ВВЕДЕНИЕ

Древесные растения, произрастающие в условиях экстремально холодного климата и многолетней мерзлоты Центральной Якутии, отличаются необычайно высокой морозостойкостью благодаря их способности адаптироваться к холодному фактору. Сверхнизкие зимние температуры воздуха (до –60°C и ниже) без возвратных потеплений, а также их резкие суточные перепады в межсезонье определяют жизнеспособность и видовой состав дендрофлоры в криолитозоне. В этой связи, в бореальных лесах Северо-Востока Сибири главную роль играют хвойные деревья сем. Сосновые (*Pinaceae* Lindl.) – лиственница Каяндера (*Larix cajanderi* Mayr) и лиственница даурская или Гмелина (*L. dahurica* Turcz. et Trautv. = syn. *L. gmelinii* (Rupr.) Rupr), далеко превосходящие по ареалу и количеству растений другие виды [1, 2].

Стрессовые факторы различной природы (низкие температуры, засуха, засоление и др.) могут индуцировать в растениях экспрессию генов специфических белков, в т.ч. с криопротекторными свойствами. В формировании устойчивости древесных растений к экстремальным климатическим условиям криолитозоны Якутии, вероятно, принимают

участие и стрессовые белки-дегидрины, физиологическую роль которых связывают с защитой биополимеров и мембран клеток растений от повреждений, вызванных низкими температурами и дегидратацией [3–7].

Дегидрины представляют собой высокогидрофильные белки семейства LEA (Late Embryogenesis Abundant) или белки позднего эмбриогенеза и обнаружены у большинства таксономических групп растений [3, 5, 8, 9]. Для дегидринов характерны термостабильность, высокая степень конформационной лабильности и наличие в них специфических последовательностей, обогащенных полярными аминокислотами, особенно лизином и пролином. Наиболее распространенный пептидный мотив из 15 аминокислот (EKKGIMDKI-KEKLPG) или консервативный K-сегмент, является общим для всех изученных дегидринов [3, 8, 10]. Различные сочетания консервативного K-сегмента и переменных (Y-, S-) сегментов определяют их функциональные свойства, связанные с криопротекторной, антифризной, антиоксидантной и металлсвязывающей функциями [4–6, 11, 12].

Стрессовые белки-дегидрины голосеменных растений изучены в гораздо меньшей степени,

чем у покрытосеменных. При этом выявлены некоторые особенности в организации генома хвойных видов [13, 14]. Так, им свойственны значительно более крупные семейства генов дегидринов [15, 16]. Например, в базе данных транскриптома *Picea glauca* идентифицировано 53 разных генов дегидринов [17]. Кроме того, в составе дегидринов *Pinaceae* вместо Y-сегментов обнаружены A- и E-сегменты и специфичные N-концевые области [13, 14]. Разнообразие множества дегидринов с разным составом последовательностей A-, E-, S-, N- и K-сегментов предполагает не только сложность экспрессии их генов, но и возможность участия данных белков в развитии устойчивости хвойных древесных к различным стрессовым воздействиям, включая и низкие отрицательные температуры.

Резкое усиление экспрессии генов дегидринов и накопление их белковых продуктов отмечали при обезвоживании в тканях вегетирующих растений. Например, экспрессия семейства генов дегидринов выявлена у двух видов сосны – приморской (*Pinus pinaster*) и кедровой (*P. pinea*), подвергнутых водному стрессу [13, 18]. Наряду с этим, сообщалось, что дегидрины могут предотвращать коагуляцию макромолекул при различных температурах и низких осмотических условиях [8]. Короткий фотопериод и низкие закалывающие температуры, приводящие к дегидратации клеток, вызывали в разных органах и тканях растений умеренной зоны накопление дегидринов [4, 5, 9, 19], в том числе у хвойных деревьев [20–22]. К настоящему времени дегидрины обнаружены в хвое сосны обыкновенной *Pinus sylvestris*, произрастающей в разных природно-климатических условиях: в криолитозоне Центральной Якутии [23, 24] и в регионе Предбайкалья [21, 22], а также в хвое ели сибирской *Picea obovata* на северо-востоке Фенноскандии [16] и на юге Сибири [22]. Связь между сезонным накоплением некоторых дегидринов и развитием морозоустойчивости хвойных деревьев выявлена, например, у ели сибирской *Picea obovata* [16] и сосны веймутовой *Pinus strobus* [25].

Устойчивость к холоду у древесных растений изначально развивается в ответ на сокращение фотопериода и снижение температуры окружающей среды, индуцирующими экспрессию специфических генов, чувствительных к низким температурам, и синтез стрессовых белков. Вероятно, стрессовые белки-дегидрины, накапливающиеся в период осеннего перехода к зимнему покою, принимают участие в осмо- и криозащитных механизмах при низкотемпературной адаптации древесных растений к условиям холодного климата [5, 7, 11].

Огромные территории лиственничных лесов, охватывающие различные географические и климатические условия, свидетельствуют об боль-

шой экологической пластичности лиственницы как вида. Среди древесных пород мира якутская популяция лиственницы не имеет конкурентов по своей морозоустойчивости, выдерживая в зимнее время температуру ниже -60°C [26, 27]. Более того, меристематические ткани почек лиственницы могут сохранять жизнеспособность при замораживании до критически низкой температуры -196°C [28]. Обладая специфическими особенностями в транспирации, лиственницы также легко переносят летнее обезвоживание при высокой температуре воздуха [29]. Такие свойства указывают на существование у данного вида сформированного и наследственно закрепленного механизма, позволяющего сохранить жизнеспособность клеток в условиях холодных регионов в самых северных в мире ареалах произрастания древесных растений. Вследствие этого, доминирующими из хвойных деревьев на территории Республики Саха (Якутия) являются лиственницы даурская (Гмелина) и Каяндера, занимающие более 79% лесопокрытой площади региона [26, 27].

