

Водорастворимые вещества меристем почек *Picea obovata* L. и *Pinus sylvestris* L.: содержание, состав и свойства при формировании состояния низкотемпературной устойчивости

Е. В. АЛАУДИНОВА, С. Ю. СИМКИНА, П. В. МИРОНОВ

ГОУ ВПО «Сибирский государственный технологический университет»
660049, Красноярск, ул. Мира, 82
E-mail: simkina_svetlana@mail.ru

АННОТАЦИЯ

Рассматривается сезонная динамика водорастворимых веществ и содержания воды в тканях меристем вегетативных почек *Picea obovata* L. и *Pinus sylvestris* L. Определено изменение концентраций цитоплазматических растворов меристематических клеток при их обезвоживании в результате внеклеточного или внеорганного льдообразования. Обнаружено, что при снижении температуры в отрицательной области до $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ в результате кристаллизации воды концентрация водорастворимых веществ цитоплазмы может возрастать в 2–2,5 раза. Установлена зависимость между содержанием в клетках воды, способной кристаллизоваться, незамерзающей воды и концентрацией водорастворимых веществ при снижении температуры от 0 до $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Ключевые слова: льдообразование, водорастворимые вещества, меристематические ткани почек, водоудерживающая способность, ель сибирская, сосна обыкновенная.

В климатических условиях бореальной зоны динамику обменных процессов, протекающих в живых тканях древесных растений, обуславливают сезонные колебания температуры. Основными причинами, вызывающими гибель растений, исследователи считают образование льда в тканях снаружи клеток (в межклетниках) либо внутри них [1–5]. В природных условиях гибель растений от внутриклеточного замерзания воды наблюдается очень редко. Внеклеточное замерзание предотвращает образование внутриклеточного льда, но вызывает при этом по ряду причин опасное обезвоживание протоплазмы. С другой стороны, в холодном и умеренном климате все растения в зимний период пре-

терпевают внеклеточное замерзание. С целью предотвращения внутриклеточного образования льда и чрезмерного обезвоживания внеклеточным льдом зимующие растения используют как коллигативные (осморегулирующие), так и неколлигативные (криопротекторные и антифризные) свойства водорастворимых веществ, синтезируемых в цитоплазме клеток при формировании состояния низкотемпературной устойчивости в осенний период [6]. Высокоморозостойкие растения обладают способностью обеспечивать своевременный отток значительной части воды из протопласта. При этом у некоторых растений часть воды может оставаться в клетках в переохлажденном состоянии вплоть до $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ и ниже, что и обеспечивает возможность их обезвоживания при кристаллизации воды в специальных зонах льдообразования [6–8].

Алаудинова Елена Владимировна
Симкина Светлана Юрьевна
Миронов Петр Васильевич

Это приводит к концентрированию растворимых веществ цитозоля (растворимой фазы цитоплазмы), что, в свою очередь, вызывает изменение условий межмолекулярных взаимодействий.

Таким образом, снижение активности метаболических процессов осенью сопровождается индукцией образования целого ряда соединений, необходимых для сохранения целостности клеточных структур в неблагоприятных условиях низких зимних температур.

Как известно, меристемы почек деревьев и кустарников обладают повышенной чувствительностью к действию низких температур, т. е. к условиям перезимовки. Вместе с тем биохимические изменения меристем почек хвойных при формировании состояния низкотемпературной устойчивости осенью, а также при его утрате весной практически не исследованы. Отличия в морфологии почек различных видов хвойных позволяют предполагать наличие определенных особенностей низкотемпературной адаптации их меристематических тканей.

Цель данной работы – выяснение особенностей состава, содержания водорастворимых веществ в меристематических тканях почек морозостойких хвойных древесных пород и динамики их изменений в различные периоды годового цикла, соответствующие различным фенологическим состояниям дерева. Учитывая сильное обезвоживание меристем осенью при положительных температурах воздуха и дальнейшее вымораживание способной к кристаллизации части воды при понижении температуры в отрицательной области [9], считаем необходимым также оценить степень концентрирования водорастворимых веществ в цитоплазме клеток и содержание в них незамерзающей воды.

В качестве объекта исследования выбраны меристематические ткани вегетативных почек (зачаточные ткани побега и хвои) морозостойких хвойных пород: ели сибирской (*Picea obovata* L.) и сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.). Именно они определяют выживание дерева в целом. Кроме того, при выделении меристем из почек удается получить весьма однородные по содержанию однотипных живых клеток образцы, что делает интерпретацию результатов достаточно надежной.

