

На правах рукописи

Алаудинова Елена Владимировна

**ЭКОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОЙ
АДАПТАЦИИ ЛЕСООБРАЗУЮЩИХ ХВОЙНЫХ ВИДОВ СИБИРИ:
СТРУКТУРНО-ХИМИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ МЕРИСТЕМ ПОЧЕК**

03.02.08 – экология (биология)

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Красноярск – 2011

Работа выполнена на кафедре химической технологии древесины и биотехнологии в ФГБОУ ВПО «Сибирский государственный технологический университет», г. Красноярск

Научный консультант: доктор химических наук, профессор
Миронов Петр Викторович

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Полонский Вадим Игоревич
доктор биологических наук, профессор
Прокушкин Станислав Григорьевич
доктор биологических наук, старший
научный сотрудник
Чернобровкина Надежда Петровна

Ведущая организация: Сибирский институт физиологии и
биохимии растений СО РАН

Защита диссертации состоится «09» декабря 2011г. в 9.00 часов на заседании диссертационного совета Д 220.037.04 при Красноярском государственном аграрном университете по адресу: 660049, г. Красноярск, проспект Мира, 90.
Тел/факс: 8(391)227-36-09

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ВПО «Красноярский государственный аграрный университет».

Автореферат разослан «12» сентября 2011 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор биологических наук, профессор



Г.А. Демиденко

Актуальность исследования. В Красноярском крае более 80 % лесного фонда (около 61,3 млн га) представлено хвойными бореальными лесами. Составляя основу лесосырьевой базы, эти леса выполняют важнейшие экологические и биосферные функции. В условиях Сибири главным абиотическим фактором, отрицательно влияющим на метаболизм растения, являются зимние температуры. Неслучайно для многих отраслей экономики РФ, несущих потери в холодные годы, актуален вопрос низкотемпературной устойчивости древесных видов. Дополнительную остроту вопросу придают возрастающие в последние годы темпы вырубки лесов не только в Красноярском крае, но и в других регионах Восточной Сибири и на Дальнем Востоке. Проблема приобретает особое природно-экологическое значение, поскольку способность вида адаптироваться к низкотемпературному стрессу в конечном итоге определяет его ареал и возможность интродукции. Для успешной селекционной работы важно развивать фундаментальные исследования ответных реакций морозоустойчивых лесообразующих видов на низкие температуры, выявлять те свойства, которые позволяют им выживать зимой, устанавливать пределы толерантности.

Повышенной чувствительностью к морозам обладают меристематические ткани почек деревьев и кустарников. Очевидно, что структурные и химические превращения в меристемах при действии низких температур в первую очередь направлены на такое изменение содержания и состояния внутриклеточной воды, при котором ее фазовые переходы становятся относительно безопасны (или невозможны). Механизмы низкотемпературного поведения воды в почках хвойных разной морфологии существенно отличаются. У лиственницы, ели, пихты – внеорганическое льдообразование, а у сосны и кедра – внеклеточное (Миронов, 2002). Предполагается, что при этом в меристематических тканях почек происходят и различные структурно-химические трансформации, приводящие к состоянию низкотемпературной устойчивости. В то же время, исследованию природы низкотемпературной устойчивости меристем почек (зачаточных тканей хвои и побегов) наиболее морозостойких представителей растительного мира до сих пор должного внимания не уделялось.

Цель работы. Выяснение закономерностей сезонных структурно-химических изменений меристематических тканей почек лиственницы, ели, пихты, сосны и кедра в экологических условиях Сибири, а также механизмов, объясняющих сохранение жизнеспособности меристем при воздействии низких зимних температур.

Основные задачи:

1 Изучить состав и закономерности сезонной динамики содержания в меристемах водорастворимых веществ цитоплазмы (белков, углеводов, свободных аминокислот), нерастворимых компонентов клеток (комплекса клеточных стенок и мембран), а также липидов и их индивидуальных групп (нейтральных, глико-, фосфолипидов).

2 Выяснить закономерности сезонных структурно-химических изменений клеточных мембран (содержание, фракционный и аминокислотный состав мембранных белков; групповой и жирнокислотный состав мембранных липидов).

3 Установить закономерность изменения водосодержания меристем в ходе годового цикла, особенности распределения воды между водорастворимыми и нерастворимыми компонентами меристематических клеток; оценить водоудерживающие свойства высоко- и низкомолекулярных компонентов цитозоля, нерастворимых ком-

понентов клеток, степень концентрирования внутриклеточных растворов при отрицательных температурах; выяснить первичный механизм, инициирующий повреждения структурно-метаболических систем клеток при замораживании.

4 Оценить криозащитное действие водорастворимых и мембранных белков; установить механизм формирования устойчивого состояния меристематических тканей, объясняющий сохранение их жизнеспособности в зимних условиях.

Защищаемые положения:

1 Экспериментально установленные закономерности изменений в меристемах почек хвойных древесных растений состава и свойств водорастворимых веществ при снижении температуры в осенне-зимний период. У I группы видов (лиственница, ель, пихта) в составе водорастворимых веществ до 30-50 % возрастает содержание высокомолекулярных соединений (белков), у II группы (сосна, кедр) – до 90-94 % увеличивается количество низкомолекулярных соединений.

2 Структурные и химические превращения клеточных мембран в осенне-зимний период и весной. При снижении температуры окружающей среды осенью в мембранах до 70-75 % возрастает доля белков и уменьшается доля липидов. В составе мембранных белков зимой присутствуют высокомолекулярные (ММ > 100 кД) фракции, исчезающие весной; липидный матрикс на 65-80 % сформирован фосфолипидами.

3 Теоретические модели механизмов устойчивости меристем, объясняющие специфику сохранения жизнеспособности двух групп хвойных видов в условиях действия низких отрицательных температур. К ним относятся:

3.1 Механизм, объясняющий стабилизацию мембран при обезвоживании меристематических клеток и льдообразовании, который заключается в формировании твердоупругого белкового "каркаса" при снижении доли липидного матрикса с одновременной его модификацией. Для исследованных видов данный механизм является универсальным;

3.2 Механизм формирования устойчивого состояния клеток у I и II групп хвойных видов, реализующих различные системы криозащиты, обусловленные физико-химическими свойствами высоко- и низкомолекулярных соединений.

Научная новизна. Установлены закономерности сезонных биохимических, физико-химических и структурных изменений в меристематических тканях почек морозоустойчивых лесобразующих древесных видов семейства *Pinaceae*.

У лиственницы, ели и пихты (видов с высоким зимним содержанием водорастворимых белков) выявлено существенное сходство состава мембранных периферических и водорастворимых белков. В составе водорастворимых белков впервые обнаружены пептиды (ММ < 5 кД) с аномально высоким содержанием пролина – до 35 %. Эти белки оказывают криозащитное действие: в зимующих почках слой периферических белков, адсорбированных на поверхности мембран, обладает высокой водоудерживающей способностью и антинуклеационной активностью, обеспечивая возможность переохлаждения цитозоля, сохраняя, тем самым, нативную структуру биологических мембран при низких температурах. У лиственницы, ели и пихты водорастворимые белки, синтезирующиеся в большом количестве весной в набухающих почках, также способствуют переохлаждению внутриклеточной воды.

Обнаружены достоверные видоспецифичные различия суммарного содержания непротеиногенных аминокислот у ели и сосны (существенно отличающихся по ко-

личеству водорастворимого белка в зимующих меристемах). У обоих видов уровень непротеиногенных аминокислот зимой повышен по сравнению с весной вдвое.

Выявлена взаимосвязь между морозоустойчивостью вида и величиной соотношения фосфолипиды/гликолипиды в клеточных мембранах: у лиственницы (самый морозоустойчивый вид) соотношение самое высокое – 7,5/1; у сосны (наименее морозоустойчивый вид) соотношение самое низкое – 2,1/1. Предложена и обоснована гипотетическая схема биосинтеза фосфолипидов в меристемах при формировании состояния низкотемпературной устойчивости. Установлено, что у ели и сосны воздействие низких температур на живые клетки индуцирует экспрессию десатуразных генов, обеспечивающих жидкостные свойства липидного бислоя; у лиственницы сохранение таких свойств контролируется активацией ацил-липидных десатураз и синтезом низкомолекулярных жирных кислот преимущественно с нечетным числом атомов углерода.

Показано, что даже в предельно обезвоженных меристемах вплоть до минус 40 °С остается жидкая фаза в виде высококонцентрированного раствора. При температурах минус 20 °С и ниже всю способную к кристаллизации воду в клетке в основном удерживают низкомолекулярные водорастворимые вещества, обеспечивая защиту клеточных мембран от повреждения кристаллами льда. Концентрация водорастворимых веществ в цитоплазме меристематических клеток при низкотемпературном обезвоживании может возрасти почти в три раза; максимальных значений (65-69 % сухого вещества) концентрация достигает около минус 40 °С, когда способная кристаллизоваться вода уже мигрировала к зонам льдообразования и фазовые переходы воды в клетках становятся невозможны.

Практическая значимость. Исследования влияния низких температур на живые ткани морозоустойчивых хвойных видов в природных и лабораторных условиях имеют важное значение для факториальной экологии и вносят вклад в понимание механизмов взаимодействия древнейших представителей растительного мира с окружающей средой на уровне основных классов биомолекул, клеточных мембран, клеток и тканей. Кроме того, новые данные помогут в решении таких практически значимых современных проблем сельского и лесного хозяйства, как расширение ареалов хозяйственно ценных видов; оценка морозостойкости и возможности интродукции; разработка новых способов повышения устойчивости древесных растений; создание новых методов криоконсервирования генетического материала и генетического конструирования устойчивых к холоду растений. Все это, в конечном итоге, позволит обеспечить защиту экологически и экономически важных для человека растений от губительного влияния абиотических стрессоров и сохранение биоразнообразия бореальных лесов.

Апробация работы. Основные положения диссертации представлялись на конференциях всесоюзных: «Проблемы физиологии и биохимии древесных растений» (Красноярск, 1982); всероссийских: «Химико-лесной комплекс – проблемы и решения» (Красноярск, 2000-2005, 2007-2010), «Проблемы экологии и развития городов» (Красноярск, 2001), «Непрерывное экологическое образование и экологические проблемы Красноярского края» (Красноярск, 2004), «Химия и химическая технология в XXI веке» (Томск, 2006), «Новые достижения в химии и химической технологии растительного сырья» (Барнаул, 2007, 2009), «Дендрэкология и лесоведение» (Красноярск, 2007), «Химия и химическая технология растительного сырья» (Уфа, 2008), «Химия и технология растительных веществ» (Санкт-

Петербург, 2010); международных: «Химико-лесной комплекс – научное и кадровое обеспечение в XXI веке. Проблемы и решения» (Красноярск, 2000); «Экология Южной Сибири и сопредельных территорий» (Абакан, 2003, 2005); «Современная физиология: от молекул до экосистем» (Сыктывкар, 2007), «Физико-химические основы структурно-функциональной организации растений» (Екатеринбург, 2008), «Лесной комплекс и перспективы развития» (Брянск, 2009), International Symposium and Summer School «Nuclear Magnetic Resonance in Condensed Matter. 6th meeting: NMR in Heterogeneous Systems» (Saint Petersburg, Russia, 2009).

Публикации. По теме диссертации опубликовано более 80 научных работ, в том числе 30 статей в изданиях, рекомендованных ВАК РФ, две монографии в соавторстве.

Личный вклад автора. Автором определены цели и задачи исследования, планирование эксперимента и методы, организация лабораторных исследований. Подготовка проб и анализы выполнялись при непосредственном участии или под контролем автора. Автором лично выполнена обработка и обобщение полученных результатов.

Объем и структура работы. Диссертация состоит из введения, 6 глав, выводов, 6 приложений. Библиографический список включает 668 источников. Материал изложен на 462 с., содержит 104 рисунка и 42 таблицы.

Благодарность. Автор выражает искреннюю благодарность научному консультанту д.х.н., профессору П.В. Миронову.

Глава 1. Аналитический обзор

Рассмотрены физико-химические изменения в живых клетках при низких температурах (Levitt, 1962; Туманов, 1979; Sakai, 1982; Guy, 1992; Самыгин, 1994). Изложены современные представления о роли белков, углеводов, свободных аминокислот и липидов при адаптации растений к их действию (Климов, 2001; Войников и др., 2004; Трунова, 2007). Проанализированы сведения по содержанию и составу указанных классов биомолекул в органах и тканях древесных растений, произрастающих в различных экологических условиях (Прокушкин, 1986; Schneider et al., 1996; Чернобровкина, 2001; Ветчинникова, 2004; Макаренко и др., 2006; Судачкова и др., 2008). Сделано заключение, что биохимические показатели зависят от многих факторов, в том числе, от условий внешней среды.

Для хвойных практически вся информация получена при изучении неоднородных по составу и анатомическому строению образцов дерева: хвои, целых почек, побегов, корней, древесины, луба, камбиальной зоны и т.д. (Новицкая, 1978; Родионов, 1983; Kuiper et al., 1984; Каргапольцев, 1987; Sutinen, 1992; Рубчевская, 1997; Veuker et al., 1998; Шуляковская, 2001). По этой причине приводимые в литературе данные не всегда достоверно могут быть отнесены к живым клеткам. В то же время, меристемы почек хвойных древесных растений, при выделении которых удается получить однородные по содержанию однотипных живых клеток образцы, до настоящего времени практически не исследованы. Механизмы, отвечающие за формирование низкотемпературной устойчивости живых тканей наиболее морозостойких видов, изучены недостаточно. Для выяснения последних требуется комплексное исследование сезонных изменений химического состава и физико-химических свойств меристематических тканей почек хвойных видов, произрастающих в одинаковых экологических условиях.