Исследования роли стрессовых белков, включая дегидрины, в формировании криоустойчивости лесобразующих древесных растений на Северо-Востоке Евразии немногочисленны. Ранее нами впервые были идентифицированы дегидрины в тканях березы повислой и сосны обыкновенной, произрастающих в условиях Центральной Якутии [30–32]. Дегидрины хвойных деревьев, в основном, изучены у некоторых вечнозеленых видов, тогда как дегидрины летнезеленой лиственницы почти не исследованы. Вместе с тем, надземные органы древесных растений в условиях криолитозоны наиболее подвержены длительному воздействию низких температур, приводящих к осмотическому стрессу. В этой связи, изучение механизмов, ответственных за формирование уникальной способности лиственницы переносить экстремально низкие зимние температуры, характерные для криолитозоны, представляется весьма актуальным. Выяснение роли стрессовых белков-дегидринов в развитии необычайно высокой морозоустойчивости хвойных пород на примере *L. cajanderi* позволит выявить особенности их адаптации к специфическим условиям произрастания, а также обнаружить общие закономерности формирования низкотемпературной устойчивости древесных растений криолитозоны.

Целью настоящей работы явилось изучение особенностей состава стрессовых белков-дегидринов и их изменений в сезонном цикле хвойных растений на примере лиственницы Каяндера (*L. cajanderi* Mayr) в условиях холодного климата и многолетней мерзлоты Центральной Якутии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования в работе явилась лиственница Каяндера (*Larix cajanderi* Mayr) — бореальный восточноазиатский вид, главная лесобразующая порода Якутии и Северо-Востока Сибири. Произрастает в чрезвычайно суровых климатических условиях как на равнине, так и в горах. Следует отметить, что некоторые авторы рассматривают лиственницу Каяндера как восточную расу или подвид лиственницы даурской (Гмелина) [1, 2]. Эти же виды являются и самыми долгоживущими деревьями, отдельные экземпляры которых достигают возраста 900 лет.

Климат Центральной Якутии характеризуется экстремальными условиями: среднемесячная температура воздуха в январе составляет -38.6°C , годовое количество осадков — 237 мм. Температурные значения в регионе отслеживали по сайту URL <http://meteo.ru/data>. Климатические показатели в период сбора образцов в целом не отличались от среднесезонных. Материалом исследования служили однолетние побеги лиственницы Каяндера без хвои, произрастающей в природных условиях (лесопарковая зона Ботанического сада ИБПК СО РАН, окрестности г. Якутска, 62° с.ш., 129° в.д.). Сбор и исследование биологического материала проводили в течение 2011–2016 гг. Методика сбора образцов и их обработка, в зависимости от условий эксперимента, варьировала. При отборе проб на биохимический анализ, материал сразу после получения фиксировали и хранили в жидком азоте до процедуры выделения белков. Для выявления полиморфизма дегидринов в период зимнего покоя (10.02.2011 г., минимальная температура воздуха -43.8°C , средняя -37.3°C) пробы отбирали индивидуально для каждого растения. Экземпляры деревьев ($n = 13$) обозначены региональным индексом и номером — YaL1–YaL13. При изучении сезонной динамики состава дегидринов сбор материала по отдельным растениям (YaL1, YaL6, YaL10, YaL11) осуществляли круглогодично (2011–2012 гг.) не реже одного раза в месяц.

Выделение суммарных белков из однолетних побегов лиственницы проводили согласно [21]. Навеску ткани (1.5–2.0 г) измельчали в ступке в жидком азоте в присутствии нерастворимого поливинилпирролидона (“Serva”, Германия, 2.5% по отношению к объему буфера). Все процедуры проводили при температуре $+4^{\circ}\text{C}$. Белки экстрагировали буфером, содержащим 0.1 М Трис-НСl, pH 7.5, 12 мМ β -меркаптоэтанол, 1% ДДС-Na, 10 мМ ЭДТА, 3 мМ ФМСФ (фенилметилсульфанилфторид). Гомогенат центрифугировали при 50000 g в течение 40 мин. К супернатанту, профильтрованному через капроновую ткань, добавляли поливинилпирролидон (2.5%) и центрифугировали при 50000 g в течение 35 мин. Суммарные белки осаждали пятью объемами ацетона при

температуре -20°C 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 17000 g (20 мин, $+4^{\circ}\text{C}$) и использовали для проведения электрофореза. Содержание белка определяли по методу Bradford [34]. Электрофоретическое разделение белков проводили в 13.5% ПААГ в присутствии ДДС-Na [35] с использованием маркеров молекулярной массы (“ThermoScientific”, США) и последующим окрашиванием Кумасси G-250 (“Serva”, Германия). На треки наносили равное количество белка (10–15 мкг). Выравнивание белков в треках ПААГ проводили опытным путем по интенсивности окраски белковых полос в сравнении с известным количеством контрольного образца (10–15 мкг). Перенос белков из ПААГ на ПВДФ (поливинилидендифторид) мембрану (“Bio-Rad”, США) проводили по методу Timmons и Dunbar [36]. Идентификацию дегидринов выполняли с помощью поликлональных антител против их К-сегмента (EKKGIME/DKIKEKLPG) 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). Данные сканирования гелей и мембран обрабатывали с помощью программы ImageJ 1.41o/Java 1.50_09 (США). Количественные показатели содержания дегидринов оценивали по интенсивности окраски мембраны в относительных единицах денситометрической плотности (отн. ед., D). Значение денситометрической плотности дегидрина с мол. м. 14 кД в июле принято за нулевой уровень. На рисунках представлены типичные мембраны, отражающие стабильно воспроизводимые результаты иммунодетекции дегидринов лиственницы с использованием специфических антител против К-сегмента.