Отбор проб и выделение меристем проводили как описано в работе [6]. Содержание воды в образцах определяли весовым методом после сушки образцов в вакуумном сушильном шкафу при 80 °С в присутствии пятиоксида фосфора. Гомогенизацию меристем с целью получения водорастворимых веществ проводили сразу после их выделения в ступке вручную с добавлением охлажденной дистиллированной воды без защитных добавок. Гомогенат центрифугировали при 22 000 g в течение 30 мин в рефрижераторной центрифуге ЦЛР-1. В надосадочной жидкости определяли содержание водорастворимых веществ весовым методом, содержание водорастворимых белков – по методу Г. А. Бузуна и др. [10], водорастворимых углеводов – по методике из работы [11], свободных аминокислот – по цветной реакции с 3%-м раствором нингидрина [12]. Определения выполнены в трех повторностях. Статистическую обработку результатов проводили с использованием компьютерной программы TableCurve 2D.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты исследования показали (рис. 1), что с августа по май содержание водораство-

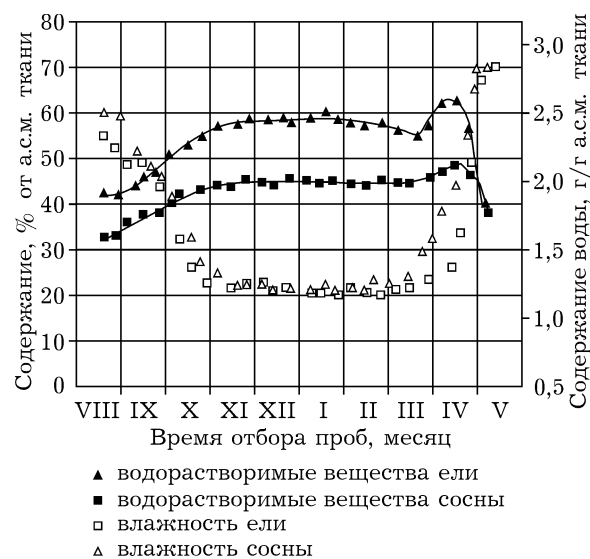


Рис. 1. Сезонная динамика содержания водорастворимых веществ цитоплазмы и водосодержания меристем вегетативных почек ели сибирской и сосны обыкновенной

римых веществ в меристемах почек обеих пород существенно варьировало: у ели – от 35 до 64, а у сосны – от 33 до 49 % от абсолютно сухой массы (а.с.м.) ткани. В течение всего периода исследований содержание водорастворимых веществ у ели было выше, чем у сосны: в августе (сформированные почки) примерно на 15 %; зимой (почки в состоянии низкотемпературной устойчивости) – на 19 %; весной (набухшие почки перед распусканием) – на 7 % от а.с.м. ткани. Однако динамика содержания водорастворимых веществ в обеих породах имела сходство.

В начале сентября содержание водорастворимых веществ в меристемах обеих пород начинало возрастать, что по срокам совпадало с началом снижения содержания в них воды. При этом наблюдалась линейная зависимость между содержанием водорастворимых веществ и влажностью меристем (рис. 2). Максимальных зимних значений содержание водорастворимых веществ в меристемах до-

стигало практически одновременно во второй половине ноября. Такой высокий и стабильный уровень (около 59 % у ели и 45 % у сосны) в обеих породах наблюдался в течение всего зимнего периода.

Весной, в период подготовки к активной вегетации, характер динамики водорастворимых веществ у ели и сосны имел свои особенности. Обращает на себя внимание, что уже в конце февраля в меристемах ели наблюдалось некоторое снижение содержания водорастворимых веществ (примерно на 10 % от среднезимнего уровня), свидетельствующее о том, что в живых тканях морозостойких растений метаболические процессы протекают даже при отрицательных температурах воздуха. В середине марта содержание начинало возрастать и достигало весеннего максимума в середине апреля (около 62 % от а.с.м. ткани). Следует отметить, что изменение содержания водорастворимых веществ, наблюдающееся у ели (конец марта – начало апреля), совпадало с ростом водосодержания (см. рис. 1), что свидетельствует о согласованности изменений содержания водорастворимых веществ, процесса набухания почек, а также структурной подготовки клеток фотосинтетического аппарата. В третьей декаде апреля содержание водорастворимых веществ начинало снижаться и к моменту распускания почек составляло не более 40 % от а.с.м. ткани.