Глава 2. Экспериментальные методы

В работу включены материалы 10-летних (1998-2008 гг.) экспериментальных исследований автора. Объекты исследования: лиственница сибирская (*Larix sibirica* L.), ель сибирская (*Picea obovata* L.), пихта сибирская (*Abies sibirica* L.), сосна обыкновенная (*Pinus sylvestris* L.), кедр (*Pinus sibirica* Rupr. Mayr.). Сбор образцов меристем почек производился в ходе годового цикла (с августа по май) с модельных деревьев II-III класса возраста, произрастающих в одинаковых экологических условиях на постоянных пробных площадях в Среднесибирском подтаежно-лесостепном районе (Мининское лесничество). На основании специальных экспериментов определено минимальное количество деревьев (7 шт.), обеспечивающее достоверность оценок содержания водорастворимых соединений, белков и липидов при 95 %-й доверительной вероятности. В ходе исследований были также использованы различные модельные системы: клеточные стенки (КС) и комплекс клеточных мембран (ККМ), суммарная фракция водорастворимых веществ (ВРВ), фракции водорастворимых и мембранных белков, препараты пластид и хлоропластов. Выделение, подготовка и анализы образцов проводились с помощью известных, принятых в химии древесины, физиологии растений и биохимии, химических и физико-химических методов. Аминокислотный состав белков установлен методом ионообменной хроматографии на автоматическом анализаторе аминокислот ААА-339 М. Состав водорастворимых углеводов исследован методом ГЖХ с применением внутреннего стандарта. Для исследования состояния воды в модельных системах и температурной зависимости изменения теплоемкости в образцах пластид использована дифференциальная сканирующая микрокалориметрия (ДСК); для идентификации фракций липидов – ИКС и ЯМР. Жизнеспособность меристем после замораживания побегов оценивали по отрастанию хвои и состоянию побегов. Томографическое исследование побегов и почек выполнены на ЯМР-микротомографе на базе Bruker ADVANCE DPX 200, изображения получены с помощью методики на основе «спин-эхо». Жирные кислоты (ЖК) анализировались в виде их метиловых эфиров на газожидкостном хроматографе «Agilent Technologies» с масс-селективным детектором, работающим в режиме электронного удара и регистрацией разделенных компонентов по полному ионному току. Колонка кварцевая капиллярная HP-5МС (длина 30 м, диаметр 0,25 мм, толщина слоя пленки фазы 0,33 мкм); начальная температура термостата колонок 150 °С в изотермическом режиме 3 мин, затем температура термостата колонок увеличивалась со скоростью 20 °С/мин; конечная температура термостата колонок 280 °С; газ-носитель – гелий. ЖК идентифицировали по масс-спектрам (библиотека масс-спектров NIST 02.L) и индексам удерживания. Математическая обработка кривых, статистическая обработка данных и построение графиков выполнено в программах Table CurveTM и Excel. В работе приводятся средние арифметические значения трех аналитических повторностей экспериментов. Оценка значимости различий проведена методом сравнения средних значений по критерию Стьюдента при доверительной вероятности $P = 0,95$. На последней странице автореферата приведен список принятых в работе сокращений.

Глава 3. Сезонные изменения основных структурных компонентов меристем

3.1 Сезонные изменения водорастворимых и нерастворимых компонентов меристематических клеток. Осенью при снижении температуры окружающей среды в меристематических клетках наблюдается структурная перестройка: увеличиваются доли ВРВ и ККМ; снижается доля КС (табл. 1). Очередная перестройка клеток

Таблица 1 – Содержание растворимых и нерастворимых компонентов в меристемах в различных фенологических фазах развития почек, в процентах от абсолютно сухой массы (а.с.м.) ткани

Вид		Лиственница	Ель	Пихта	Сосна	Кедр
Формирующиеся почки (август)	ВРВ	37,8	37,1	36,2	32,0	31,0
	КМ	19,2	16,0	16,1	23,0	25,0
	КС	43,0	46,9	47,7	45,0	44,0
Зимующие почки (январь)	ВРВ	52,0	59,0	56,0	45,0	43,0
	КМ	33,5	30,0	33,5	38,5	37,0
	КС	14,5	11,0	10,5	16,5	20,0
Набухающие почки (апрель)	ВРВ	54,1	63,9	61,2	49,3	43,4
	КМ	21,9	23,0	23,8	24,2	22,7
	КС	24,0	13,1	15,0	26,5	33,9
Распускающиеся почки (май)	ВРВ	40,8	44,7	42,6	35,8	34,7
	КМ	25,2	26,7	24,5	26,0	26,1
	КС	33,8	28,3	32,9	38,0	39,2

(изменение содержания растворимых и нерастворимых компонентов) начинается в начале марта. Существование весеннего максимума содержания ВРВ объясняется необходимостью дополнительной защиты клеток при возросшем содержании воды (рис. 1).

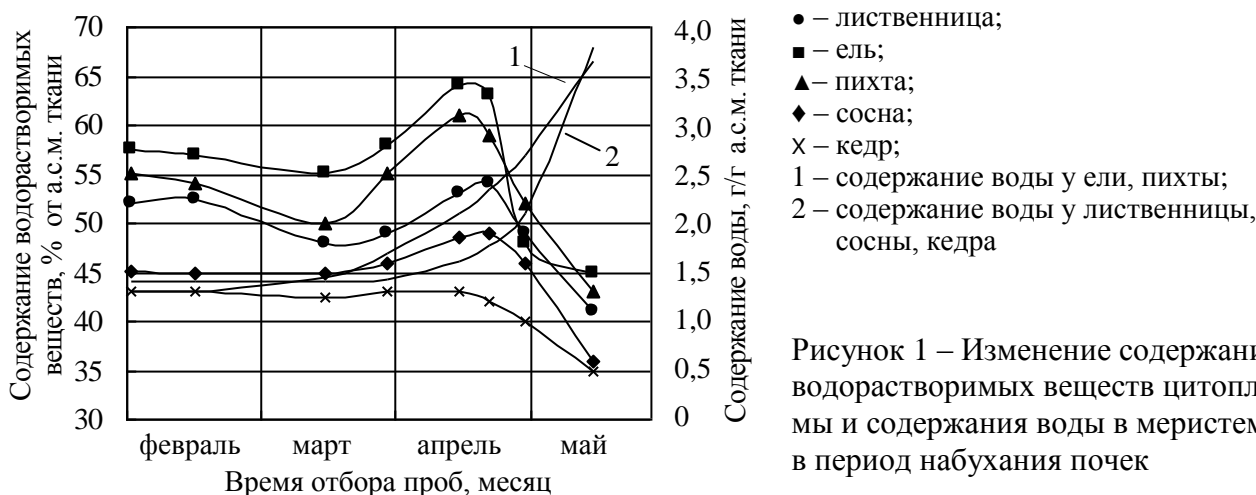


Рисунок 1 – Изменение содержания водорастворимых веществ цитоплазмы и содержания воды в меристемах в период набухания почек

3.2 Водорастворимые вещества цитоплазмы: особенности сезонного изменения состава и содержания. У всех видов ВРВ на 80-90 % состоят из водорастворимых белков цитоплазмы (ВРБЦ), свободных аминокислот (СА) и водорастворимых углеводов (ВУ); в меньшем количестве – из органических кислот, фенольных соединений и др. Для лиственницы, ели и пихты (I группа) осенью и зимой характерно повышение содержания ВРБЦ: до 28-30 % – у ели и пихты и до 17-18 % – у лиственницы (рис. 2). У сосны и кедр (II группа) в осенний период невысокое содержание ВРБЦ,

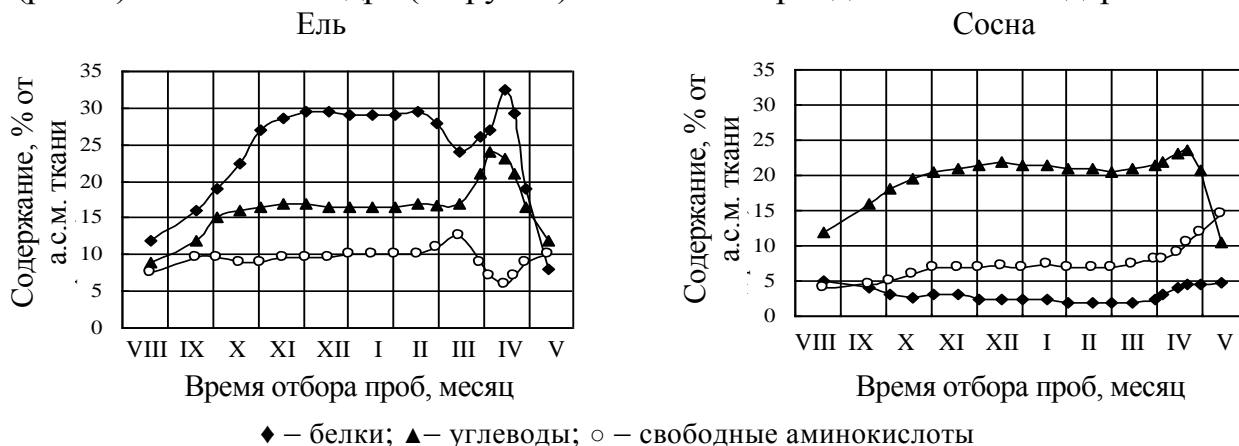


Рисунок 2 – Сезонная динамика содержания основных групп водорастворимых веществ

типичное для меристем формирующихся почек, снижалось вдвое. В результате зимой уровень белков не превышал 2,5-3 %. Осенью у всех хвойных в меристемах увеличивалось содержание низкомолекулярных водорастворимых соединений: у кедра и сосны – до 40-42 %, лиственницы – до 36 %, ели и пихты – до 29-30 %. Содержание ВУ + СА в зимних условиях было близко – 27-30 %. Характеристика состава ВРВ с помощью соотношения высоко- (ВМС) и низкомолекулярных соединений (НМС) позволяет расположить виды в порядке его убывания: ель, пихта, лиственница, кедр, сосна. Самый морозоустойчивый вид (лиственница) занимает промежуточное положение. Вероятно, для обеспечения надежной криозащиты существующее в цитозоле меристематических клеток лиственницы соотношение ВМС/НМС является оптимальным, поскольку только у этого вида реализован дополнительный защитный механизм (сбрасывание хвои). Весной у нее распускается во много раз больше вегетативных почек, благодаря чему в суровую зиму повреждение морозом части почек не способно нанести ей столь существенного ущерба, как зимнезеленым видам. Следовательно, у морозоустойчивых хвойных видов при низких отрицательных температурах реализуются различные системы криозащиты, связанные с физико-химическими свойствами высоко- и низкомолекулярных водорастворимых соединений.

3.2.1 *Моно- и олигосахариды.* У всех видов выявлены сходные сезонные изменения ВУ (рис. 3). Осенью при снижении температуры количество олигосахаридов снижалось, моносахаридов – увеличивалось. В содержании олигосахаридов наблюдалось два

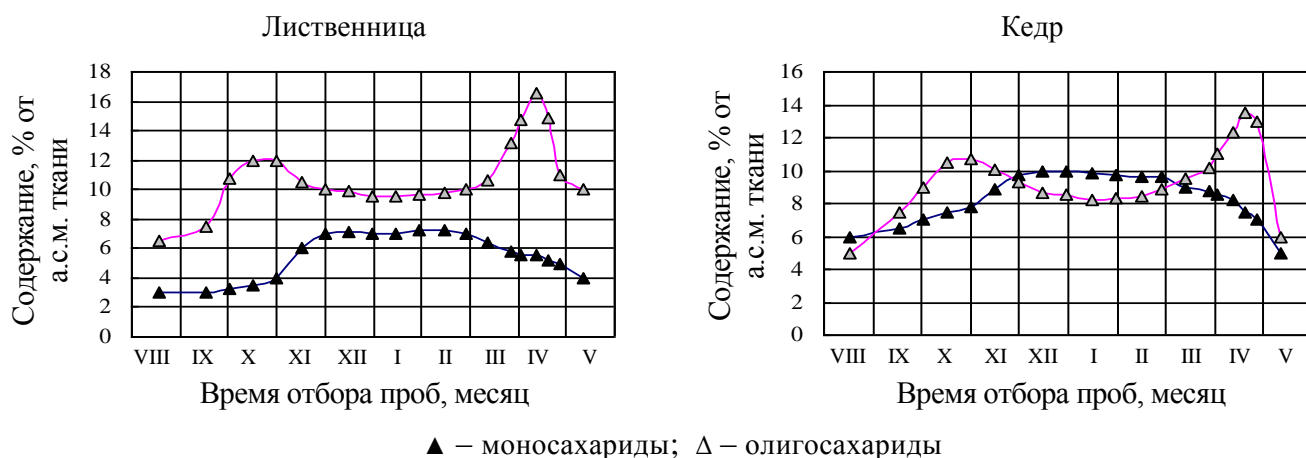


Рисунок 3 – Сезонная динамика содержания моно- и олигосахаридов

максимума (осенний и весенний). Меристемы почек – гетеротрофная ткань, метаболизм которой связан с поступлением углеводов извне. Основная транспортная форма углеводов – сахароза. В начале осени олигосахариды, высвобождаясь из синтеза древесной биомассы, активно поступают в сформированные почки из других органов и тканей. В дальнейшем часть этих соединений превращается в моносахариды, о чем свидетельствует обратная зависимость между их содержанием с конца октября до начала апреля. Весенний максимум олигосахаридов, вероятно, обеспечен притоком сахарозы к набухающим почкам в основном из луба (запасяющей ткани).

