

УДК 574.24

ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ *BETULA PLATYPHYLLA* В УСЛОВИЯХ ЦЕНТРАЛЬНОЙ И ЮЖНОЙ ЯКУТИИ

© 2011 А.А. Перк, А.Г. Пономарев, Т.Д. Татарина, В.В. Бубякина

Институт биологических проблем криолитозоны СО РАН, г. Якутск

Поступила в редакцию 16.05.2011

Описаны изменения электрофизиологических характеристик и особенности содержания суммарных белков побегов центрально- и южноякутской популяций *Betula platyphylla* в сезонном цикле развития в условиях резко континентального климата криолитозоны. Найдено значительное уменьшение электрического сопротивления побегов во время покоя растений по сравнению с вегетирующим состоянием. Березы Центральной Якутии имели более высокие показатели относительной электропроводности при разных частотах (120/1000 гц), чем таковые в Южной Якутии. Определены группы суммарных белков с молекулярными массами 14, 17, 26, 27, 32, 39, 49, 51 кД, имеющих ярко выраженную сезонную динамику и, вероятно, связанных с формированием морозоустойчивости растений. Вместе с тем не выявлено четких различий между двумя популяциями по особенностям содержания данных белков.

Ключевые слова: *Betula platyphylla*, сезонная динамика, электрофизиологические характеристики, суммарные белки побегов

На огромной территории Якутии, занимающей площадь 3,1 млн. км², выделяются районы с разной степенью экстремальности климата, который в целом характеризуется резкой континентальностью. Для Центральной Якутии свойственны короткое жаркое лето (средняя температура июля 19°C), продолжительная зима с очень низкими температурами (средняя температура января -43°C) и малое годовое количество осадков (200-250 мм). Для Южной Якутии, где преобладает горный рельеф, характерны более прохладное лето (средняя температура июля 17°C), менее суровая зима (средняя температура января -28°C) и большее количество осадков (годовые суммы осадков 500-600 мм) [1]. Эти климатические различия определяют особенности роста и развития растений данных районов, которые могут быть оценены по ряду физиолого-биохимических показателей.

К физиологическим методам, позволяющим зафиксировать первые неспецифические сигналы, отражающие состояние клеточных мембран, относятся измерения величин полного электрического сопротивления (импеданса)

Перк Александр Александрович, научный сотрудник.
E-mail: aaperk@mail.ru

Пономарев Анатолий Гаврильевич, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник. E-mail: aaronomarev@yandex.ru

Татарина Татьяна Дмитриевна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник

Бубякина Виктория Витальевна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник

органов и тканей растений. Метод прямого измерения импеданса с помощью игольчатых электродов важен при комплексной оценке морозоустойчивости растений, а также для определения повреждения их тканей после стресс-нагрузок [3]. С другой стороны, в качестве оценочных биохимических показателей при изучении ростовых процессов растений удобно использовать спектры суммарных белков, полученные методом гель-электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) [2]. Оба метода могут хорошо дополнять друг друга. Ранее нами при изучении берез Центральной Якутии получены данные по проницаемости тканей побегов с помощью метода электролитов и особенностям их белкового спектра в зависимости от нахождения растений в состоянии вегетации или покоя [2].

Цель работы: изучение ряда электрофизиологических характеристик методом проникающих электродов и особенностей содержания суммарных белков в сезонном цикле развития двух разных (центрально- и южноякутская) популяций березы плосколистной *Betula platyphylla* Sukach (разновидность березы повислой – *B. pendula* Roth) в условиях криолитозоны.