В меристемах сосны весной, как и у ели, наблюдался рост содержания водорастворимых веществ, однако по времени он начинался примерно на 2 нед. позже – в конце марта и не предварялся снижением их содержания, как у ели. Рост содержания водорастворимых веществ был также взаимосвязан с ростом водосодержания. Максимальное содержание водорастворимых веществ (около 49 % от а.с.м. ткани) отмечено в последней декаде апреля. Однако уже через несколько дней оно начинало снижаться быстрыми темпами и в набухших почках перед распусканием составляло не более 38 % от а.с.м. ткани.

Анализ динамики процессов роста содержания водорастворимых веществ и обезвоживания меристем почек ели и сосны позволяет предположить, что в начальный период действия механизма формирования криорезистент-

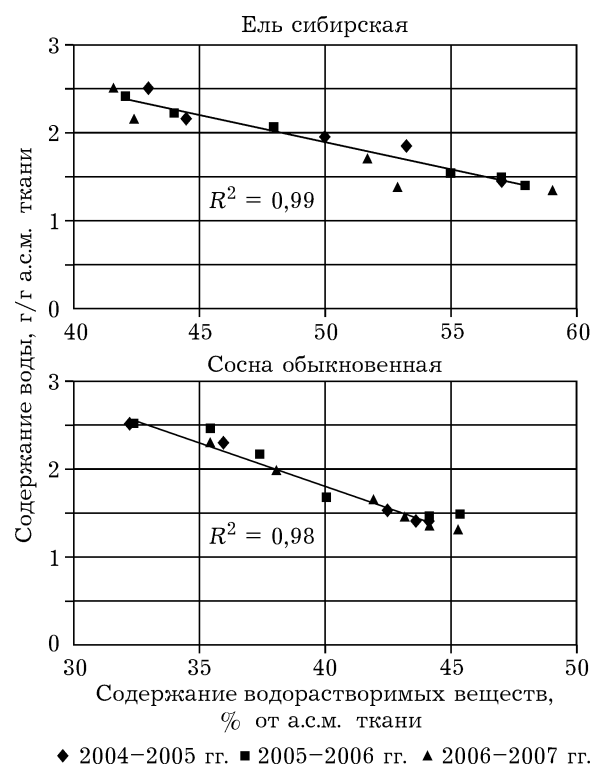


Рис. 2. Зависимость содержания воды от содержания водорастворимых веществ цитоплазмы в меристематических тканях вегетативных почек ели и сосны при формировании низкотемпературной устойчивости

ности – осенью, еще при положительных температурах воздуха, происходящее в тканях увеличение содержания водорастворимых веществ при неизменных размерах клеток неизбежно приводит к снижению содержания в них воды (по существу, к вытеснению ее избытка из клеток), а значит, и к росту концентрации растворимых веществ в цитоплазме. Расчеты показывают, что концентрация водорастворимых веществ при минимальном содержании воды около 1,31 г/г а.с.м. ткани (относительная влажность ~ 56 %), устанавливаемом в этих условиях, при котором меристемы выдерживают низкие зимние температуры, составила около 26 % у ели и около 23 % у сосны.

Дальнейшее обезвоживание меристематических клеток и концентрирование цитоплазматических растворов связано у ели с внеклеточным льдообразованием [8]. Движущей силой процесса является разница давлений паров над льдом в зонах льдовыделения и переохлажденными внутриклеточными растворами.

Изменение концентрации водорастворимых веществ цитоплазмы при снижении температуры в отрицательной области (рис. 3) рассчитано с помощью данных по равновесному содержанию воды в образцах водорастворимых веществ ели и сосны над льдом при снижении температуры от 0 до -40 °С (рис. 4), взятых из работы [9]. Установлено, что концентрация водорастворимых соединений в цитоплазме меристематических клеток