Зимой фонд моносахаридов у всех видов почти на 96-98 % представлен фруктозой, глюкозой и галактозой (табл. 2). Весной в обменные процессы активно вовлекались все монозы. Только у кедра сохранялось зимнее содержание свободной

Таблица 2 – Состав моно- и олигосахаридов, в процентах от абсолютно сухой массы ткани

Месяц	Арабиноза		Ксилоза		Фруктоза		Манноза		Галактоза		Глюкоза	
	моно-	олиго-	моно-	олиго-	моно-	олиго-	моно-	олиго-	моно-	олиго-	моно-	олиго-
Лиственница												
Январь	0,13	0,41	0,07	0,29	5,21	6,37	0,26	0,47	0,60	1,18	1,03	0,98
Май	-	0,52	-	0,28	3,52	4,21	-	0,43	0,26	0,52	0,22	4,04
Ель												
Январь	0,12	0,11	0,09	0,19	6,18	6,41	0,06	0,15	0,60	1,18	0,78	0,95
Май	-	0,10	-	0,16	4,68	2,95	-	0,14	0,26	0,52	0,35	2,23
Пихта												
Январь	0,08	0,22	0,32	0,16	6,07	1,73	0,22	0,41	0,67	0,92	1,64	1,06
Май	-	0,29	0,16	0,26	4,11	2,39	0,16	0,16	0,05	0,79	0,52	2,11
Сосна												
Январь	0,10	0,16	-	0,11	6,54	6,44	0,04	0,12	2,70	1,33	2,62	1,34
Май	0,08	0,16	0,03	0,17	3,52	3,04	-	0,21	1,01	0,73	0,43	1,76
Кедр												
Январь	0,11	0,07	0,15	0,04	4,81	4,41	0,08	0,37	2,22	1,55	2,33	1,86
Май	-	0,17	-	0,23	4,26	2,90	-	0,18	0,09	0,89	0,65	1,63

фруктозы. Состав моносахаридов в структуре олигосахаридов зимой подобен составу свободных моносахаридов: накапливались фруктозо- и галактозосодержащие соединения (табл. 2). Весной соотношение глюкоза/галактоза у всех видов возрастало, т.е. количество фруктозо- и галактозосодержащих олигосахаридов снижалось. У лиственницы, ели и пихты уровень глюкозы становился практически равным содержанию фруктозы, что говорит о преобладании в составе олигосахаридов сахарозы.

Чем сложнее состав раствора, тем меньше вероятность кристаллизации, выделения твердой фазы растворенного вещества и, напротив, выше вероятность витрификации (перехода в стеклообразное состояние концентрированного внутриклеточного раствора) при снижении температуры в отрицательной области. При переходе цитоплазмы в стеклообразное состояние клеточные структуры фиксируются и становятся нечувствительными к низкотемпературному воздействию. В меристематических клетках возможность такого перехода обеспечивается в том числе высокой концентрацией моно- и олигосахаридов, их многокомпонентным составом.

3.2.2 *Водорастворимые белки цитоплазмы.* В зимний период у всех видов наблюдалось закономерное накопление ВРБЦ с ММ > 100 кД (рис. 4). У I группы видов

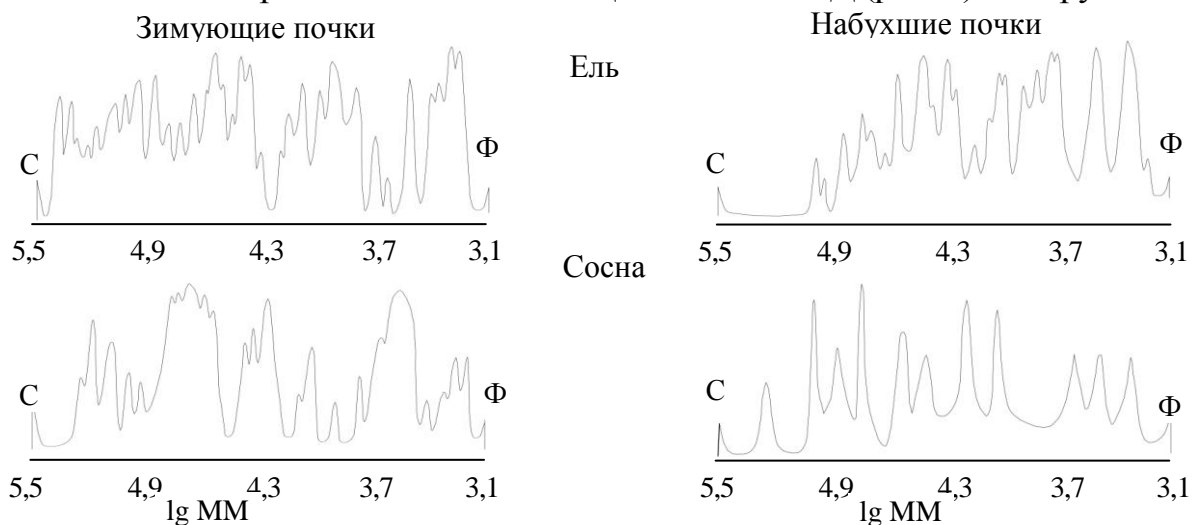


Рисунок 4 – Денситограммы водорастворимых белков (январь и апрель)

присутствовали белки с ММ 250-180 кД; у II группы – с ММ 175-165 кД. У лиственницы, ели и пихты аккумуляровалось от 17 до 26 % фракций с ММ > 100 кД. У сосны и кедра доля таких фракций составляла 12-13 %, однако их содержание в меристемах было на порядок ниже, чем у I группы. Весенние изменения ВРБЦ у всех видов аналогичны: белки с ММ > 100 кД исчезали, одновременно у I группы примерно вдвое увеличивалось количество белка в пептидах (ММ < 5 кД), у II группы – во фракциях с 100 кД > ММ > 5 кД. Вероятно, высокомолекулярные фракции белков играют важную роль в низкотемпературной адаптации I группы. Доля этих фракций и средняя молекулярная масса (определенная с учетом массовых долей индивидуальных фракций) хорошо согласуются с морозоустойчивостью вида: у наиболее морозоустойчивой лиственницы содержится наибольшее количество белка с ММ > 100 кД – 26 %, его средняя ММ – 163 кД; у ели – 19 % и 160 кД; у пихты – 17 % и 160 кД.

Физико-химические свойства и биологическая роль белковых молекул во многом определяются их аминокислотным составом. На примере ели и сосны (видов с максимальным и минимальным содержанием ВРБЦ) исследован аминокислотный состав белков (рис. 5). Особенностью белков ели зимой являлось значительное содержание

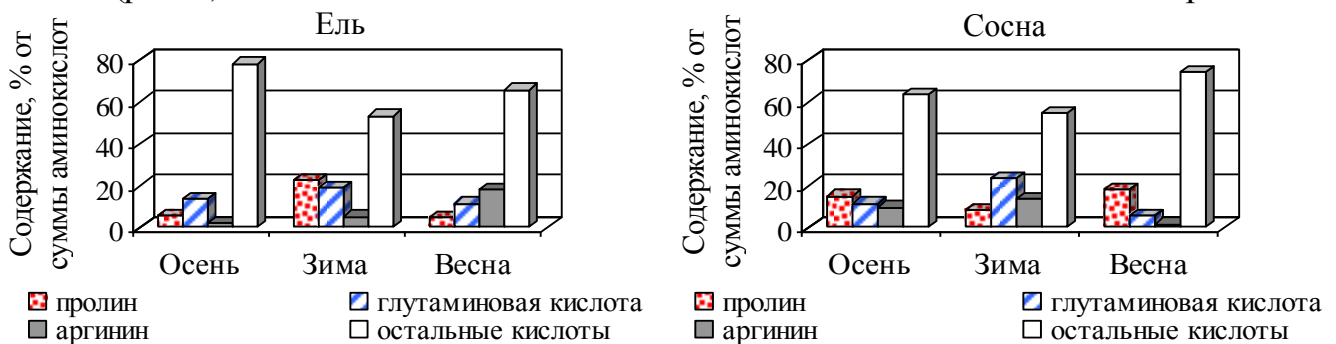


Рисунок 5 – Сезонные изменения содержания глутаминовой кислоты, аргинина, пролина

пролина – около 23 %. Белки сосны аккумуляровали аргинин (около 16 %) и были более гидрофильны, чем белки ели. В то же время, динамику гидрофобных аминокислот у ели в основном определял пролин, поэтому белки также оставались высокогидрофильными и водорастворимыми. Весной у ели накапливался аргинин и уменьшалась доля пролина; у сосны, наоборот, в период максимального содержания белков (рис. 2) аккумуляровался пролин и уменьшалась доля аргинина. Снижение доли глутаминовой кислоты весной может быть связано с ее участием в образовании аланина (в качестве донора аминокислот), уровень которого пропорционально возрастал.

Немаловажно (особенно для видов, имеющих зимой высокое содержание ВРБЦ) каким образом распределяются аминокислоты по фракциям белков с различными ММ. Методом препаративной колоночной гель-хроматографии ВРБЦ были разделены на пять групп: ММ > 100 кД; 100 кД > ММ > 50 кД; 50 кД > ММ > 17 кД; 17 кД > ММ > 5 кД; ММ < 5 кД. Аминокислотный состав четырех групп белков был типичным для растений. У видов I группы особенностью пептидов (ММ < 5 кД) являлось необычайно высокое содержание пролина – 32-35 % от суммы аминокислот, а также тирозина – 14-19 % (рис. 6). У видов II группы существенно отличалась низкомолекулярная группа 17 кД > ММ > 5 кД. Как и пептиды, она была богата пролином – 8-9 %, но особенно – тирозином – 30-35 %. При этом соотношение количества пролина и тирозина было противоположно таковому у видов I группы. Высокое содержание пролина

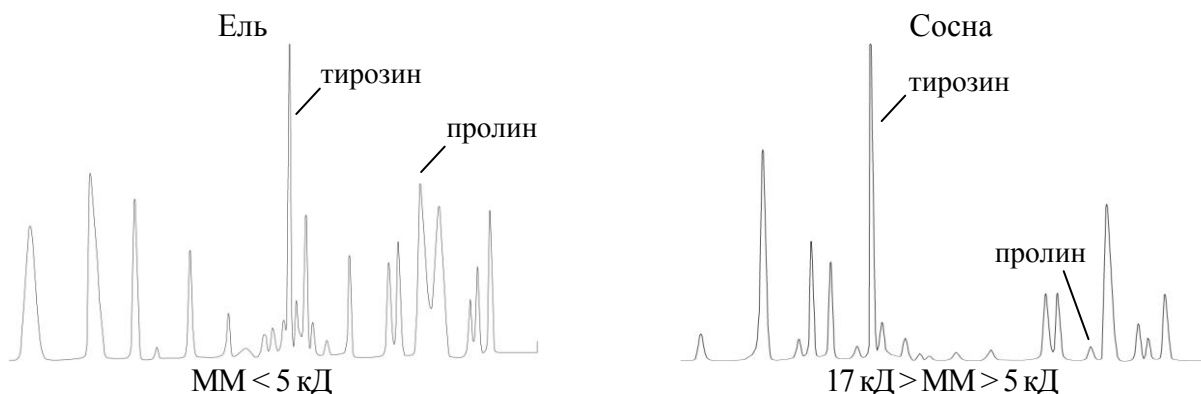


Рисунок 6 – Хроматограммы гидролизатов водорастворимых белков

обеспечивает высокую растворимость белковых молекул в воде. Повышенное содержание тирозина, вероятно, объясняется тем, что при отсутствии конкуренции в зимний период между белком и лигнином за использование гидрофобного фенилаланина, из него образуется гидрофильный тирозин. Можно предположить, что у видов I группы роль высоко- и среднемолекулярных ВРБЦ, являющихся высокогидрофильными, заключается в обеспечении переохлаждения внутриклеточного раствора. Низкомолекулярные белки с высоким содержанием пролина, наряду с функцией переохлаждения, вероятно, участвуют в формировании твердоупругого белкового "каркаса" клеточных мембран. У сосны и кедра низкий уровень ВРБЦ зимой не дает им оказывать существенное влияние на переохлаждение внутриклеточного раствора и выполнять криозащитные функции в отношении мембран, но высокая гидрофильность белков обеспечивает их растворимость в условиях внеклеточного льдообразования и сильного концентрирования внутриклеточного раствора.

3.2.3 *Свободные аминокислоты.* Зимой запас азота в составе СА у ели и сосны находился в основном в виде глицина, аргинина и орнитина (рис. 7). Кроме того, у сосны

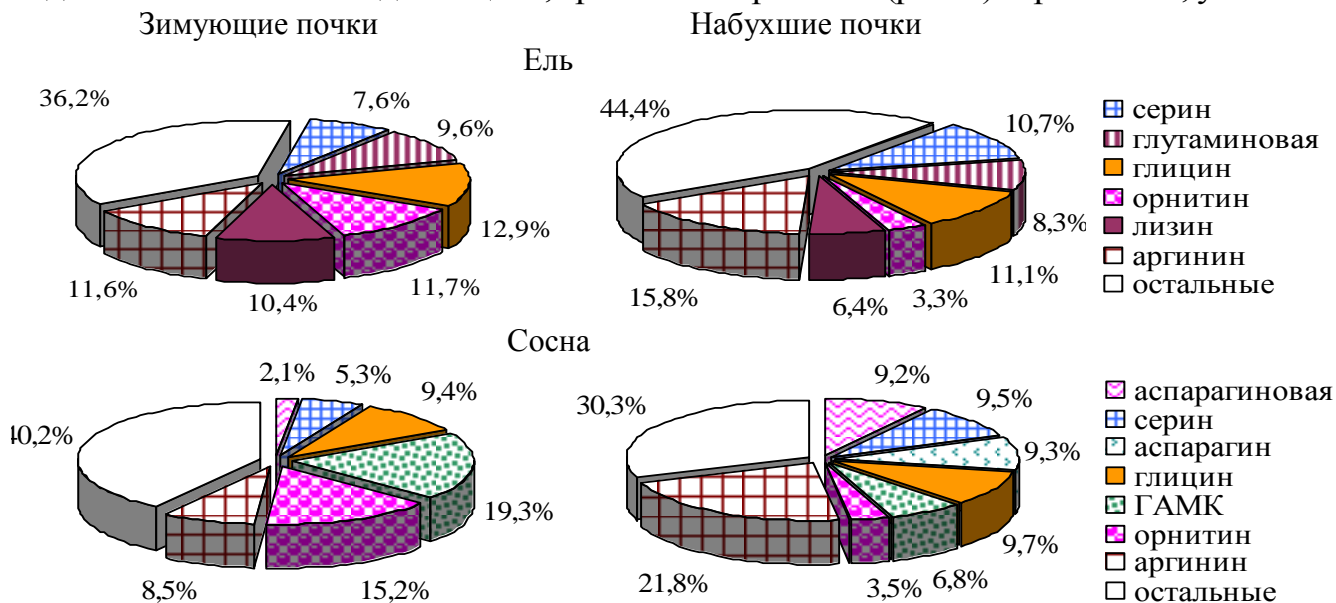


Рисунок 7 – Доминирующие свободные аминокислоты зимующих и набухших почек

значимую роль в резервировании азота играла γ -аминомасляная кислота (ГАМК) – 19,3 %, у ели – лизин и глутаминовая кислота – около 10 %. Содержание пролина (с ним обычно связывают низкотемпературную устойчивость) невысокое – 0,04-0,34 %. Весной у обоих видов доля аргинина и пролина возростала, а орнитина и ГАМК –

резко снижалась. В тоже время, для сосны характерно высокое содержание аспарагиновой кислоты + аспарагина – 19 %; у ели повышено содержание СА с короткой углеродной цепью – серина + глицина – 22 %. В качестве надежного стрессового метаболита у ели и сосны можно рассматривать орнитин, содержание которого зимой в 3-5 раз выше, чем весной. В зимующих почках вдвое по сравнению с весной повышен уровень непротеиногенных аминокислот, при этом ель и сосна обнаруживали достоверные видоспецифичные различия как по суммарному содержанию непротеиногенных аминокислот (у сосны содержание вдвое выше, чем у ели), так и по количественному соотношению их индивидуальных компонентов.