Для интегральной количественной оценки морозостойкости растений использовали показатель проницаемости клеточных мембран, оцениваемый по выходу электролитов (electrolyte leakage method) [33]. Навеску свежесобранных побегов (1 г) сразу после сбора нарезали и инкубировали в 40 мл дистиллированной воды в термостате при постоянной температуре 25°C в течение 24 ч. Затем образцы подвергали кипячению для полного выхода электролитов. Условия опытов были подобраны в ходе предварительных экспериментов с варьированием соотношений массы навески к объему воды и длительности последующей экстракции. Выход электролитов до и после фиксации проб кипячением определяли по электропроводности (G) вытяжек с помощью реохордного моста Р38 на переменном токе часто-

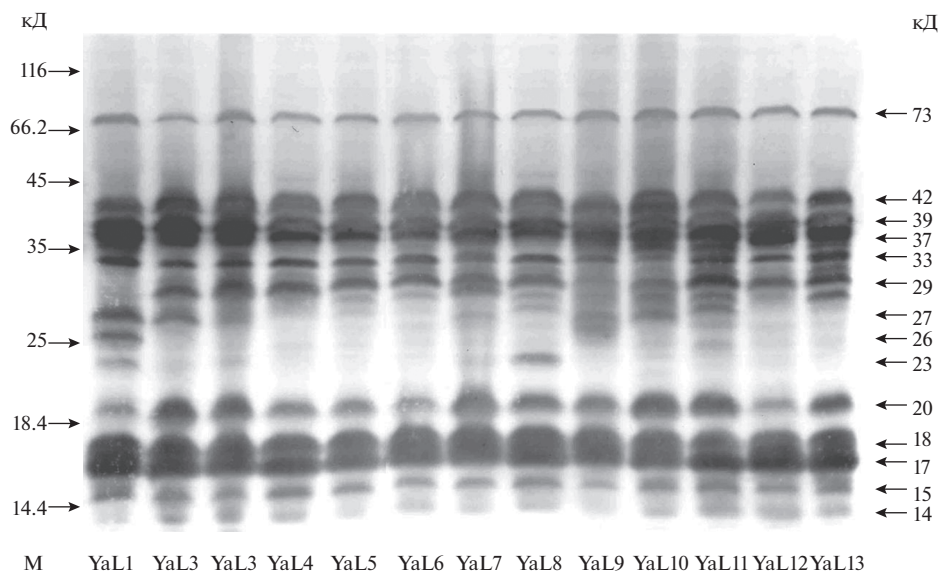


Рис. 1. Результаты иммуноблоттинга дегидринов в побегах отдельных экземпляров (YaL1-YaL13) лиственницы Каяндера (*Larix cajanderi*) в Центральной Якутии в период зимнего покоя. Все образцы ($n = 13$) собраны 10.02.2011 г. (минимальная температура воздуха составила -43.8°C) и фиксированы для хранения в жидком азоте. Представлены типичные мембраны иммунодетекции дегидринов. Указаны молекулярные массы: слева — маркеров (M), справа — дегидринов.

той 50 Гц с использованием кондуктометрического датчика УК-02/1. Величина G водных вытяжек прямо пропорциональна повреждающему клеточные мембраны фактору. Степень морозоустойчивости растений в их годовом цикле оценивали в виде коэффициента морозоустойчивости (K_M), выражаемого отношением G_H нативной вытяжки к G_F фиксированных кипячением образцов.

Измерения выполнены в трехкратной биологической повторности с привлечением статистического пакета Microsoft Office Excel 2010, в результатах приведены средние арифметические величины и их стандартные отклонения, различия значимы при $P < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Произрастающие в суровых природно-климатических условиях Центральной Якутии древесные растения приобрели необычайно высокую морозоустойчивость. В защите клеток растений в ответ на стресс-факторы различной природы, в т.ч. к холодовому, связанному с дегидратацией, основная роль отводится стрессовым белкам-дегидринам. В данной работе впервые с использованием специфических антител в однолетних побегах лиственницы Каяндера обнаружены дегидрины в области мол. м. 14–42 и 73 кД. При сравнении отдельных экземпляров в период зимнего покоя деревьев (февраль) выявлен высокий уровень полиморфизма данных белков в центрально-якутской популяции *L. cajanderi*. Существен-

ным отличием дегидринов в побегах лиственницы явилось их необычайно высокое разнообразие, поскольку большая часть этих белков обнаруживалась в диапазоне мол. м. 14–42 кД (рис. 1).

Во всех изученных образцах лиственницы в низкомолекулярной области в сравнительно большом количестве обнаружены дегидрины с мол. м. 17, 18 и 20 кД, в меньшем — 14 и 15 кД, а также в среднеммолекулярной области представлены мажорные дегидрины с мол. м. 37, 39, 42 кД. Из других дегидринов, белки с мол. м. 29 кД наблюдали в побегах большинства деревьев лиственницы, тогда как белки 23, 26 и 27 кД встречались лишь у отдельных экземпляров. Среди высокомолекулярных полипептидов в зимний период в побегах всех изученных деревьев идентифицировали дегидрин с мол. м. 73 кД. Наличие или отсутствие в спектре белков тех или иных дегидринов, а также их количественное содержание определяли индивидуально различия между отдельными лиственницами. Таким образом, дегидрины в побегах лиственницы в зимний период во время покоя проявляли более высокую вариабельность в среднеммолекулярной области 23–29 кД, чем в низко- и высокомолекулярных областях.