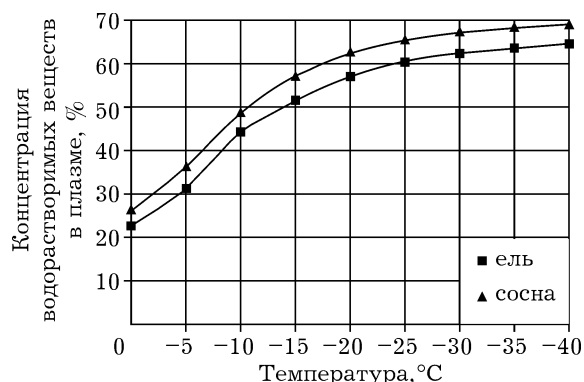


Рис. 3. Изменение концентрации водорастворимых веществ цитоплазмы при обезвоживании меристематических тканей почек ели и сосны в результате образования льда вне клеток

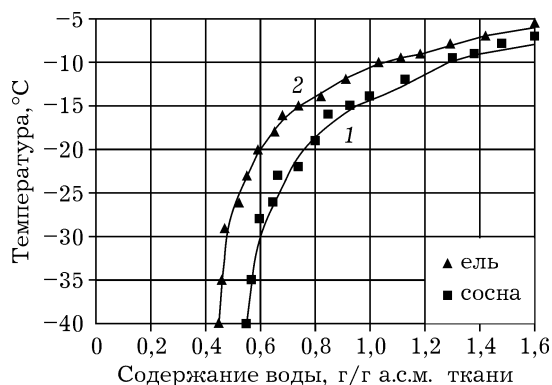


Рис. 4. Кривые равновесного содержания воды над льдом в области температур от 0 до -40 °С [9].

1 – растворимые вещества цитоплазмы сосны, 2 – то же ели

при снижении температуры в отрицательной области до -40 °С может изменяться у ели от 26 до 69 % и у сосны от 23 до 65 %. В клетках меристематических тканей вегетативных почек ели и сосны при обезвоживании осенью при положительных температурах воздуха и в состоянии низкотемпературной устойчивости (зимой) при снижении температуры в отрицательной области изменения концентраций водорастворимых веществ в цитоплазме имеют сходство (см. рис. 3). Однако необходимо отметить, что концентрация водорастворимых веществ в ели выше, чем в сосне.

Анализ рис. 3 и 4 позволяет сделать вывод о том, что концентрация водорастворимых веществ в цитоплазме клеток меристем ели и сосны, вероятно, зависит не только от способности растворимых компонентов клетки связывать воду при определенных отрицательных температурах, и предположить, что состав водорастворимых соединений в меристематических тканях почек ели и сосны неодинаков. Поскольку концентрация цитоплазматических растворов зависит как от способности различных групп водорастворимых соединений связывать воду при определенной отрицательной температуре, так и от содержания этих соединений, то в случае сходства составов все точки на рисунке располагались бы на одной кривой, т. е., если бы на концентрацию цитоплазматического раствора оказывала влияние только способность растворимых соединений связывать воду, изменение концентрации цитоплазмы при

Т а б л и ц а 1

Содержание основных групп водорастворимых веществ, % от а.с.м. ткани

Порода	Водорастворимые		Свободные аминокислоты
	белки цитоплазмы	углеводы	
Ель	30 ± 1,4	17 ± 0,8	10 ± 0,5
Сосна	2,5 ± 0,1	21 ± 1,0	7 ± 0,4

обезвоживании меристематических тканей в результате внеорганного или внеклеточного льдообразования в обеих породах протекало бы совершенно одинаково.

Исследование состава водорастворимых веществ цитоплазмы в состоянии низкотемпературной устойчивости (январь) показало, что основными группами в обеих породах являются водорастворимые белки, водорастворимые углеводы и свободные аминокислоты (табл. 1).

Особенностью водорастворимых веществ ели является то, что в них преобладают белки, составляющие более 50 % от общих растворимых веществ. В меристемах сосны, наоборот, содержание водорастворимых белков низкое. Содержание низкомолекулярных соединений (НМС), определенное как разница между общими растворимыми веществами и водорастворимыми белками, в сосне выше и составляет около 37 % против 29 % у ели. Осмотически активные соединения (водорастворимые углеводы и свободные аминокислоты) в сосне и ели содержатся в одинаковых количествах (примерно 27–28 %). Однако их доля в составе водорастворимых соединений сосны значительно выше, чем в

ели. Таким образом, результаты исследования состава водорастворимых веществ цитоплазмы вполне согласуются с экспериментальными кривыми (см. рис. 4), показывающими, что водорастворимые вещества сосны обладают более высокой водоудерживающей способностью.