Глава 4. Сезонные изменения липидов

В ходе трехлетних исследований (2004-2007 гг.) выявлены существенные сезонные различия метаболизма липидов. Для лиственницы и ели характерна однотипная динамика липидов (рис. 8). У сосны содержание липидов самое высокое (в зимний период разница с лиственницей достигает 30-35 %, с елью – 43-45 % от суммы липидов). В составе липидов преобладают полярные фракции (рис. 9). Годичная динамика содержания глико- (ГЛ) и фосфолипидов (ФЛ) противоположна: в осенне-зимний период доминируют ФЛ, весной возрастает содержание ГЛ (отношение ГЛ/ФЛ приближается к единице).

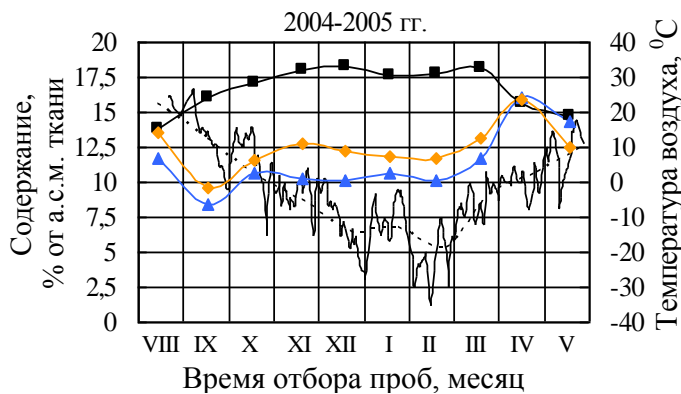


Рисунок 8 – Сезонная динамика липидов лиственницы (♦), ели (▲) и сосны (■)

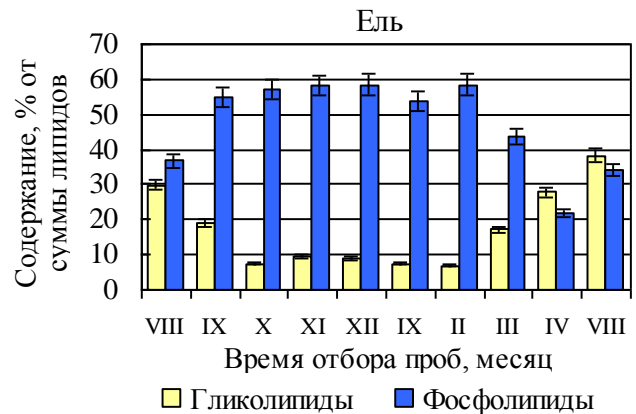


Рисунок 9 – Сезонная динамика полярных липидов

Осенью в составе НЛ преимущественно синтезируются стеринны, изменяющие проницаемость клеточных мембран, и свободные жирные кислоты, являющиеся частью антиоксидантной системы клетки. У сосны обнаружено вдвое больше воскообразных веществ, что связано с особенностью морфологии почек, обуславливающей возможность льдообразования между хвойными зачатками и необходимостью их дополнительной защиты от повреждения кристаллами льда. В то же время в составе ГЛ снижается содержание хлоропластных липидов: СХДГ и МГДГ; возрастает соотношение ДГДГ/МГДГ. У сосны в зимний период содержание гликозидов стериннов втрое больше, чем у лиственницы и ели. Интенсивный синтез ФЛ в меристемах осенью (ввиду отсутствия фотосинтеза у лиственницы и значительного снижения его продуктивности у других хвойных) происходит, по-видимому, за счет питательных веществ, поступающих из луба, а также глицеридов (sn-1,2-диацилглицеролов) меристем, уровень которых в осенне-зимний период снижается. У лиственницы и ели осенью увеличивается содержание ФХ, ФЭ и ФС, снижается – ФГ, исчезает ФИ; у сосны увеличивается содержание всех без исключения групп ФЛ.

Глава 5. Клеточные мембраны: сезонные структурно-химические изменения

Представления об изменениях мембран при низких температурах включают утверждение о том, что в них увеличивается содержание липидов, а белков снижается. Однако мембраны, состоящие преимущественно из липидного материала, характеризуются очень низкой устойчивостью к действию повреждающих факторов (например, мембраны эритроцитов). В этой связи механизмы криорезистентности биомембран не совсем ясны.

Поскольку при воздействии внешних факторов клеточные органеллы отвечают комплексом общих неспецифических изменений, для изучения сезонных изменений биомембран, а также состава мембранных белков и липидов, использована модельная система – комплекс клеточных мембран (ККМ), выделенная из меристем методом дифференциального центрифугирования. Увеличение количества мембранных структур в клетках зимой

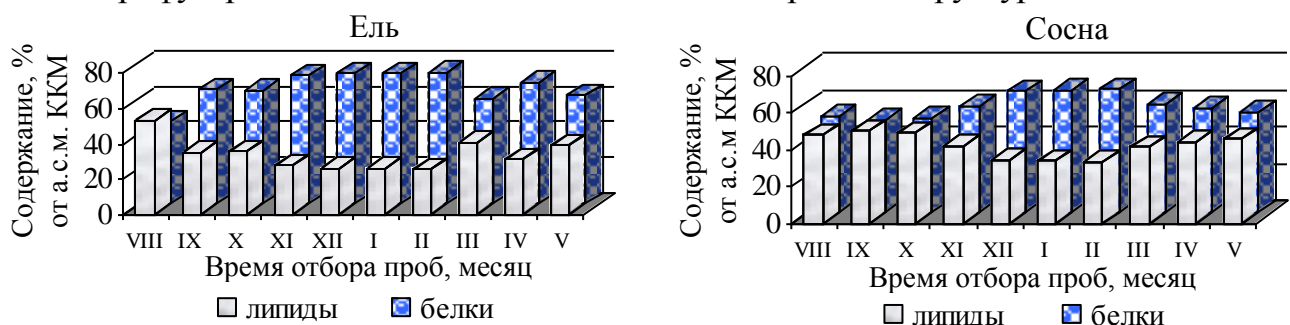


Рисунок 10 – Сезонная динамика содержания липидов и белков в комплексе клеточных

при относительно стабильном уровне мембранных липидов приводило к тому, что доля липидов в мембранах снижалась, несмотря на то, что в это время наблюдался синтез ФЛ. Одновременно существенно возрастала доля белков, т.е. при снижении температуры липидный матрикс мембран частично замещался структурными белками. Зимой соотношение белок/липид по сравнению с августом увеличивалось в 2-3,5 раза, составляя в итоге: у кедрa и сосны примерно 2/1; у лиственницы, ели, пихты – 3-3,5/1.

5.1 Мембранные белки. Мембранные белки подразделяли на интегральные (ИБ) и периферические (ПБ). На рис. 11 представлена сезонная динамика ИБ и ПБ пихты и

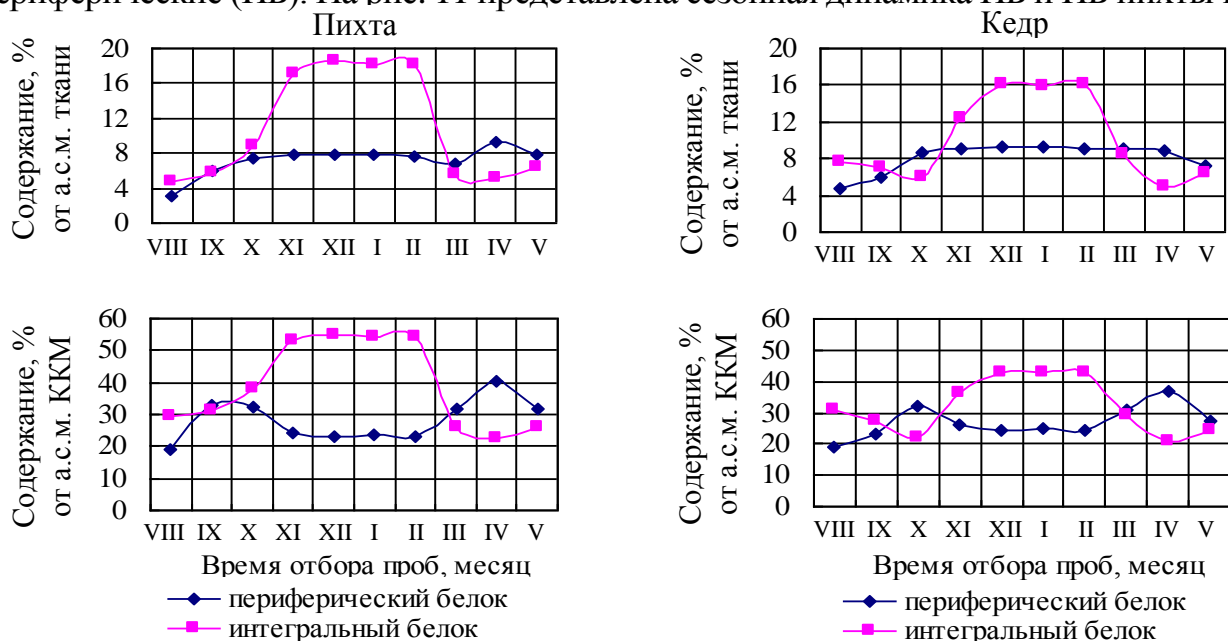


Рисунок 11 – Сезонная динамика содержания периферических и интегральных белков кедрa, у остальных видов динамика аналогична. Рост содержания мембранного белка в меристемах начинался в августе и заканчивался к концу ноября. Содержание ПБ

достигало максимума во второй половине октября – 7-9 %. С этого момента начинался быстрый синтез ИБ; к концу ноября их количество составляло около 16 %. Снижение содержания ИБ у всех видов было отмечено еще в зимних условиях. На две недели позже у лиственницы, ели и пихты наблюдалось небольшое снижение содержания ПБ – на 8-10 % от зимнего уровня, но в апреле следовал быстрый рост их количества (весенний пик). У кедра и сосны весеннего увеличения количества ПБ не наблюдалось, а зимнее содержание сохранялось почти до середины апреля.

Иная картина динамики ПБ наблюдалась при отнесении их содержания к сухой массе ККМ: содержание ПБ в мембранах в конце осени снижалось на 8-10 %. Вероятно, увеличение массовой доли ККМ в клетках осенью объясняется не только синтезом ИБ в уже существующих мембранах (синтез ИБ обеспечивает примерно 60 % прироста массы ККМ), но и синтезом новых мембранных структур. Поскольку содержание ПБ (в расчете на а.с.м. ткани) в этот период времени было относительно стабильно, находит объяснение соответствующее данному периоду снижение доли ПБ в мембранах. Предполагается: во-первых, что у морозостойких хвойных в меристематических клетках реализуются сходные механизмы криозащиты биомембран; во-вторых, что ИБ и ПБ (наряду с липидным матриксом) играют важную роль в формировании криорезистентности мембран и клеток.

Электрофоретическое исследование мембранных белков показало присутствие в их составе от 26 до 31 фракции (рис. 12). В составе ИБ у ели и пихты зимой обнару-

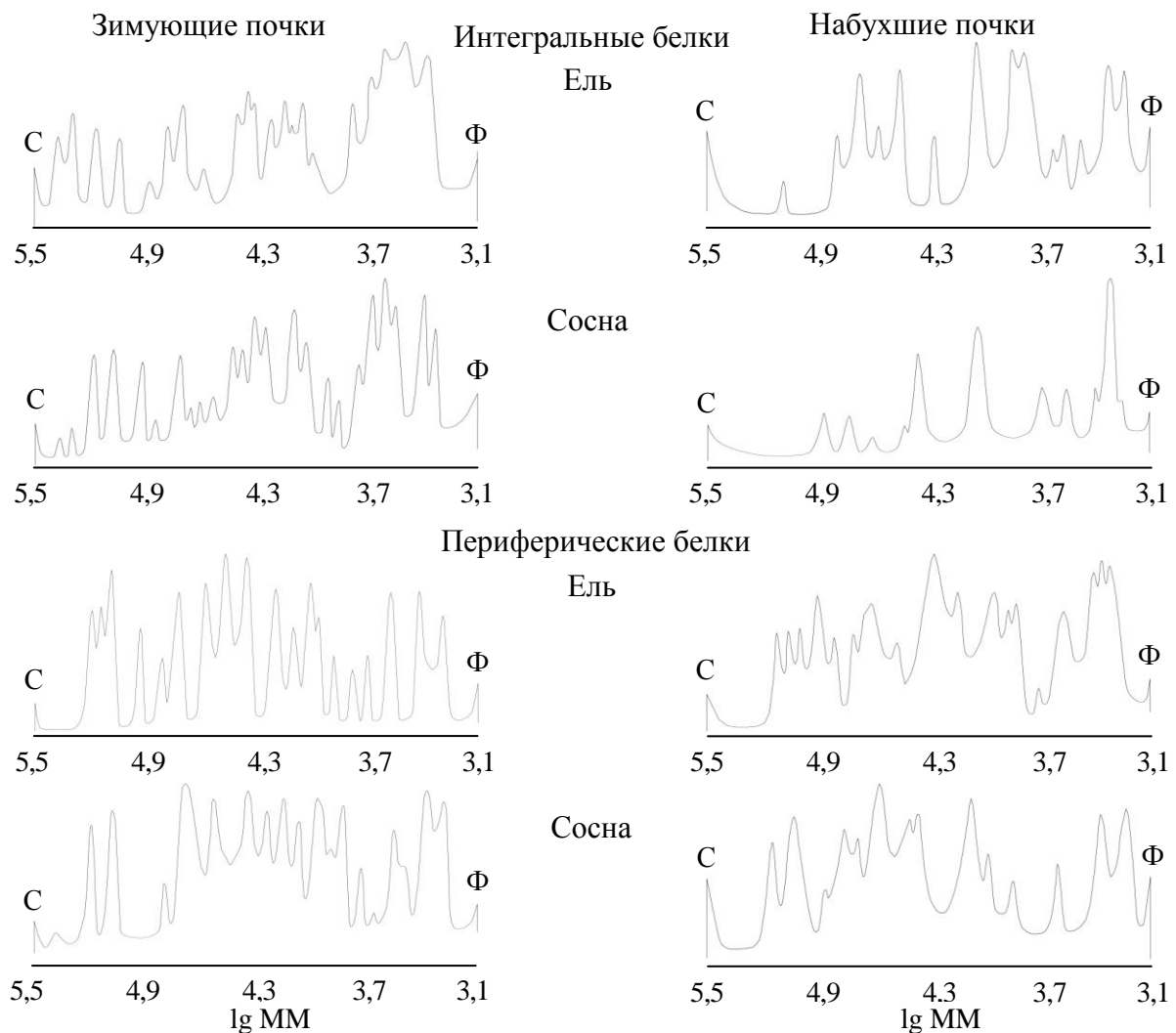


Рисунок 12 – Денситограммы интегрального и периферического белка

жено по 18 фракций, у сосны и кедра – по 16 фракций с одинаковой ММ. У лиственницы в составе фракций с ММ > 100 кД имелись белки, присутствовавшие только у ели и пихты; состав средне- и низкомолекулярных был близок таковому кедра и сосны. Среди ИБ у всех исследованных видов присутствовали шесть идентичных по ММ фракций: 24, 21, 19, 15, 5.2 и 4.2 кД. Их доля в составе ИБ от 23 до 34 %.