Материалы и методы. Побеги *B. platyphylla* – наиболее распространенной лесообразующей лиственной породы Якутии, отбирали в течение годового цикла 2009-2010 гг. с периодичностью раз в месяц. Место сбора: Центральная Якутия – окрестности г. Якутска (62° N, 129° E), Южная Якутия – окрестности г. Алдана (58° N, 125° E). Использовали 6

постоянных экземпляров растений каждого местообитания. Определение электрического импеданса проводили с помощью RLC-измерителя марки E7-22 (частоты 120 и 1000 Гц) в 15 повторностях на растение. Использование более высоких частот позволяет снизить поляризационный эффект. Игольчатые электроды изготовляли из нержавеющей стали с расположением штырей в 4 мм друг относительно друга. Электроды вводили в 2-3-летние побеги диаметром до 5 мм на расстоянии 15-20 см от верхушки и на глубину 1,5 мм. Перед измерением импеданса срезанные побеги стабилизировали при комнатной температуре. Электрическое сопротивление тканей представляли в условных кОм. Вычисляли также показатель отношения электрического сопротивления тканей побегов на частоте 120 Гц к частоте 1000 Гц. На графиках представлены средние арифметические и ошибки средней.

Для выделения суммарных белков применяли метод Сарнигхаузена и сотр. [5]. Одно- и двухлетние цельные побеги опытных растений (1,0-1,5 г сырой массы) измельчали в порошок в среде жидкого азота. Экстракция белков проводилась в растворе (62,5 мМ трис-HCl, pH 6,8; 2% додецилсульфат-Na (SDS), 5% 2-меркаптоэтанол, 1 мМ PMSF) при кипячении в течение 5 мин. После охлаждения экстракты центрифугировали в течение 45 мин при 11 000 г (4°C). Суммарные белки осаждали 5 объемами ацетона (-20°C). Белковое содержание определяли с помощью набора («Bio-Rad», США). Электрофорез проводили в 12,5% SDS-PAGE [4] с использованием маркеров молекулярной массы (мол. м.) («Fermentas», Литва) и последующим окрашиванием белков Кумасси R-250. На треки наносили равные количества белка (15 мкг). На рисунках представлены результаты типичных опытов.

Результаты и их обсуждение. Динамика электрического сопротивления, измеренного на двух частотах (120 и 1000 гц) в побегах берез в Алдане и Центральной Якутии, имела сходную сезонную картину: понижение в летний период и повышение к зиме по мере затухания терминального и радиального роста побегов (рис. 1). Причем снижение электрического сопротивления от зимы к лету имело более пологий характер, чем его подъем от лета к зиме. График хода изменений электрического сопротивления побегов на частоте 120 Гц фактически не отличался от такового на частоте 1000 Гц и поэтому здесь не приводится. Однако абсолютные значения импеданса различались по популяциям. Побеги растений Центральной Якутии зимой (февраль 2010 г.) имели более высокие значения электрического сопротивления по сравнению с южнокутскими образцами – 125,3 и 103,5 кОм против 106,2 и

89,9 кОм на частотах 120 и 1000 Гц соответственно. В летний период (июнь 2009 г.) происходило более резкое их падение до величин 50,1 и 39,0 кОм в Якутске и менее резкое до величин 57,2 и 48,0 кОм в Алдане на тех же частотах. Таким образом, разность между летними и зимними абсолютными значениями импеданса побегов берез центральной якутской популяции была в 1,5 раза больше по сравнению с алданской популяцией. Это коррелирует с температурой воздуха, которая зимой в Центральной Якутии в среднем была ниже на 10°C, а летом – выше на 1,5°C, чем в Южной Якутии.

Показатель отношения электрического сопротивления на частоте 120 Гц к частоте 1000 Гц также менялся от зимнего (1,20-1,29) к летнему (1,16-1,20) сезонам, но всюду был больше для центральной якутской популяции (рис. 2). Его среднегодовые значения составили для берез Центральной Якутии – 1,22, для берез Южной Якутии – 1,18. Данный показатель четко разграничивал две популяции берез по электрофизиологическим характеристикам.

Таким образом, величины электрического сопротивления тканей растений косвенно характеризуют уровень их метаболизма. На фоне укорочения дня и постепенного понижения температуры происходит переход растений от состояния вегетации к покою. При этом наблюдается значительное снижение подвижности электролитов в тканях, в том числе за счет связывания с органическими макромолекулами и изменения структуры воды. Это приводит к возрастанию тканевого импеданса, который будет тем больше, чем морозоустойчивее растения [3]. Выявленные для обеих популяций берез электрофизиологические параметры их сезонных изменений характеризуют адаптационный потенциал, необходимый для их перезимовки в конкретных условиях Центральной и Южной Якутии.