Для определения количества незамерзающей воды (НВ), связываемой водорастворимыми веществами ели и сосны при различных отрицательных температурах (при условии равенства давлений паров над льдом в зонах льдовыделения и переохлажденными внутриклеточными растворами), и воды, способной кристаллизоваться (КВ) при дальнейшем снижении температуры, использованы данные по равновесному содержанию воды в образцах водорастворимых веществ ели и сосны над льдом при снижении температуры от 0 до –40 °С (см. рис. 4).

Полученные результаты (табл. 2) показывают, что водорастворимые вещества сосны (при прочих равных условиях) связывают большее количество незамерзающей воды, составляющей жидкую фазу цитоплазмы. Это объясняется различиями в составе (см. табл. 1) и водоудерживающих свойствах растворимых

Т а б л и ц а 2

Изменение содержания различных форм воды при обезвоживании меристем ели и сосны в результате образования льда вне клеток, г/г абсолютно сухого вещества (а.с.в.)

Температура, °С	Водорастворимые вещества			
	ели		сосны	
	НВ	КВ	НВ	КВ
0	2,80	2,35	3,40	2,85
–5	1,75	1,30	2,20	1,65
–10	1,05	0,60	1,26	0,71
–15	0,75	0,30	0,95	0,40
–20	0,60	0,15	0,75	0,20
–25	0,53	0,08	0,65	0,10
–30	0,49	0,04	0,60	0,05
–35	0,47	0,02	0,58	0,03
–40	0,45	0	0,55	0

веществ исследуемых пород, поскольку осмотически активные соединения (напомним, что их доля в растворимых соединениях сосны значительно выше, чем в ели) обладают большей способностью связывать воду, чем высокомолекулярные соединения (водорастворимые белки). В составе незамерзающей воды, связываемой водорастворимыми веществами сосны при различных отрицательных температурах, также больше и воды, способной кристаллизоваться при дальнейшем снижении температуры. При снижении температуры от 0 до $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ в цитоплазме меристематических клеток обеих пород снижение содержания незамерзающей воды происходит за счет именно этой (способной к кристаллизации) формы воды, ее содержание в жидкой фазе снижается от 2,35 г/г а.с.в. до нуля у ели и от 2,85 г/г а.с.в. до нуля у сосны. Это приводит к концентрированию растворимых веществ в цитоплазме меристематических клеток (см. рис. 3). Графики, представленные на рис. 5, наглядно иллюстрируют линейную зависимость между концентрацией растворимых веществ и количеством воды в цитоплазме, способной к кристаллизации (при условии дальнейшего снижения температуры). Высокие коэффициенты корреляции (около 0,99) для обеих пород указывают на связь этих показателей в процессе формирования низкотемпературной устойчивости живых клеток. Не вызывает сомнений, что для предотвращения заморозания воды внутри клеток (а значит, и со-

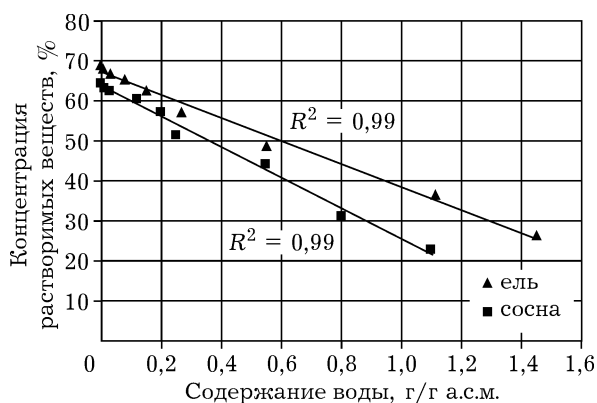


Рис. 5. Зависимость концентрации водорастворимых веществ цитоплазмы от содержания способной к кристаллизации воды в меристематических тканях вегетативных почек ели и сосны

хранения их жизнеспособности) при снижении температур в отрицательной области необходимо увеличение концентрации растворимых веществ. На графике (см. рис. 4) видно, что при $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ внутриклеточная вода представлена только невымораживаемой (некристаллизующейся) водой, ее содержание у ели составляет примерно 0,55, а у сосны – 0,45 г/г а.с.в. При этом концентрация растворимых веществ в цитозоле меристематических клеток обеих пород достигает максимальных значений.