В составе ПБ у лиственницы, ели и пихты зимой выявлено только три идентичные по молекулярной массе фракции; у сосны и кедра – восемь. Важно отметить, что у лиственницы, ели и пихты электрофоретические спектры ПБ имели значительное сходство со спектрами ВРБЦ (рис. 4). У лиственницы в составе ПБ присутствовали 13 фракций идентичных с ВРБЦ, их доля составляла 68 % от суммы ПБ. Из них пептиды – 34 %, а фракции с ММ > 100 кД – только 7 %. У пихты подобных фракций было 11, доля в составе ПБ – 53 %, из них пептиды – 36 %, фракции с ММ > 100 кД – 17 %. У ели 13 одинаковых фракций аккумулялировали до 73 % ПБ. Фракции с ММ < 17 кД включали около 41 % от общего количества идентичных белков, 18 % – пептиды, 10 % – фракции с ММ > 100 кД. Столь значительное совпадение позволяет предположить, что, по крайней мере, часть периферических белков – это водорастворимые, адсорбированные на поверхности клеточных мембран (дополнительным аргументом является высокое содержание ВРБЦ у видов этой группы в зимний период). У сосны и кедра электрофоретические спектры ПБ и ВРБЦ подобного сходства не имели, что также хорошо согласуется с низким содержанием ВРБЦ зимой.

Весной во фракционном составе мембранных белков наблюдались сходные изменения, связанные с полным исчезновением или снижением до минимума содержания высокомолекулярных фракций; уменьшением числа средне- и низкомолекулярных фракций; увеличением доли белка, аккумулялируемого во фракциях с ММ < 5 кД.

Сравнительный анализ сезонных изменений состава мембранных белков пяти исследованных видов позволил установить закономерность присутствия в зимний период высокомолекулярных фракций белков с ММ > 100 кД (в составе ИБ – 13-22 %; ПБ – 10-14 %). Выявлена тесная взаимосвязь между количеством высокомолекулярных интегральных белков в мембранах и морозоустойчивостью. По морозоустойчивости виды образуют следующий убывающий ряд: лиственница, кедр, ель, пихта, сосна (Хлебникова и др., 1963). В определенных условиях обитания морозоустойчивость вида проявляется в его распространении в высоких широтах и в самой северной точке ареала. В Красноярском крае лиственница доходит до 72°31' с.ш. (бассейн реки Хатанги). Северная граница ареалов других хвойных проходит значительно южнее: у кедра – 68° с.ш., ели – 63° с.ш., сосны – 62° с.ш., пихты – 60° с.ш. Максимальное количество ИБ с ММ > 100 кД присутствовало в меристемах лиственницы – 3,8 % от а.с.м. ткани, минимальное – в меристемах сосны – 2,1 %. Белковая часть клеточных мембран лиственницы примерно на 11 % сформирована высокомолекулярными ИБ, сосны – на 5,5 %. Кедр, ель, пихта занимают промежуточное положение, аккумулялируя в белковой части мембран около 9 % таких белков.

Для периферических белков прямая взаимосвязь между содержанием высокомолекулярных фракций и морозоустойчивостью вида не обнаружена. Для этих белков характерна видоспецифичность: число высокомолекулярных фракций, молекулярные массы, доля белка во фракциях существенно варьируют. Но средняя ММ высокомолекулярных ПБ, определенная с учетом доли индивидуальных фракций, также согла-

суется с морозоустойчивостью: у лиственницы – 160 кД, кедра – 149 кД, ели, пихты и сосны – 131 кД, что вполне согласуется с морозоустойчивостью видов.

Результаты исследования сезонной динамики фракционного состава позволяют предположить протекторные функции 9-ти высокомолекулярных интегральных белков – ММ 240, 210, 180, 175, 148, 140, 115, 107, 102 кД и 8-ми высокомолекулярных периферических белков – ММ 240, 180, 175, 165, 148, 140, 135, 115 кД. Связать их накопление в мембранах в зимний период с высокой морозоустойчивостью хвойных видов.

Для характеристики мембранных белков зимующих меристем был исследован их аминокислотный состав (рис. 13). У сосны в составе мембранных белков повышено (по сравнению с другими видами) содержание аргинина, понижено – пролина.

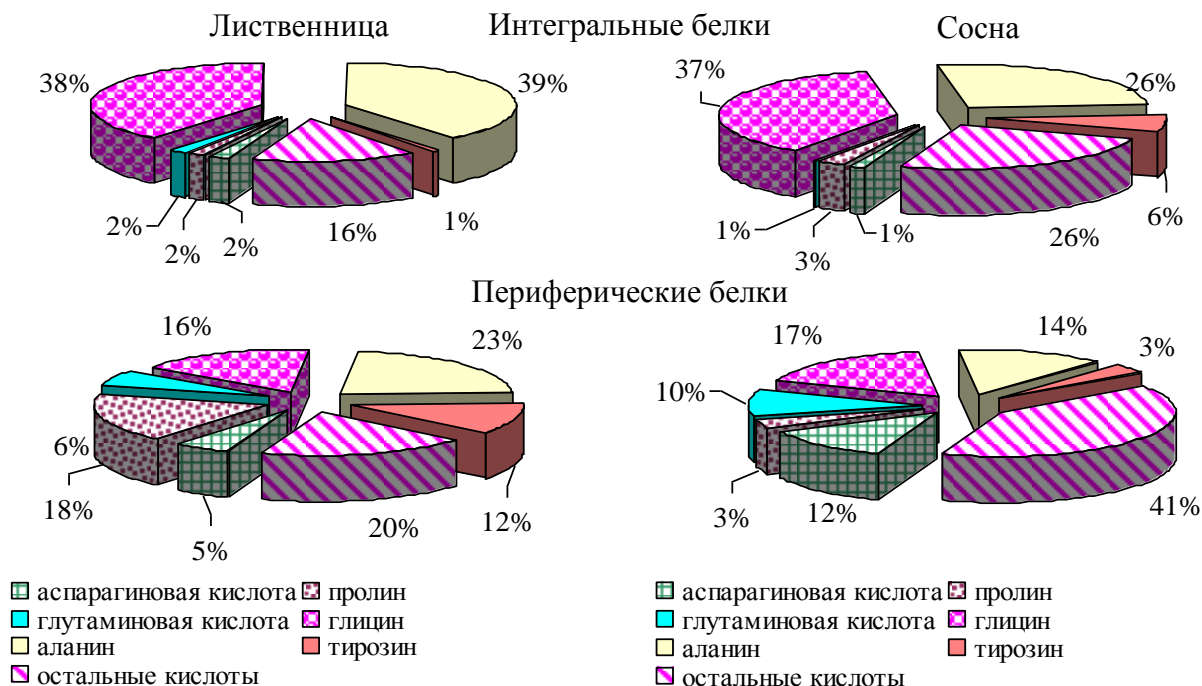


Рисунок 13 – Аминокислотный состав интегральных и периферических белков

У лиственницы, ели и сосны ИБ богаты глицином и аланином. В составе ПБ лиственницы и сосны также доминировали глицин и аланин, у ели их содержание примерно вдвое ниже. У лиственницы и ели (в отличие от сосны) аминокислотные составы ПБ и водорастворимых пептидов (как и их фракционные составы) очень похожи: ПБ аккумулировали много пролина и мало аргинина. Кроме того, у ели и лиственницы значительно повышен уровень тирозина.

5.2 Мембранные липиды. Липидный матрикс клеточных мембран на 95-97 % представлен полярными липидами (рис. 14). Осенью (на фоне снижения в мембранах

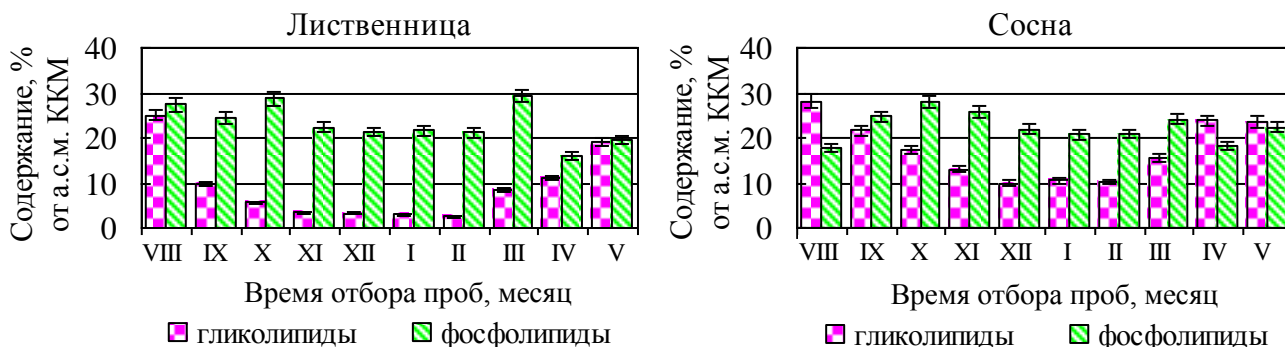


Рисунок 14 – Сезонная динамика содержания глико- и фосфолипидов в клеточных мембранах

до минимума содержания обеих групп полярных липидов) в составе липидного матрикса в 1,6-1,8 раза увеличивается доля ФЛ. Установлена тесная взаимосвязь между морозоустойчивостью вида и величиной соотношения ФЛ/ГЛ в клеточных мембранах: у лиственницы – 7,5/1; пихты – 7,0/1; ели – 6,8/1; кедра – 3,9/1; сосны – 2,1/1.

В составе ГЛ зимой повышено содержание диеновых ЖК (рис. 15). Наибольшей степенью ненасыщенности выделялись ГЛ сосны (К - 2,40; ИДС - 1,64). У всех видов на мем-