Для выявления вероятной связи дегидринов с формированием морозоустойчивости лиственницы Каяндера в специфических условиях криолитозоны Якутии было предпринято изучение их сезонной динамики. Нами обнаружено, что в течение годичного цикла деревьев большая часть мажорных дегидринов в побегах лиственницы в осенне-зим-

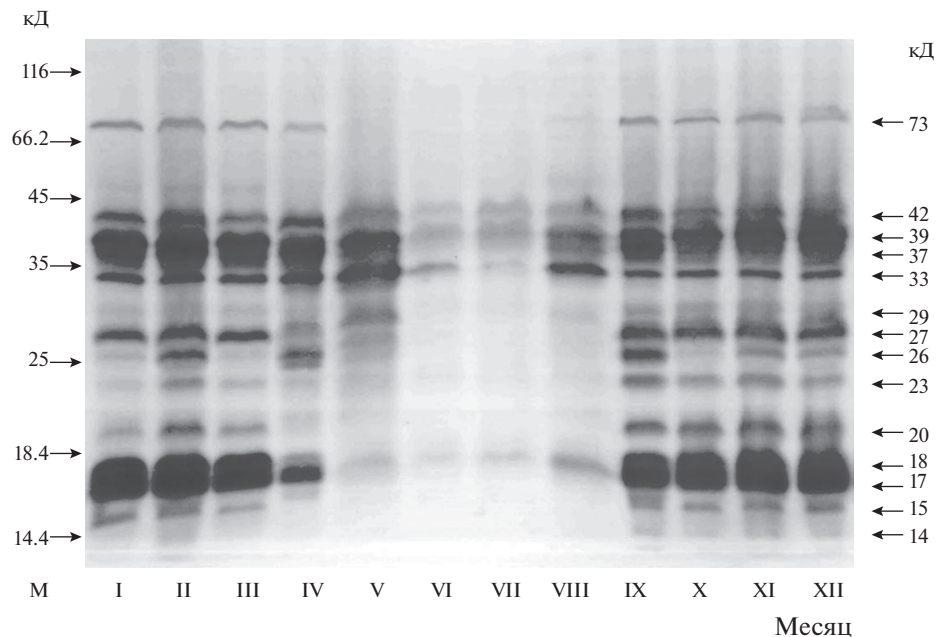


Рис. 2. Сезонные изменения дегидринов в побегах лиственницы Каяндера (*Larix cajanderi*) (YaL1) в Центральной Якутии. Образцы были собраны в течение годового цикла (2011–2012 гг.) и фиксированы для хранения в жидком азоте. Представлены типичные мембраны иммунодетекции дегидринов. Указаны молекулярные массы: слева — маркеры (М), справа — дегидринов.

ний и зимне-весенний периоды представлена равномерно, но подвергается существенным изменениям в летние месяцы (рис. 2).

Дегидрины с мол. м. 33, 37, 39, 42 кД оказались менее подвержены сезонным изменениям — они не исчезали полностью в летние месяцы, хотя их количество уменьшалось. Более сглаженная динамика в годичном цикле лиственницы проявлялась в высокомолекулярной области у дегидрина 73 кД, который почти пропадал в летние месяцы и появлялся вновь в сентябре. Такие особенности этой группы дегидринов могут указывать на их более вероятные конститутивные свойства, связанные с участием в метаболических процессах в клетках хвойных. Наиболее отчетливо ход сезонных изменений дегидринов лиственницы прослеживается в изменениях низкомолекулярных белков, особенно в области мол. м. 14–29 кД, во время вегетации (в июне — июле). Почти все дегидрины появлялись к сентябрю в период осеннего перехода древесных растений к зимнему покою. При этом, уровень дегидринов 17 и 18 кД в побегах лиственницы был значительно выше, чем таковой других низкомолекулярных 14, 15 и 20, 23, 26, 27, 29 кД, содержание которых заметно возрастало осенью с августа до октября (до 22 раз). Затем дегидрины достигали и сохраняли стабильно высокий уровень в самые холодные месяцы зимы (ноябрь — март), когда отмечались наиболее низкие отрицательные температуры. Можно предположить, что в этот низкотемпературный период морозоустой-

чивость древесных растений в условиях криолитозоны достигала максимальных значений.

Весной (апрель — май), на фоне подъема температуры воздуха и начала оттаивания мерзлотных почв в побегах лиственницы в начале вегетации деревьев происходило заметное падение уровня дегидринов. В летние месяцы содержание большинства данных белков значительно снижалось, а некоторые, особенно в низкомолекулярной области с мол. м. 14, 15, 21, 23, 26, 27, 29 кД почти исчезали. Количество низкомолекулярных дегидринов 17, 18 кД, уменьшалось в гораздо большей степени от 460–520 до 40–50 отн. ед., чем среднемолекулярных, например, белков с мол. м. 37 и 39 кД от 370–410 до 130–160 отн. ед., соответственно, но те и другие не исчезали полностью. Обнаруженные изменения в составе индивидуальных дегидринов в годичном цикле центрально-якутской популяции лиственницы четко прослеживаются на гистограммах (рис. 3).

Из приведенных данных следует, что максимальное накопление дегидринов происходило к концу фенологической осени и устойчиво сохранялось в холодный период года. Самый высокий уровень дегидринов в побегах лиственницы наблюдали во время зимнего покоя деревьев в период экстремально низких температур, что указывает на тесную связь данных белков с низкотемпературной адаптацией лиственницы к условиям криолитозоны.