ВЫВОДЫ

1. Выявлены особенности сезонной динамики водорастворимых веществ в меристемах почек морозостойких хвойных пород: ели сибирской (*Picea obovata* L.) и сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.).

2. У обеих пород обнаружена линейная зависимость между снижением содержания воды и увеличением содержания водорастворимых веществ в меристемах при формировании состояния низкотемпературной устойчивости осенью.

3. Показано, что концентрация водорастворимых соединений в цитоплазме меристематических клеток при снижении температуры в отрицательной области может изменяться у ели от 26 до 69 % и у сосны от 23 до 65 %. В обеих породах максимальных значений концентрация достигает при $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$, когда вся способная кристаллизоваться вода уже мигрировала к зонам льдовыделения.

4. Определен состав водорастворимых соединений в меристемах почек ели и сосны в зимний период. Обнаружено, что более высокая водоудерживающая способность водорастворимых веществ сосны по сравнению с елью обусловлена значительной долей в их составе осмотически активных соединений.

5. Показано, что между концентрацией растворимых веществ в цитоплазме меристематических клеток и количеством воды, способной к кристаллизации (при условии дальнейшего снижения температуры), а также незамерзающей воды существует линейная зависимость.

Работа поддержана грантом ККФН 17G153.

ЛИТЕРАТУРА

1. Самыгин Г. А. Причины вымерзания растений. М.: Наука, 1974. 147 с.
2. Туманов И. И. Физиология закаливания и морозостойкости растений. М.: Наука, 1979. 352 с.
3. Левитт Д. Холодостойкость растений. М., 1983. 102 с.
4. Duman J. G. Antifreeze and ice nucleator proteins in terrestrial arthropods // *Annu. Rev. Physiol.* 2001. Vol. 63. P. 327–357.
5. Strom C. S., Liu X. Y., Jia Z. // *Biophysical Journal.* 2005. Vol. 89. P. 2618–2627.
6. Трунова Т. И. Растение и низкотемпературный стресс. М.: Наука, 2007. 57 с.
7. Красавцев О. А., Разнополов О. Н., Хвалин Н. Н. Отток воды из переохлажденных зачаточных бутонов // *Физиология растений.* 1984. Т. 30, № 5. С. 1025–1031.
8. Миронов П. В., Алаудинова Е. В., Репях С. М. Низкотемпературная устойчивость живых тканей хвойных. Красноярск: СибГТУ, 2001. 253 с.
9. Алаудинова Е. В., Симкина С. Ю., Миронов П. В. Сезонная динамика содержания основных групп водорастворимых веществ меристем вегетативных почек ели сибирской и сосны обыкновенной // *Хвойные бореальной зоны.* 2007. С. 487–491.
10. Бузун Г. Н., Джемухадзе К. М., Милешко Ф. Л. Определение белков в растениях с помощью амидо-черного // *Физиология растений.* 1982. Т. 29. Вып. 1. С. 198–204.
11. Оболенская А. В., Щеголев В. П., Аким Г. Л. Практические работы по химии древесины и целлюлозы. М.: Наука, 1967. 150 с.
12. Филиппович Ю. Б., Егорова Т. А., Севастьянова Г. А. Практикум по общей биохимии. М.: Наука, 1982. 311 с.

Water-soluble Substances of Bud Meristem of *Picea obovata* L. and *Pinus sylvestris* L.: Concentrations, Composition and Properties During the Formation of the State of Low-Temperature Stability

E. V. ALAUDINOVA, S. Yu. SIMKINA, P. V. MIRONOV

State Educational Institution "Siberian State Technological University"
660049, Krasnoyarsk, Mira str., 82
E-mail: simkina_svetlana@mail.ru

The seasonal dynamics of water-soluble substances and water content in the meristematic tissues of vegetative buds of *Picea obovata* L. and *Pinus sylvestris* L. are considered. Changes of the concentrations of cytoplasmic solutions of meristematic cells under their dehydration as a result of extracellular or extra-organ ice formation were determined. It was discovered that the concentration of water-soluble substances of the cytoplasm can increase by a factor of 2–2.5 with a decrease in temperature in the negative range down to -40°C as a result of water crystallization. A connection between the cellular content of water able to get crystallized, unfreezing water and the concentration of water-soluble substances under temperature decrease from 0 to -40°C was established.

Key words: ice formation, water-soluble substances, meristematic tissues of buds, water-retaining capacity, *Picea obovata* L., *Pinus sylvestris* L.