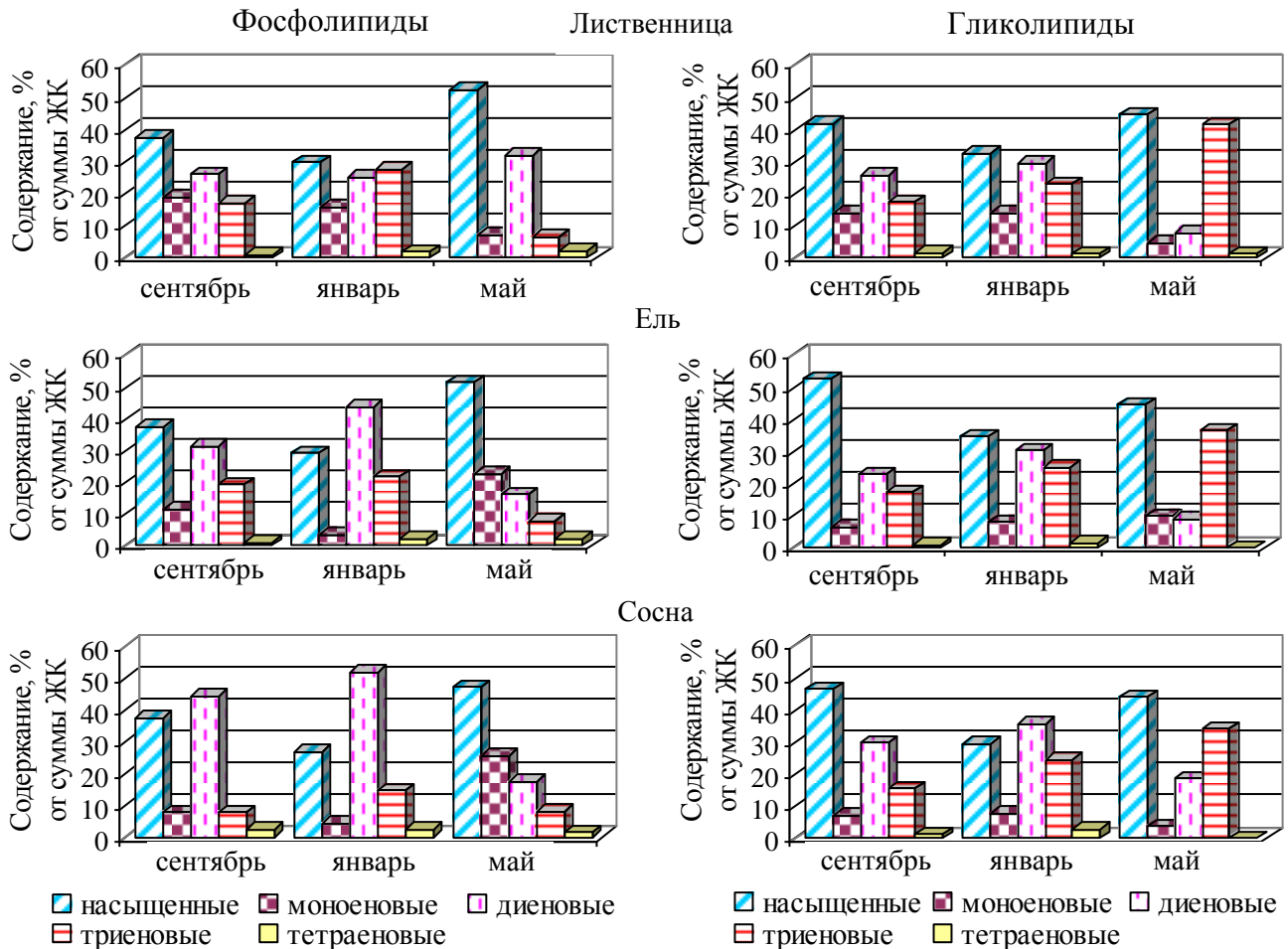


Рисунок 15 – Содержание жирных кислот в составе фосфо- и гликолипидов

бренные механизмы криорезистентности, регулирующие жирнокислотный состав ГЛ, существенное влияние оказывает ω6-ацил-липидная-десатураза, ответственная за синтез линолевой кислоты. Сравнение величин олеил- (ORD – 0,89-0,91) и линолеил- (LRD – 0,38-0,46) десатуразных отношений показало, что в зимний период ω6-ацил-липидная десатураза катализирует введение второй двойной связи в олеиновую кислоту вдвое интенсивнее, чем ω3-ацил-липидная десатураза введение третьей двойной связи в линолевою. Весной экспрессия генов ω3-ацил-липидной десатуразы вызывает увеличение скорости введения третьей двойной связи в линолевою кислоту – LRD увеличиваются вдвое и ГЛ, синтезирующиеся *de novo* при формировании фотосинтетического аппарата молодой хвои, аккумулируют линоленовую кислоту.

Зимой в составе ФЛ повышено содержание ПНЖК (у лиственницы – триеновых, у ели и сосны – диеновых). На мембранные механизмы криорезистентности, контролирующие жирнокислотный состав ФЛ, у всех видов существенное влияние оказывает ацил-липидная ω6 десатураза, ответственная за синтез линолевой кислоты. У лиственницы активно работает и ацил-липидная ω3 десатураза, ответственная за синтез линоленовую кислоты. Кроме того, только у лиственницы в

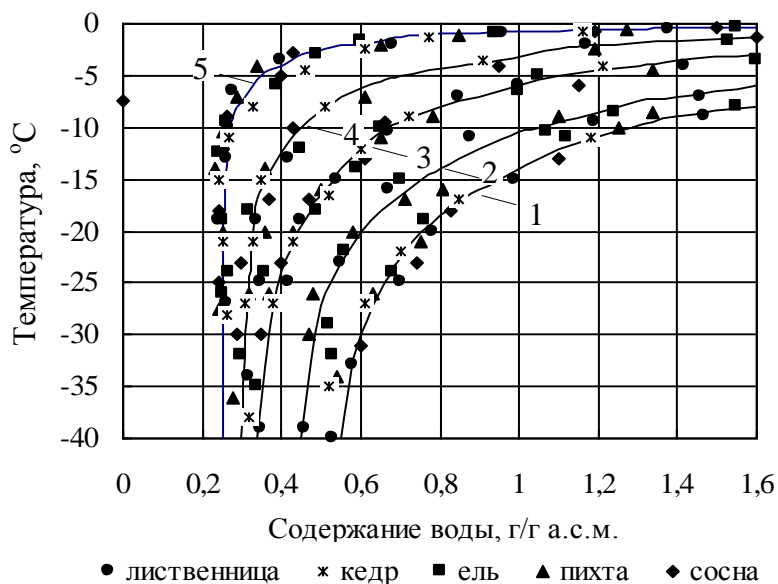
зимний период присутствуют короткоцепочечные ЖК (C_{11-15}) преимущественно с нечетным числом атомов углерода около – 6 %. Предполагается, что особенности биохимической трансформации жирнокислотного состава ФЛ связаны с существованием у хвойных, по крайней мере, двух механизмов низкотемпературной адаптации липидного мембранного матрикса. У ели и сосны восприятие низкотемпературного сигнала живыми клетками индуцирует экспрессию десатуразных генов – жидкостные свойства мембран восстанавливаются. У лиственницы этот процесс контролируется активацией ацил-липидных десатураз и синтезом низкомолекулярных ЖК. Эти независимые биохимические механизмы позволили лиственнице увеличить диапазон пластичности и расширить ареал своего обитания на Север, до границ распространения древесной растительности. Выявленные отличия можно считать признаками генотипа исследованных видов.

Таким образом, впервые установлен характер сезонных изменений состава комплекса клеточных мембран живых тканей почек хвойных древесных видов: при снижении температуры окружающей среды осенью в структуре клеточных мембран начинает увеличиваться доля белков и снижаться – липидов. В криорезистентном состоянии клеточные мембраны на 67-77 % сформированы белками.

Глава 6. Физико-химические изменения в меристемах при низких температурах

6.1 Сезонные изменения содержания воды и особенности ее распределения в клетках. Существует мнение, что морозостойчивые виды зимой обезвоживаются до воздушно сухого состояния, а ткани менее морозостойких растений (винограда, озимой пшеницы) обладают высокой водоудерживающей силой (Туманов, 1979; Красавцев, 1972). В ходе трехлетних наблюдений (2004-2007 гг.) установлено, что в августе содержание воды в меристемах составляло около 2,5-2,7 г/г а.с.м. ткани ($W_{отн} \approx 71 \%$). Снижение влажности начиналось задолго до начала сезонного действия отрицательных температур – примерно в середине сентября. Несмотря на определенные отличия температурных условий разных лет, уровень остаточного содержания воды в меристемах в состоянии низкотемпературной устойчивости составлял $1,30 \div 1,40$ г/г а.с.м. ткани ($W_{отн} \approx 56 \%$). Весной рост содержания воды у ели и пихты начинался уже в конце марта при отрицательных среднемесячных температурах воздуха; у лиственницы, сосны и кедра – примерно на две недели позже. В самый холодный год наблюдений (сезон 2005-2006 гг.) весенний рост влажности отмечен при среднемесячных температурах минус 2 °С. Перед распусканием хвои содержание воды у всех видов составляла около 3,2-3,5 г/г а.с.м. ткани ($W_{отн} \approx 78 \%$), т.е. почти втрое превышало зимний уровень.

Характеристику распределения воды (находящейся при отрицательных температурах в равновесии со льдом) между растворимыми и нерастворимыми компонентами клеток дают кривые равновесного водосодержания (рис. 16). Уже при минус 20 °С у всех видов в меристемах устанавливалось одинаковое содержание воды около 0,45 г/г а.с.м. ткани. Клеточные стенки и мембраны в этих условиях дегидратированы до уровня, близкого содержанию связанной некристаллизующейся воды – примерно 0,25 г/г а.с.м. ткани, т. е. к этому времени в капиллярной системе клеточных стенок и мембран практически не остается свободной воды, способной кристаллизоваться и, таким образом, повреждать клеточные мембраны. При минус 20 °С только водорастворимые вещества (кривые 1 и 2), связывают незамерзшую воду, часть из которой способна кристаллизоваться при дальнейшем снижении температуры до минус 40 °С.



1 – низкомолекулярные ВРВ, ВРВ сосны и кедр;
 2 – ВРВ лиственницы, ели, пихты;
 3 – меристематические ткани почек лиственницы, ели, пихты, сосны, кедр;
 4 – высокомолекулярные соединения (водорастворимые белки цитоплазмы) лиственницы, ели, пихты, сосны, кедр;
 5 – комплекс клеточных стенок и мембран

Рисунок 16 – Кривые равновесного содержания воды в модельных образцах над льдом в области температур 0 ÷ минус 40 °C

Это означает, что в клетках, вплоть до температуры около минус 40 °C, остается жидкая фаза, связываемая водорастворимыми веществами цитоплазмы.

Методом ЯМР-микротомографии получена информация, подтверждающая последний вывод. Метод дает возможность видеть внутреннее строение почки, наблюдать процессы, происходящие внутри непрозрачного объекта, а также наличие и локализацию жидкой фазы (последнее – главная цель). На рис. 17 (снимки 1-9) четко различимы: зона льдообразования (полость) в основании почки, в которой после оттаивания появляется вода; набухающие меристемы (зачаточные ткани хвои и побега); ткани побега.

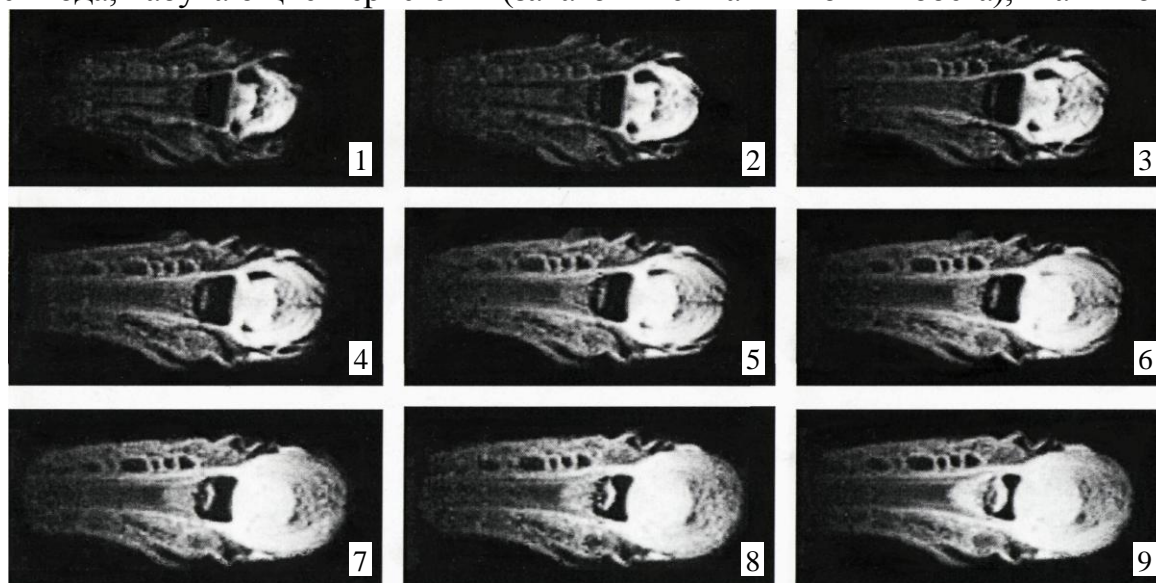


Рисунок 17 – Изображения побега последнего года (ауксибласта) лиственницы сибирской с одной апикальной почкой через определенные промежутки времени в процессе набухания в условиях модельного опыта

На снимке 1 изображен побег с почкой при температуре минус 15 °C. Об увлажнении меристем свидетельствует яркость «свечения» воды – интенсивность сигнала «спин-эхо». Отчетливо видна темная полость в основании почки, в которой находится лед (лед не дает сигнала ЯМР). Различима структура побега, что говорит о присутствии в его тканях незамерзающей воды. Наличие жидкой фазы в клетках при низких отрицательных температурах позволяет предполагать, что именно поэтому в зимних условиях возможно протекание биохимических реакций (изменение

содержания, состава и свойств компонентов клеток). После оттаивания побега с почкой (снимок 2) интенсивность “свечения” меристем существенно увеличилась. В полости появилась различимая светлая полоса – остатки растаявшего льда. На снимках 3-9 хорошо видны изменения, происходящие в почке при набухании.

6.2 Концентрирование цитоплазматических растворов при снижении температуры в отрицательной области. Концентрация водорастворимых веществ в цитоплазме клеток при минимальном среднезимнем содержании воды составила около 26 % у I группы (лиственница, ель, пихта) и около 23 % у II группы (сосна, кедр). Эксперименты на модельных системах показали, что при этой концентрации содержимое цитоплазмы находится в нетекучем гелеобразном состоянии. Гели с такой концентрацией, полученные путем концентрирования ВРВ, проявляли уникальные свойства: ни при снижении, ни при повышении температуры не происходило расслоения, образования осадков, помутнения гелей.

При снижении температуры (с момента образования льда в прилегающих тканях побегов) вода, способная к кристаллизации, мигрирует к зонам льдообразования – концентрация ВРВ в цитозоле увеличивается. Изменение концентрации (рис. 18) рассчитано с помощью данных по зимнему содержанию ВРВ (табл. 1) и равновесному содержанию воды над льдом в образцах ВРВ (рис. 16). У видов I группы концентрация может возрасти от 26 до 69 %; у видов II группы – от 23 до 65 %. Когда внутриклеточная вода в тканях представлена только невымораживаемой водой (0,35 г/г а.с.м. ткани) концентрация ВРВ достигает максимума. При сходстве составов ВРВ все точки на рис. 18 располагались бы на одной кривой. У видов I группы высокое содержание водорастворимых белков: у ели и пихты – около 50 %, у лиственницы – 30 % от суммы ВРВ. У видов II группы содержание белков не более 5-7 %, доля НМС около 94 % (против 50 % – у ели и пихты и 70 % – у лиственницы). Осмотически активные соединения (ВУ и СА) у всех видов в расчете на а.с.м. ткани содержатся примерно в одинаковых количествах (рис 2). Однако в составе ВРВ доля ВУ и СА у сосны и кедра значительно выше – около 65 %.