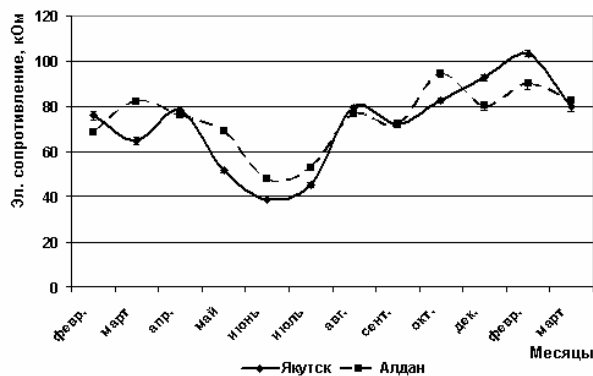


Рис. 1. Сезонные изменения (2009-2010 гг.) электрического сопротивления (частота 1000 Гц) побегов *B. platyphylla* Центральной и Южной Якутии

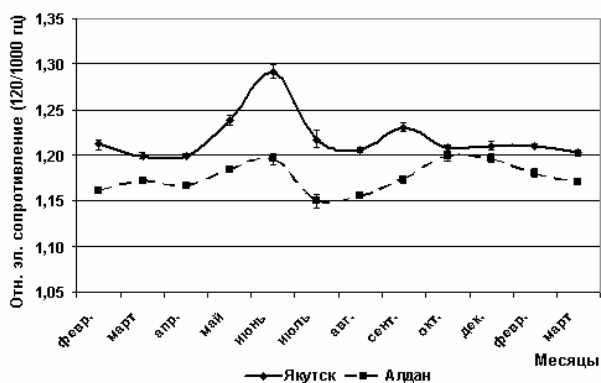


Рис. 2. Сезонные изменения (2009-2010 гг.) отношений электрических сопротивлений на двух частотах (120/1000 Гц) побегов *B. platyphylla* Центральной и Южной Якутии

На биохимическом уровне сезонные изменения состояния растений *B. platyphylla* достаточно четко отражаются в спектрах суммарных белков побегов. Всего в растениях Центральной Якутии и Алдана было идентифицировано около 60 групп полипептидов с разными мол. м. (рис. 3 и 4).

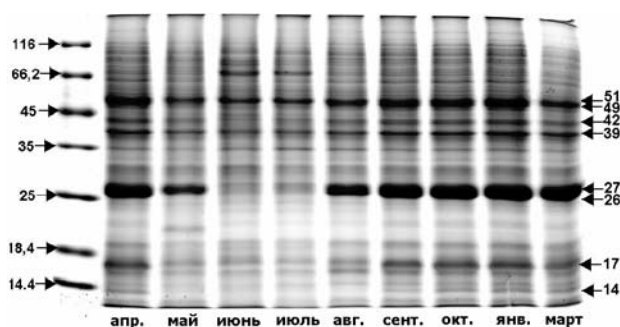


Рис. 3. Спектр суммарных белков *B. platyphylla* Центральной Якутии (2009-2010 гг.). Стрелками отмечены полипептиды, вероятно, ассоциированные с формированием морозоустойчивости

Показано, что ряд белков, например, с мол. м. 30, 35, 53, 64, 106 кД (на рисунках не показаны) равномерно представлены в побегах берез в течение года. Наиболее интересная картина складывается при рассмотрении спектра белков, имеющих сезонную динамику. Во время вегетации выявляется целый ряд полипептидов с относительно большей мол. м., например, 82, 91 и 98 кД. Предполагается, что эти полипептиды участвуют в основных метаболических процессах. Другую группу белков, накопление которых происходит при подготовке растений к покою осенью, можно связать с формированием морозоустойчивости *B. platyphylla*. Среди таких белков по количеству особо выделяются полипептиды с мол. м. 14,

17, 26, 27, 39, 42, 49 и 51 кД. Вместе с тем, между популяциями трудно провести различия по количественному содержанию данных групп белков.