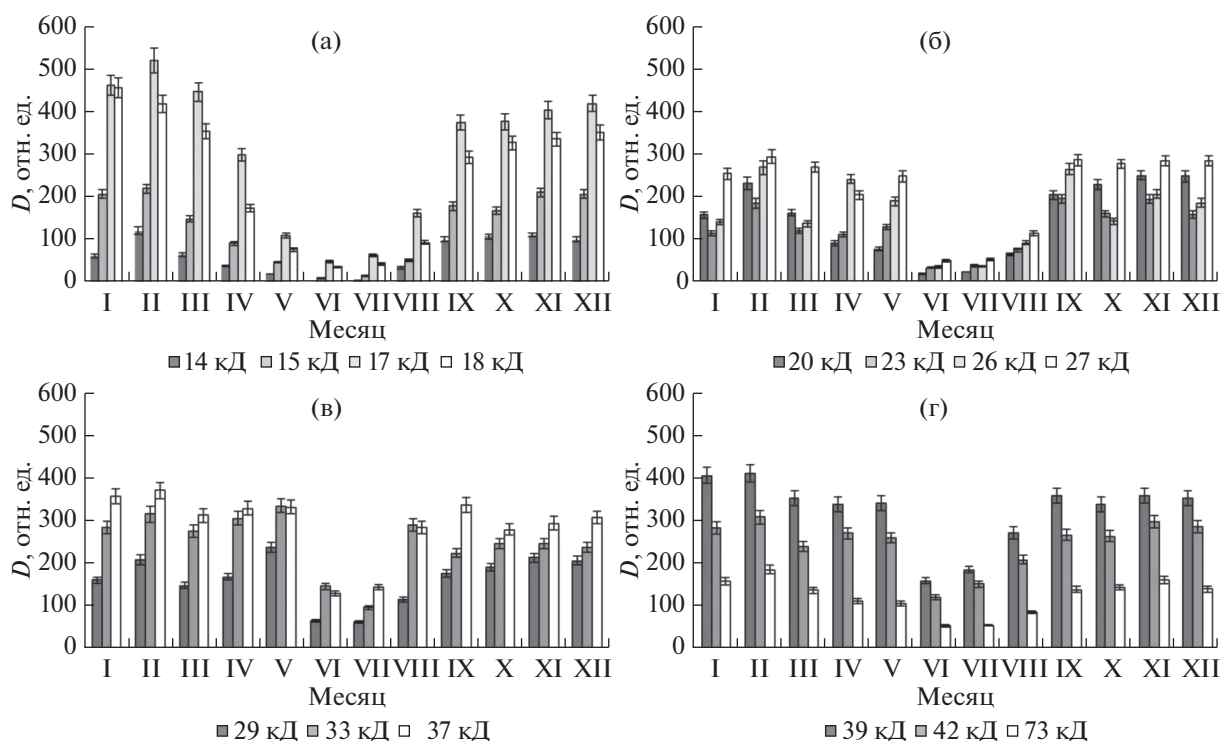


Рис. 3. Динамика сезонных изменений состава отдельных дегидринов (а–г) в побегах лиственницы Каяндера (*Larix cajanderi*) (YaL1) в Центральной Якутии. Образцы были собраны в течение годового цикла (2011–2012 гг.) и фиксированы для хранения в жидком азоте. На гистограммах значение денситометрической плотности (D , отн. ед.) дегидрина 14 кД в июле принято за нулевой уровень. Представлены данные в виде средних арифметических значений и их стандартных отклонений, различия значимы при $P < 0.05$.

С целью оценки степени морозоустойчивости лиственницы Каяндера и выявления ее связи с уровнем дегидринов было предпринято изучение проницаемости клеточных структур побегов с использованием метода электролитов. Ежемесячная динамика изменения суммарных дегидринов Σ_D и относительной морозоустойчивости K_M деревьев на фоне среднемесячных температур воздуха $t^\circ\text{C}$ в Центральной Якутии приведена на рис. 4.

Данный метод ранее хорошо зарекомендовал себя при изучении некоторых видов плодовых культур в условиях Якутии [33]. Как и ожидалось, наибольшие значения коэффициента морозоустойчивости в побегах лиственницы наблюдали в зимние месяцы, когда он достигал показателей 0.53–0.65. Тенденцию спада K_M у деревьев фиксировали в начале весны (апрель), когда он уменьшался до 0.43–0.45 и далее снижался до минимальных значений в летние месяцы – 0.34. Ближе к осенне-зимнему периоду при подготовке растений к покою (август), показатели K_M снова возрастали. При этом, в побегах лиственницы Каяндера наблюдали синхронные однонаправленные изменения коэффициента морозоустойчивости K_M и содержания суммарных дегидринов D (отн. ед.) (рис. 4). Обратная зависимость имеет место для

связи температуры воздуха с K_M и уровнем дегидринов, особенно их низкомолекулярных форм.

ОБСУЖДЕНИЕ

Устойчивость растений к неблагоприятным факторам среды формируется в результате комплекса структурных и физиолого-биохимических изменений клеток и тканей, однако механизмы их низкотемпературной адаптации в природных условиях до сих пор изучены недостаточно.

Особую роль в адаптации растений к абиотическим стрессорам играют защитные белки-дегидрины, препятствующие потере клеткой воды за счет высокой гидрофильности и стабилизирующие клеточные белки. В данном исследовании показано, что в годичных побегах *L. cajanderi* в условиях криолитозоны обнаружены стрессовые белки-дегидрины, преимущественно в области мол. м. 14–42 и 73 кД. Мажорные дегидрины лиственницы представлены белками с мол. м. 17, 18, 20, 37, 39 и 42 кД. Несколько меньше по содержанию составляли 14, 15, 17, 18, 20 кД, а также 73 кД дегидрины. Кроме того, в области мол. м. 20–37 кД отмечали большое разнообразие минорных изоформ дегидринов (от 3 до 5), которые определяли индивидуальные качественные и ко-