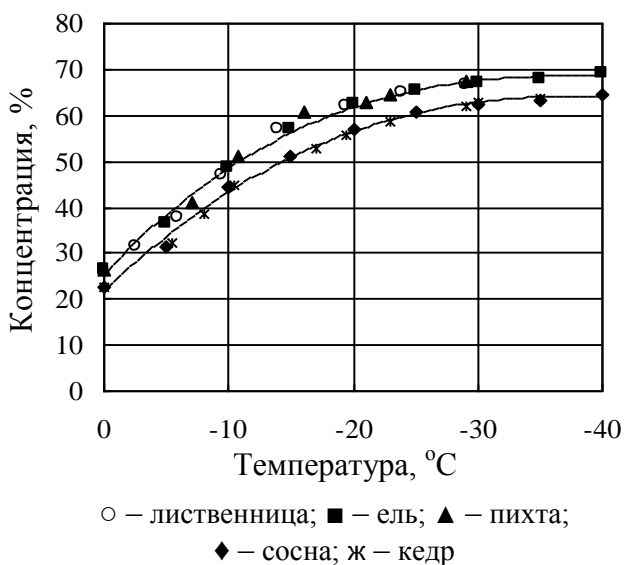


Рисунок 18 – Изменение концентрации водорастворимых веществ цитоплазмы при обезвоживании тканей в результате образования льда вне клеток

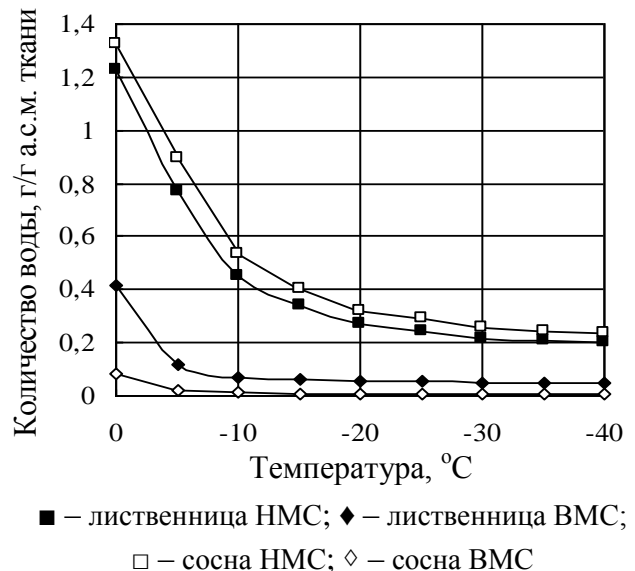


Рисунок 19 – Изменение содержания воды, связываемой низко- и высокомолекулярными соединениями с учетом массовой доли этих компонентов в меристемах

Составы водорастворимых веществ хорошо согласуются с экспериментальными кривыми на рис. 16, демонстрирующими более высокую водоудерживающую способность ВРВ сосны и кедра. Значимость данного факта становится более очевидной после оценки изменения содержания воды, связываемой ВМС и НМС с учетом массовой доли этих компонентов при отрицательных температурах (рис. 19). У видов I группы количество воды, связываемой НМС в области температур 0 ÷ минус 40 °С, в 2,5-3 раза превышает количество воды, связываемой белками. У II группы практически весь объем воды в цитозоле удерживают НМС.

Общее количество незамерзшей воды, связываемой ВРВ при различных отрицательных температурах, и воды, способной кристаллизоваться при дальнейшем снижении температуры (табл. 3), рассчитано по данным рис. 16. При снижении тем-

Таблица 3 – Изменение содержания различных форм воды при обезвоживании меристем в результате образования льда вне клеток, в граммах на грамм абсолютно сухой массы вещества

Температура, °С	ВРВ лиственницы, ели, пихты		ВРВ сосны, кедра	
	вода незамерзшая	вода, способная кристаллизоваться	вода незамерзшая	вода, способная кристаллизоваться
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

пературы понижение содержания незамерзшей воды происходит за счет воды, способной к кристаллизации. Ее содержание в растворимой фазе цитоплазмы может снижаться практически до нуля, что и приводит к концентрированию цитоплазматических растворов. Высокие коэффициенты корреляции (около 0,99) между концентрацией ВРВ и количеством воды в цитоплазме, способной к кристаллизации в интервале температур 0 ÷ минус 40 °С, указывают на связь этих показателей в процессе формирования низкотемпературной устойчивости клеток. Не вызывает сомнений, что для предотвращения замерзания воды внутри клеток (а значит и сохранения жизнеспособности) при снижении температур в отрицательной области, необходимо увеличение концентрации ВРВ. При минус 40 °С ВРВ связывают только невымораживаемую (некристаллизующуюся) воду: у I группы – примерно 0,55; у II группы – 0,45 г/г а.с.м. вещества. Концентрация ВРВ в клетках максимальна.

Несмотря на то, что ВРВ сосны и кедра обладают более высокой водоудерживающей способностью по сравнению с ВРВ I группы, общее количество невымораживаемой воды, связываемой ВРВ и нерастворимыми компонентами клеток с учетом их доли, у различных видов примерно одинаково. Это еще раз подтверждает, что при формировании резистентности меристемы почек обезвоживаются до одинакового безопасного уровня остаточного водосодержания. В условиях льдообразования ВРВ удерживают лишь необходимую часть воды, обеспечивая её незамерзающее состояние, защищая клетки и ткани от чрезмерного обезвоживания.

6.3 Возникновение низкотемпературных повреждений в меристематических клетках. Изучено влияние замораживания на мембранные липиды при контролируемом остаточном содержании воды в клеточных мембранах (табл. 4). Сохранение или

распад ФЛ в зимующих почках зависит от начальных условий: даже быстрое (15 °С/ч) замораживание от минус 20 °С до минус 60 °С (при условии предварительного медленного охлаждения до минус 20 °С) почти не вызывало повреждений мембран. При охлаждении от исходной температуры минус 15 °С (при наличии объемной фазы способной к кристаллизации воды – примерно 0,02 г/г а.с.м. ткани) наблюдался распад ФЛ.

Таблица 4 – Содержания липидного фосфора (Р), в миллиграммах на грамм абсолютно сухой массы ткани

ФЛ	Зимующие почки*									Почки на начальной стадии набухания**								
	контроль			охлаждение от -20 °С, 15°С/ч			охлаждение от -15 °С, 15°С/ч			контроль			охлаждение от -20 °С, 15°С/ч			охлаждение от -20 °С, 3,5°С/ч		
	Лц	Е	С	Лц	Е	С	Лц	Е	С	Лц	Е	С	Лц	Е	С	Лц	Е	С
ФХ	1,72	0,82	1,44	1,72	0,82	1,44	0,36	0,26	1,44	0,92	0,58	0,77	0,29	0,18	0,18	0,90	0,49	0,73
ФЭ	0,72	0,54	1,08	0,72	0,54	1,08	0,23	0,27	1,08	0,50	0,32	0,72	0,19	0,19	0,17	0,47	0,28	0,64
ФС	0,25	0,12	0,15	0,25	0,12	0,15	0,09	0,08	0,15	0,09	0,05	0,09	0,05	0,04	0,06	0,09	0,05	0,08
ФГ	0,07	0,07	0,26	0,07	0,07	0,26	0,06	0,05	0,26	0,17	0,09	0,16	0,14	0,07	0,14	0,15	0,07	0,15
ФИ	-	-	0,13	-	-	0,13	-	-	0,13	0,11	0,02	0,28	0,10	0,02	0,25	0,10	0,02	0,27
ФК	0,08	0,13	0,13	0,08	0,13	0,13	0,81	0,75	0,13	0,12	0,08	0,44	0,50	0,37	0,67	0,14	0,18	0,53
Р _Σ	2,84	1,68	3,19	2,84	1,68	3,19	1,55	1,41	3,19	1,91	1,14	2,46	1,27	0,87	1,47	1,85	1,09	2,40

Примечание: Лц – лиственница, Е – ель, С – сосна; * – содержание воды (лиственница – 1,32, ель – 1,37, сосна – 1,35 г/г а.с.м. ткани; ** – содержание воды (лиственница – 1,70, ель – 1,90, сосна – 1,55 г/г а.с.м. ткани); приведены средние значения трех параллельных экспериментов

Весной распад ФЛ наблюдался как при быстром, так и при медленном охлаждении до минус 60 °С даже от исходной температуры минус 20 °С. Устойчивость тканей в апреле, по сравнению с зимой, уже снижена, а повышенная влажность меристем (рис. 1) не позволяет обеспечить отток всей, способной к кристаллизации воды из клеточных мембран. В зимующих почках лиственницы и ели самыми устойчивыми оказались ФГ, сосны – ФИ. В набухающих почках общий липидный фосфор снижался в основном за счет тех же липидных форм (ФХ, ФЭ, ФС). У всех пород наиболее устойчивыми оказались ФГ, а также ФИ. Избирательность действия фосфолипаз может быть связана со спецификой меристем почек – зачаточных тканей фотосинтетического аппарата. Известно, что в хлоропластах содержание ФГ обычно не менее 60 %, а ФИ рассматривают как специфическое липидное окружение мембраносвязанных ферментов, необходимое для их активации. Вероятно, меристемы имеют особые механизмы, позволяющие сохранять эти липидные формы при замораживании. Уменьшение содержания некоторых индивидуальных групп ФЛ и увеличение содержания ФК свидетельствуют о том, что кристаллизация воды индуцирует каталитическую активность фосфолипазы D. Вместе с тем, аккумуляция ФК не компенсирует в полной мере снижение уровня содержания других групп ФЛ, поскольку отмечается снижение общего липидного фосфора. Вероятно, одновременно с фосфолипазой D действует фосфолипаза С, обладающая позиционной специфичностью в отношении связи между фосфорной кислотой и глицерином.

Первичный механизм повреждения мембран меристематических клеток связан с фазовым переходом воды. Для возникновения биохимических повреждений, индуцирующих каталитическую активность фосфолипаз, достаточно минимального количества способной к кристаллизации воды – 0,02-0,05 г/г а.с.м. ткани. Вместе с тем, в апреле меристемы почек с повышенной влажностью еще обладают определенной устойчивостью, достаточной для того, чтобы выдержать понижение темпе-

ратуры примерно до минус 20 °С. В климатических условиях Сибири такой уровень устойчивости, как правило, обеспечивает сохранение жизнеспособности.

6.4 Криопротекторная роль водорастворимых белков. Ранее было показано, что глубокое переохлаждение внутриклеточной воды в тканях лиственницы обусловлено свойствами водорастворимых веществ (в том числе, водорастворимых белков). Дополнительная информация о криозащитном действии водорастворимых веществ (рис. 20) получена при изучении влияния фермента пептидазы и термического воздействия

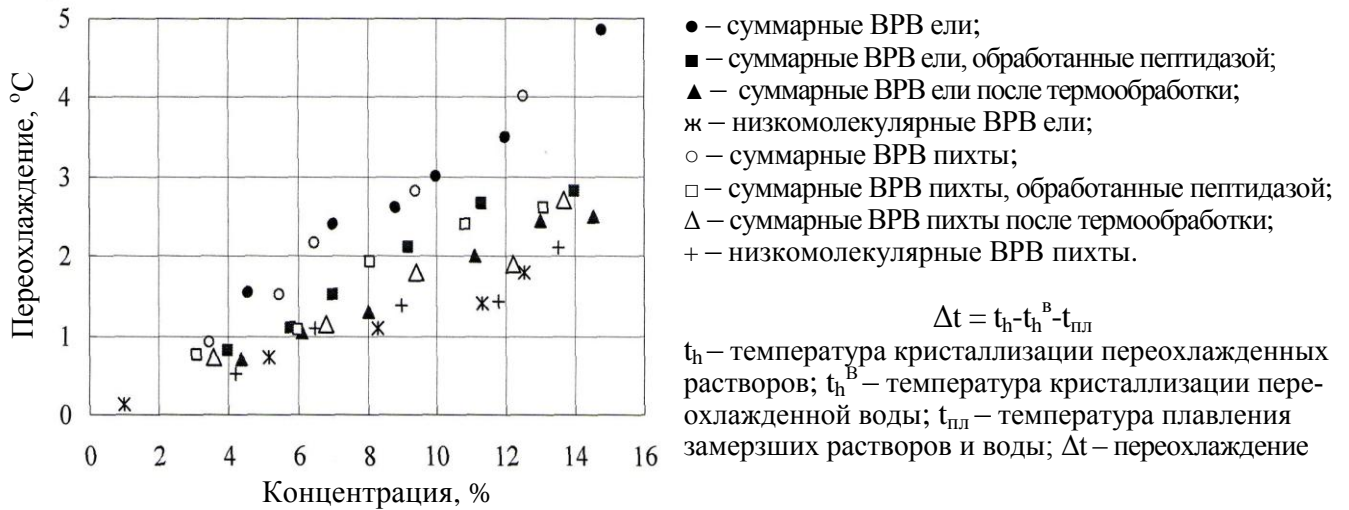


Рисунок 20 – Зависимость степени переохлаждения растворов водорастворимых веществ ели и пихты от их концентрации до и после обработки пептидазой и нагрева на антинуклеационную активность ВРВ ели и пихты. Как показал эксперимент, и то, и другое значительно снижало антинуклеационную активность растворов: степень переохлаждения воды в образцах становилась более характерной для растворов НМС. Следовательно, ВРВ ели и пихты, содержащие нативные ВРБЦ, обладают более выраженным антинуклеационным действием.