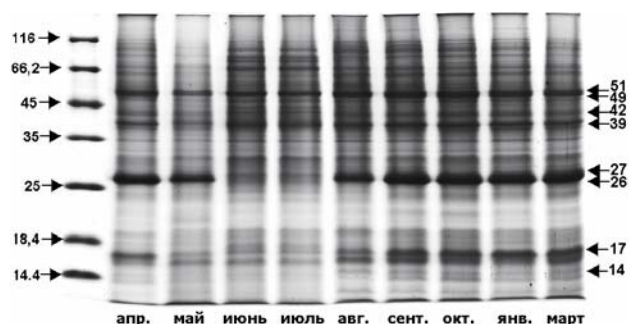


Рис. 4. Спектр суммарных белков *B. platyphylla* Южной Якутии (2009-2010 гг.). Стрелками отмечены полипептиды, вероятно, ассоциированные с формированием морозоустойчивости

Выводы: при изучении годового цикла найдены различия между центрально- и южно-якутской популяциями *Betula platyphylla* в особенностях электрофизиологических характеристик. Вместе с тем качественный и количественный состав суммарных белков обеих популяций мало отличался друг от друга. При этом обнаружены мажорные полипептиды с выраженной сезонной динамикой, вероятно, связанные с развитием криотолерантности растений. Дальнейшее изучение сезонных изменений полипептидов должно быть направлено на идентификацию и выявление характерных особенностей индивидуальных белков.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Атлас сельского хозяйства Якутской АССР. – М.: ГУГК, 1989. 115 с.
2. Пономарев, А.Г. Физиолого-биохимические характеристики *Betula platyphylla* в связи с условиями произрастания на многолетней мерзлоте / А.Г. Пономарев, Т.Д. Татарина, А.А. Перк и др. // Вестник Московского государственного университета леса – Лесной вестник. 2009. № 2. С. 12-16.
3. Щербинин, А.А. Низкочастотный электрический импеданс и формирование морозоустойчивости у древесных растений / А.А. Щербинин, Э.М. Лобанов // Физиология растений. 1987. № 6. С. 1149-1158.
4. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature. 1970. V. 227. P. 680-685.
5. Sarnighausen, E. Seasonal regulation of a 24-kDa protein from red-osier dogwood (*Cornus sericea*) xylem / E. Sarnighausen, D. Karlson, E. Ashworth // Tree Physiol. 2002. V. 22. P. 423-430.

**PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF
BETULA PLATYPHYLLA IN THE CONDITIONS OF CENTRAL
AND SOUTH YAKUTIA**

© 2011 A.A. Perk, A.G. Ponomarev, T.D. Tatarinova, V.V. Bubyakina

Institute for Biological Problems of Cryolithozone SB RAS, Yakutsk

Changes of electrophysiological characteristics and singularity of the maintenance of total proteins in runaways of Central- and South Yakutia populations of *Betula platyphylla* in seasonal cycle of development in the conditions of sharply continental climate of cryolithozone are described. Considerable reduction of electric resistance of runaways is found during rest of plants in comparison with vegetative condition is found. Birches of Central Yakutia had higher indicators of relative electric conductivity at different frequencies (120/1000 Hz), than those in Southern Yakutia. It was determined groups of total proteins with molecular weights 14, 17, 26, 27, 32, 39, 49, 51 кД, having strongly pronounced seasonal dynamics and, possibly, connected with formation of plants frost resistance. At the same time it is not revealed accurate distinctions between two populations on singularities of the maintenance of given proteins.

Key words: Betula platyphylla, seasonal dynamics, electrophysiological characteristics, total proteins of runaways

Alexander Perk, Research Fellow. E-mail: aaperk@mail.ru

Anatoliy Ponomarev, Candidate of Biology, Senior Research Fellow. E-mail: anaponomarev@yandex.ru

Tatiana Tatarinova, Candidate of Biology, Senior Research Fellow

Viktoriya Bubyakina, Candidate of Biology, Research Fellow