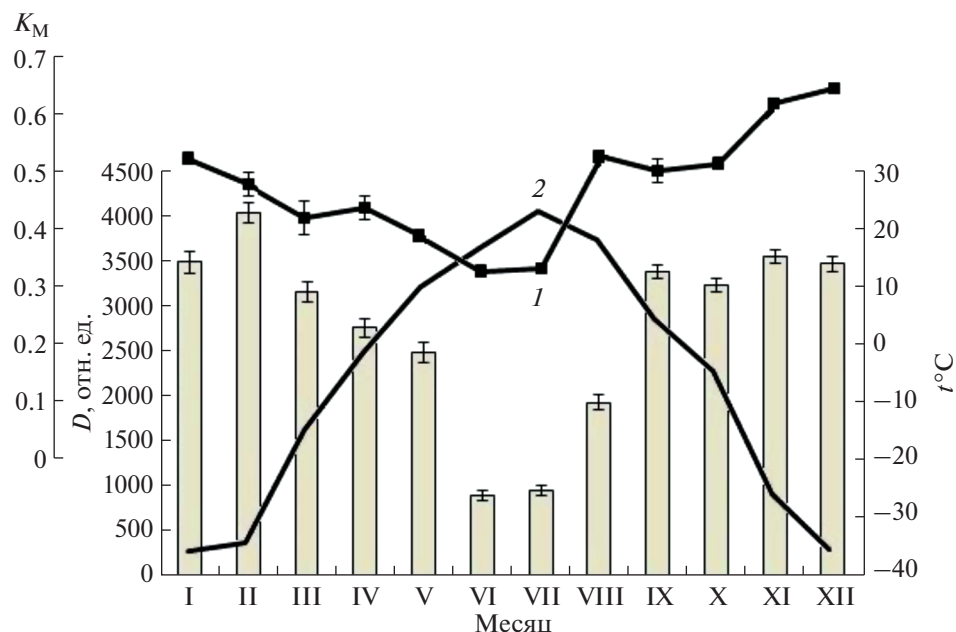


Рис. 4. Динамика изменения суммарных дегидринов ΣD и морозоустойчивости K_M (1) в побегах лиственницы Каяндера (*Larix cajanderi*) (YaL1) на фоне среднемесячных температур воздуха $t^\circ C$ (2) в Центральной Якутии (2011 г.). Степень морозоустойчивости растений в их годовом цикле оценивали в виде коэффициента морозоустойчивости (K_M). Приведены результаты экспериментов трех биологических повторностей с привлечением статистического пакета Microsoft Office Excel 2010. Представлены данные в виде средних арифметических значений и их стандартных отклонений, различия значимы при $P < 0.05$.

личественные различия между отдельными экземплярами лиственницы, особенно в зимний период. Высокий уровень полиморфизма дегидринов в побегах отдельных экземпляров центрально-якутской популяции лиственницы может свидетельствовать о значительном потенциале холодоустойчивости изучаемого вида, направленного для защиты и обеспечения жизнедеятельности растений и, вероятно, обусловлен особенностями низкотемпературной адаптации древесных растений рода *Larix* к условиям климата криолитозоны. Известно, что лиственница имеет наиболее высокий уровень летней транспирации среди хвойных деревьев, превосходя вечнозеленые виды по данному показателю в 2–3 раза [29]. В связи с этим она вынуждена сбрасывать хвою с наступлением морозов, обеспечивая свою криотолерантность, в том числе, за счет снижения потери воды в результате зимней транспирации. Сведения о внутривидовом полиморфизме дегидринов, а также их предполагаемой связи с адаптацией у других видов древесных, в том числе хвойных растений, практически отсутствуют. Так, была выявлена аллельная изменчивость данного типа белков в пяти природных популяциях *Quercus petraea* [37].

Анализ сезонных изменений дегидринов показал, что стрессовым белкам-дегидринам в годичном цикле лиственницы Каяндера свойственны характерные изменения, приводящие к их накоплению в

период осеннего перехода растений к покою, стабильно высокому уровню в зимние месяцы (ноябрь — март) и затем снижению их содержания в весенний период года (апрель — май). По данным литературы, изучение сезонной вариабельности экспрессии генов дегидринов и содержания этих белков у различных видов выявило их высокий уровень зимой и низкий — летом во время их интенсивного роста. Большинство дегидринов древесных растений индуцируется в ответ на низкую температуру, а некоторые из них — на низкую температуру и на короткий день [11]. У древесных растений умеренных зон отмечалось накопление дегидринов при уменьшении содержания воды во время осеннего перехода к зиме, например, в тканях *Picea obovata* [16], *Pinus sylvestris* [20, 21], *Cornus sericea* [38], *Betula pubescens* [39]. Как следует из наших данных, в сезонном цикле *L. cajanderi* для спектра белков характерно высокое разнообразие состава дегидринов, максимальное содержание которых выявлено в период зимнего покоя деревьев (февраль), когда наблюдались сверхнизкие отрицательные температуры. По-видимому, индуцируемые холодовым фактором и накапливающиеся в самые морозные месяцы зимы в побегах лиственницы стрессовые белки-дегидрины, могут быть ассоциированы с формированием низкотемпературной устойчивости этого вида хвойных растений. С наступлением осени заметное сокращение длины дня и снижение температуры

окружающего воздуха вызывают остановку роста и развития растений, тем самым одновременно включая процессы дегидратации, с которыми коррелирует возрастание уже в августе некоторых дегидринов (например, с мол. м. 33, 37 и 39 кД), а затем и четкое появление в сентябре их низкомолекулярных форм (с мол. м. 17, 18, 26 и 27 кД), вероятно, необходимых для компенсации потери воды. Такое же возрастание уровня экспрессии низкомолекулярных дегидринов в условиях дефицита влаги наблюдали в хвое ели сизой *Picea glauca* [14]. Появление дегидринов, особенно низкомолекулярных, в период осенней акклимации растений к холоду указывает на их индуцибельный характер, вызванный процессами сокращения долготы дня и нарастания холодового фактора. Накопление в побегах при осеннем переходе к зимнему покою и поддержание высокого уровня дегидринов указывают на их возможное участие в защите клеток деревьев, что наряду с опадением хвои, предохраняет листовенницы от обезвоживания во время низкотемпературного периода. С установлением постоянного снежного покрова на территории Центральной Якутии (конец октября — начало ноября) содержание всех дегидринов в побегах достигает стабильно высокого уровня и остается таковым в течение всего зимнего периода. Наряду с этим, сезонные изменения состава данной группы белков согласуются с показателями, полученных с помощью кондуктометрического метода по относительному выходу электролитов из побегов. Так, древесные растения в условиях сверхнизких температур характеризуются максимальными значениями морозоустойчивости на основе измерения их клеточной проницаемости побегов листовенницы методом электролитов ($K_M = 0.53–0.65$). Наблюдаемые синхронные односторонние изменения морозоустойчивости, выраженные измеряемым коэффициентом K_M и уровнем накопления дегидринов в побегах, также могут свидетельствовать о связи криотолерантности листовенницы Каяндера с накоплением специфических белков-дегидринов. Весной (апрель — май) по мере прогревания воздуха и начала оттаивания мерзлотных почв в побегах листовенницы происходит резкое снижение содержания, а затем фактическое исчезновение летом низкомолекулярных дегидринов с мол. м. 14, 15 и 23, 26, 27, 29 кД, за которым следовали средномолекулярные дегидрины с мол. м. 33, 39, 42 кД. Подобные циклы сезонных изменений уровня дегидринов, связанные с акклимацией и деакклимацией растений при изменениях светового и температурного факторов, обнаружены у разных древесных и кустарниковых видов. Ранее в почках березы *B. pubescens*, произрастающей в Финляндии, в зимний период отмечались дегидрины с мол. м. 24, 30 и 33 кД [39]. Сходная динамика в накоплении дегидринов, разных по мол. м., обнаружена и у

хвойных древесных растений [16, 21, 40]. Характерные для двух видов ели *Picea glauca* и *P. obovata* дегидрины 32, 34 и 50 кД накапливались в период холодового стресса и исчезали в оптимальных условиях произрастания [40]. Значительное возрастание уровня дегидрина 16 кД в хвое совпадало с приобретением морозоустойчивости сосны веймутовой *Pinus strobus* [25]. В условиях Предбайкалья к специфичным для зимнего покоя сосны обыкновенной *Pinus sylvestris* относят дегидрины с мол. м. 17, 26 и 32 кД [21], в хвое ели сибирской *Picea obovata* в октябре месяце выявлены дегидрины 14.5, 34, 38, 55 кД [22], близкие по значениям мол. м. к таковым в хвое ели *Picea obovata* 33, 35 и 53 кД, ранее описанных в работе [16]. Накопление низкомолекулярных дегидринов у зимующих древесных растений происходило, в основном, только в периоды низких отрицательных температур, что свидетельствует об их отчетливой связи с адаптацией деревьев к холодовому фактору. Белки, сходные с низкомолекулярными дегидринами, ассоциированными с перезимовкой древесных растений, произрастающих в условиях многолетней мерзлоты, обнаружены в хвое сосны *P. sylvestris* (дегидрин с мол. м. 14.5–15 кД) [23, 24], в побегах и почках березы повислой *Betula pendula* (дегидрин с мол. м. 17 кД) [31, 32]. Обнаруженные в побегах листовенницы низкомолекулярные дегидрины с мол. м. 14, 15, 17, 18 кД сходны с таковыми других хвойных, в частности, с дегидринами сосны обыкновенной и ели сибирской. Белок с мол. м. 73 кД, который присутствовал постоянно в побегах листовенницы в осенне-зимний период, по мол. м. также близок к дегидрину 72 кД в хвое сосны из Предбайкалья [22]. Вероятно, близкие по мол. м. стрессовые белки-дегидрины у разных древесных хвойных могут осуществлять сходные функции в их защите от зимнего обезвоживания в низкотемпературный период. Приведенные в работе данные согласуются с физиологической ролью дегидринов, связанной с противостоянием дегидратации, в первую очередь, при низкотемпературном стрессе. Наличие и разнообразие состава дегидринов, обнаруженных у отличающейся высокой морозоустойчивостью листовенницы Каяндера, по-видимому, является необходимым условием достижения оптимального уровня ее низкотемпературной устойчивости для успешной перезимовки в суровых климатических условиях криолитозоны Якутии.

Таким образом, с использованием специфических антител в побегах листовенницы Каяндера (*Larix cajanderi*) в условиях многолетней мерзлоты Центральной Якутии изучены особенности стрессовых белков-дегидринов и их изменения в годовом цикле. Характер сезонных изменений, значительное разнообразие состава и связанный с морозоустойчивостью высокий уровень данных белков в побегах *L. cajanderi* указывают на важ-

ную роль дегидринов в общих механизмах формирования низкотемпературной устойчивости при адаптации древесных растений к экстремально холодному климату криолитозоны.

Работа выполнена в рамках государственного задания Минобрнауки России по проекту “Исследование биогеохимических циклов и адаптивных реакций растений бореальных и арктических экосистем северо-востока России” (код научной темы: FWRS-2021-0024; № гос. регистрации в ЕГИСУ: ААААА-21-121012190034-2).

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Настоящая статья не содержит исследований с участием людей и животных в качестве объектов изучения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абаимов А.П., Коропачинский И.Ю. Лиственницы Гмелина и Каяндера. Новосибирск: Наука, 1984. 121 с.
2. Коропачинский И.Ю., Встовская Т.Н. Древесные растения Азиатской России. Новосибирск: изд-во СО РАН, филиал “Гео”, 2002. 707 с.
3. 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.
4. Hara M. The multifunctionality of dehydrins // Plant Signal. Behav. 2010. V. 5. P. 503. <https://doi.org/10.4161/psb.11085>
5. Hanin M., Brini F., Ebel C., Toda Y., Takeda S., Mahmoudi K. Plant dehydrins and stress tolerance. Versatile proteins for complex mechanisms // Plant Signal. Behav. 2011. V. 6. P. 1503. <https://doi.org/10.4161/psb.6.10.17088>
6. Malik A.A., Veltri M., Boddington K.F., Singh K.K., Graether S.P. Genome analysis of conserved dehydrin motifs in vascular plants // Front. Plant Sci. 2017. V. 8. P. 1. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00709>
7. Chang C.Y., Bräutigam K., Huner N.P., Ensminger I. Champions of winter survival: cold acclimation and molecular regulation of cold hardiness in evergreen conifers // New Phytol. 2021. V. 229. P. 675. <https://doi.org/10.1111/nph>
8. Close T.J. Dehydrins: emergence of a biochemical role of a family of plant dehydration proteins // Physiol. Plant. 1996. V. 97. P. 795. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1996.tb00546.x>
9. 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. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.085183>
10. 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 // Plant Cell. 2011. V. 23. P. 2391.
11. Welling A., Palva E.T. Molecular control of cold acclimation in trees // Physiol. Plant. 2006. V. 127. P. 167.
12. Cuevas-Velazquez C.L., Rendón-Luna D.F., Covarrubias A.A. Dissecting the cryoprotection mechanisms for dehydrins // Front. Plant Science. 2014. V. 5. P. 1. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00583>
13. Perdiguero P., Barbero M.C., Cervera M.T., Soto A., Colada C. Novel conserved segments are associated with differential expression patterns for *Pinaceae* dehydrins // Planta. 2012. V. 236. P. 1863. <https://doi.org/10.1007/s00425-012-1737-4>
14. 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. P. 442. <https://doi.org/10.1093/treephys/tpx125>
15. Yakovlev I.A., Asante D.K., Fossdal C.G., Partanen J., Junttila O., Johnsen O. Dehydrins expression related to timing of bud burst in Norway spruce // Planta. 2008. V. 228. P. 459. <https://doi.org/10.1007/s00425-008-0750-0>
16. 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. P. 1354. <https://doi.org/10.1093/treephys/tpt105>
17. Rigault P., Boyle B., Lepage P., Cooke J.E.K., Bousquet J., MacKay J.J. A white spruce gene catalog for conifer genome analyses // Plant Physiol. 2011. V. 157. P. 14. <https://doi.org/10.1104/pp.111.179663>
18. 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. <https://doi.org/10.1007/s11295-012-0476-9>
19. 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.
20. Kontunen-Soppela S., Laine K. Seasonal fluctuation of dehydrins is related to osmotic status in Scots pine needles // Trees. 2001. V. 15. P. 425. <https://doi.org/10.1007/s004680100124>
21. Korotaeva N.E., Oskorbina M.V., Kopytova L.D., Suvo-rova 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. P. 89. <https://doi.org/10.1007/s10310-011-0260-y>
22. Коротаева Н.Е., Иванова М.В., Суворова Г.Г., Боровский Г.Б. Дегидрины в адаптации сосны обыкновенной и ели сибирской к условиям произрастания в период вегетации // Сибирский лесной журнал. 2020. № 6. С. 54. <https://doi.org/10.15372/SJFS20200605>
23. Petrov K.A., Sofronova V.E., Bubyakina V.V., Perk A.A., Tatarinova T.D., Ponomarev A.G., Chepalov V.A., Okhlopova Zh.M., Vasilieva I.V., Maximov T.Chr. Woody plants of Yakutia and low-temperature stress // Russ. J. Plant Physiol. 2011. V. 58. P. 1011. <https://doi.org/10.1134/S1021443711060148>
24. Tatarinova T.D., Perk A.A., Bubyakina V.V., Vasilieva 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.
<https://doi.org/10.7868/S0869565217080242>
25. 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. P. 802.
<https://doi.org/10.1104/pp.16.0075>
 26. Тимофеев П.А. Деревья и кустарники Якутии. Якутск: Бичик, 2003. 64 с.
 27. Уткин А.И. Леса Республики Саха (Якутия) — феномен таежного пояса северной Евразии // Хвойные бореальной зоны. 2006. Т. 23. № 3. С. 7.
 28. Миронов П.В., Левин Э.Д. Переохлаждение и обезвоживание хвойных зачатков в зимующих почках лиственницы сибирской // Физиология растений. 1985. Т. 32. С. 695.
 29. Ваганов Е.А., Круглов В.Б. Экология древесных растений. Красноярск: Сибирский федеральный университет, 2007. 229 с.
 30. 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. P. 258.
<https://doi.org/10.1134/S0012496611040193>
 31. Ponomarev A.G., Tatarinova T.D., Perk A.A., Vasilieva I.V., Bubyakina V.V. Dehydrins associated with the development of frost resistance of Asian white birch // Russ. J. Plant Physiol. 2014. V. 61. P. 105.
<https://doi.org/10.1134/S1021443713060095>
 32. 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 Tissue Biol. 2017. V. 11. P. 483.
<https://doi.org/10.1134/S1990519X17060098>
 33. Перк А.А., Перк А.А. Изучение морозоустойчивости плодово-ягодных растений методом электропроводности // Исследование биологических ресурсов в Якутии. Якутск: изд-во ЯФ СО РАН СССР, 1978. С. 54.
 34. 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.
 35. Laemmli U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature. 1970. V. 227. P. 680.
 36. Timmons T.M., Dunbar B.S. Protein blotting and immunodetection // Meth. Enzymol. 1990. V. 182. P. 679.
 37. Vornam B., Gailing O., Derory J., Plomion C., Kremer A., Finkeldey R. Characterization and natural variation of a dehydrin gene in *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. // Plant Biol. 2011. V. 13. P. 881.
<https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.2011.00446.x>
 38. Karlson D.T., Zeng Y.V.E., Stirn R., Joly J., Ashworth E.N. Photoperiodic regulation of a 24-kDa dehydrin-like protein in red-osier dogwood (*Cornus sericea* L.) in relation to freeze-tolerance // Plant. Cell. Physiol. 2003. V. 44. P. 25.
<https://doi.org/10.1093/pcp/pcg006>
 39. 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.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.1998.00306.x>
 40. Strimbeck G.R., Schaberg P.G., Fossdal C.G., Schroder P.W., Kjellsen T.D. Extreme low temperature tolerance in woody plants // Front. Plant Science. 2015. V. 6. P. 1.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00884>