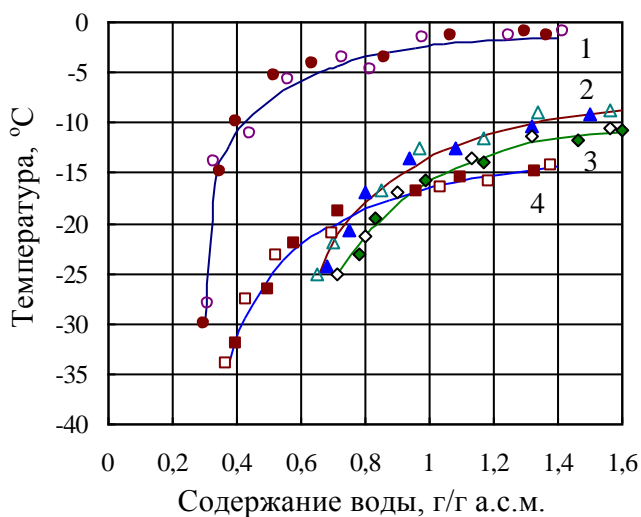
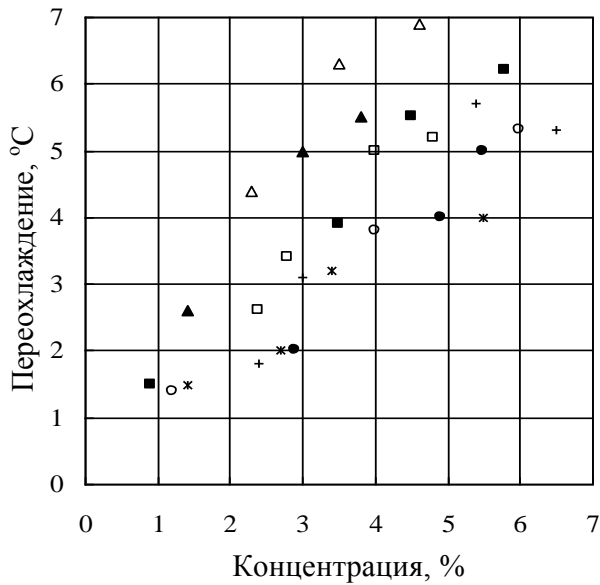


Рисунок 21 – Зависимость температур плавления и замерзания «объемных» образцов водорастворимого белка и низкомолекулярных соединений меристем почек ели и пихты от содержания воды

Результаты определения температур замерзания и плавления "объемных" образцов (кристаллизация по механизму гетерогенного зародышеобразования) водорастворимых белков и водорастворимых НМС ели и пихты с различным содержанием воды (рис. 21) показывают, что водные растворы белка замерзают со значительным переохлаждением (12-15 °С) по сравнению с образцами низкомолекулярных растворимых веществ (3-4 °С).

Предполагается, что различные фракции белков (в первую очередь высоко- и низкомолекулярные) будут по-разному влиять на степень переохлаждения растворов. Для достижения максимально возможного переохлаждения была применена эмульсионная методика с добавлением эмульгатора, при которой можно избежать влияния цент-

ров гетерогенного зародышеобразования и достичь максимально возможного переохлаждения. Установлено (рис. 22), что наибольшее переохлаждение раствора обеспечивают ВРБЦ с ММ > 100 кД; с меньшим переохлаждением замерзают растворы суммар-



- – низкомолекулярная фракция белков ели;
- – суммарный водорастворимый белок ели;
- ▲ – высокомолекулярная фракция белков ели;
- ж – суммарный водорастворимый белок ели (весенний максимум содержания белка);
- – низкомолекулярная фракция белков пихты;
- – суммарный водорастворимый белок пихты;
- △ – высокомолекулярная фракция белков пихты;
- + – суммарный водорастворимый белок пихты (весенний максимум содержания белка).

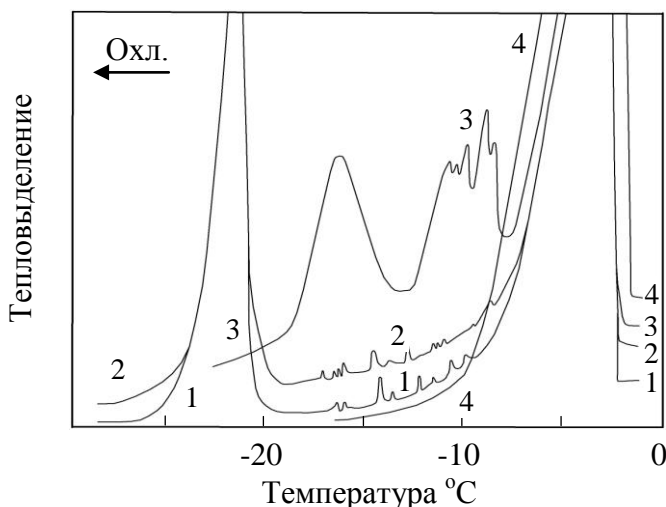
$$\Delta t = t_h - t_h^B - t_{пл}$$

t_h – температура кристаллизации переохлажденных растворов; t_h^B – температура кристаллизации переохлажденной воды; $t_{пл}$ – температура плавления замерзших растворов и воды; Δt – переохлаждение

Рисунок 22 – Зависимость степени переохлаждения растворов высоко- и низкомолекулярных белков ели и пихты от концентрации растворенных веществ

ного ВРБЦ; еще в меньшей степени снижают температуру гомогенной нуклеации раствора ВРБЦ с ММ < 5 кД. Вместе с тем, низкомолекулярные белки обладают более высокой антинуклеационной активностью по сравнению с суммарной фракцией ВРВ и НМС. Важно, что в момент весеннего максимума содержания ВРБЦ (несмотря на то, что фракционный состав белков уже существенно изменился) все еще обладают антинуклеационной активностью, соответствующей активности низкомолекулярных белков зимующих меристем. Это объясняет столь значительное увеличение их количества в меристемах в апреле, согласованное с ростом содержания воды в тканях.

При набухании почек температура кристаллизации внутриклеточной воды возрастает (рис. 23). В то же время, даже при увеличении содержания воды до



1 и 2 – набухшие почки скорость охлаждения 20 и 15 °C; 3 и 4 – тепловыделение при кристаллизации через двое суток и через неделю после распускания почек

Рисунок 23 – Калориметрические кривые охлаждения отрезков побегов с почками ели в процессе набухания и после распускания почек

2,5-3 г/г а.с.м. ткани способность к переохлаждению у внутриклеточных растворов все еще сохраняется (температура начала замерзания внутриклеточной воды около минус 20-22 °C). По многолетним данным снижение температуры воздуха в этот период до минус 20 °C и ниже уже маловероятно. Вместе с тем, небольшие заморозки для этого времени года – явление обычное. Согласованность весеннего роста содержания водорастворимых белков, обладающих даже невысокой антинуклеационной активностью, с увеличением содержания воды логично объясняется дополнительной

защитой меристематических клеток от внутриклеточной кристаллизации при весенних заморозках. У сосны и кедра весной начало роста влажности меристем происходит примерно на две недели позже, чем у видов I группы (при наступлении положительных среднемесячных температур воздуха). На фоне очень низкого содержания водорастворимых белков у сосны и кедра, как и у видов I группы, увеличивается количество периферических белков, защищающих клеточные мембраны (рис. 11), а также водорастворимых углеводов и свободных аминокислот (рис. 2), способствующих умеренному переохлаждению внутриклеточного раствора. Вероятно, сосне и кедру для сохранения жизнеспособности этой защиты вполне достаточно. В случае же экстремального понижения температуры такая защита будет менее эффективна, чем у видов I группы, что вполне согласуется с данными о более низкой морозоустойчивости сосны и кедра.

6.5 Особенности криопротекторного действия мембранных белков. Индивидуальный характер количественных изменений интегральных и периферических белков в клеточных мембранах подтверждает, что данные белки выполняют различные функции (рис. 11). Вместе с тем, сходный характер сезонной динамики содержания мембранных белков у исследованных видов дает основание считать, что их функции в мембранах зимующих меристем должны быть идентичны и в значительной степени связаны с формированием устойчивой структуры мембран.

Интегральные белки. Высокомолекулярные ИБ, синтезирующиеся осенью, вполне могут являться трансмембранными белками и формировать дополнительные неселективные каналы белковой природы, необходимые для быстрой дегидратации клеток в условиях внеклеточного льдообразования. Расчетный диаметр глобул высокомолекулярных белков примерно 66-76 Å (табл. 5). Толщина клеточной мембраны

Таблица 5 – Характеристики интегральных и периферических белков зимующих меристем

Вид	Молекулярная масса глобулы, Дальтон			Число аминокислотных остатков в глобуле, штук			Диаметр глобулы, Ангстрем		
	ВМГ ИБ	СГ		ВМГ ИБ	СГ		ВМГ ИБ	СГ	
		ИБ	ПБ		ИБ	ПБ		ИБ	ПБ
Лиственница	166920	47795	33190	1517	435	302	74,04	48,82	43,23
Ель	181500	39828	37329	1650	362	339	76,14	45,92	44,93
Пихта	151140	39640	35035	1374	360	319	71,62	45,84	44,03
Сосна	144270	32310	36505	1312	294	330	70,54	42,84	44,53
Кедр	120580	37460	33346	1096	341	303	66,43	45,02	43,28

Примечание: для ИБ молекулярная масса высокомолекулярной глобулы (ВМГ) определена с учетом массовых долей и молекулярных масс индивидуальных белковых фракций с ММ > 100 кД, молекулярная масса средней глобулы (СГ) определена с учетом массовых долей и молекулярных масс всех индивидуальных белковых фракций за исключением фракций с ММ > 100 кД; для ПБ молекулярная масса средней глобулы (СГ) определена с учетом массовых долей и молекулярных масс всех индивидуальных белковых фракций; средний молекулярный вес аминокислотного остатка = 110 Дальтон; плотность белка $\rho = 1,3 \text{ г/см}^3$

(по литературным источникам) составляет от 80 до 100 Å. По форме ИБ обычно представляют собой эллипсоиды вращения. При встраивании в мембрану они вполне могут образовывать неселективные каналы, необходимые для быстрой дегидратации клеток в условиях внеклеточного льдообразования. Предполагается, что часть ИБ, обращенная к водному окружению, сформирована преимущественно глицином (рис. 13). Между водородом боковой группы глицина и молекулами воды возникают водородные связи. В то же время, полярная группа глицина нейтральна, поэтому молекулы воды, образующие гидратную прослойку на внутренней поверхности канала, могут обмениваться с молекулами воды, быстро пере-

мещающимися по такому каналу по градиенту химического потенциала. Внешняя часть ИБ сформирована преимущественно аланином (доля в аминокислотном составе – 30-40 %), его гидрофобная боковая группа ($-\text{CH}_3$) может контактировать с «хвостами» полярных липидов – гидрофобное взаимодействие.

Одновременно ИБ, локализованные внутри мембраны, выполняют и структурную функцию. Возможность образования внутреннего "каркаса" этими белками подтверждает сопоставление объемов ИБ и липидного бислоя ККМ (табл. 6). У лиственницы, ели и пихты суммарный объем липидного бислоя на 25-30 % меньше объема ИБ; у сосны и кедра объем липидного бислоя примерно на 10 % превышает объем ИБ.

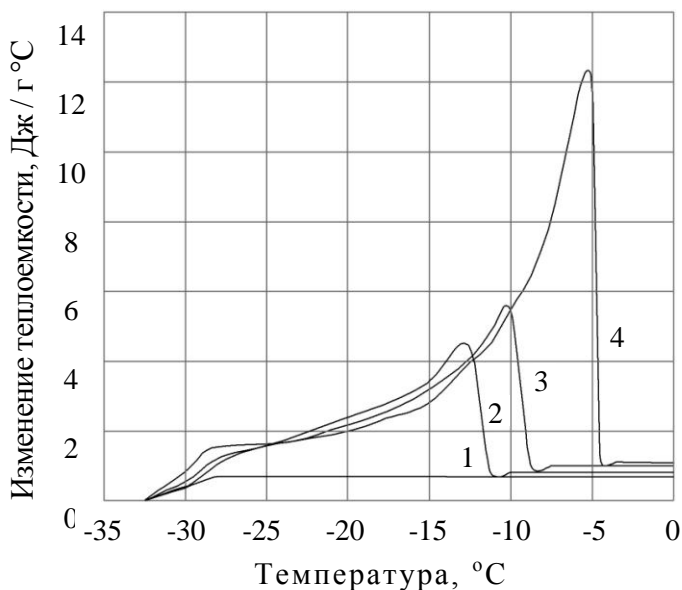
Таблица 6 – Характеристики комплекса клеточных мембран, на грамм абсолютно сухой массы ткани

Вид	$V_{ИБ}, \text{см}^3$	$V_{Л}, \text{см}^3$	$S_{ПБ}, \text{см}^2$	$S_{Л}, \text{см}^2$
Лиственница	0,406	0,290	$3,9 \times 10^5$	$3,6 \times 10^5$
Ель	0,405	0,272	$3,8 \times 10^5$	$3,4 \times 10^5$
Пихта	0,421	0,249	$4,0 \times 10^5$	$3,1 \times 10^5$
Сосна	0,322	0,366	$4,3 \times 10^5$	$4,6 \times 10^5$
Кедр	0,331	0,356	$4,4 \times 10^5$	$4,5 \times 10^5$

Примечание: толщина мембраны $\ell = 80 \text{ \AA}$; плотность белка $\rho = 1,3 \text{ г/см}^3$; плотность липидов $\rho = 0,9 \text{ г/см}^3$; $V_{ИБ}$ – объем интегральных белков; $V_{Л}$ – объем липидного бислоя; $S_{ПБ}$ – площадь поверхности монослоя из периферических белков; $S_{Л}$ – площадь поверхности липидного бислоя

Мембраны не являются статичными структурами: как липидные, так и белковые молекулы находятся в непрерывном движении. Согласно теории перколяции (протекания) Бродбента и Хаммерсли (Эфрос, 1982) тепловое движение молекул в жидкости приводит к возникновению между ними пространственной связности. Известна критическая доля объема молекул, при которой между ними в объемах любой конфигурации будет возникать пространственная связность – 0,15-0,17. Следовательно, самопроизвольно перемещаясь в плоскости мембраны, ИБ, в соответствии с теорией перколяции, обязательно распределятся в липидном бислое таким образом, что белковые глобулы будут контактировать друг с другом, формируя "каркас", полости которого заполнены липидами. В случае сосны и кедра полости будут несколько большего размера. Тем не менее, в каждом случае ИБ вполне достаточно, чтобы образовать пространственную ячеистую структуру внутри объема липидного матрикса. В тоже время известно, что встраивание ИБ в бислой делает его структуру более жесткой (упорядоченной), поскольку подвижность липидов, примыкающих к белку, затруднена. Сохранение вязкости бислоя на физиологически необходимом уровне реализовано посредством механизмов, регулирующих состав фосфолипидов, содержание и положение в их молекулах различных жирных кислот (полиненасыщенных, короткоцепочечных, с нечетным числом углеродных атомов). Весной распад части интегральных белков обеспечивает возможность быстрой мобилизации достаточного количества свободных аминокислот.

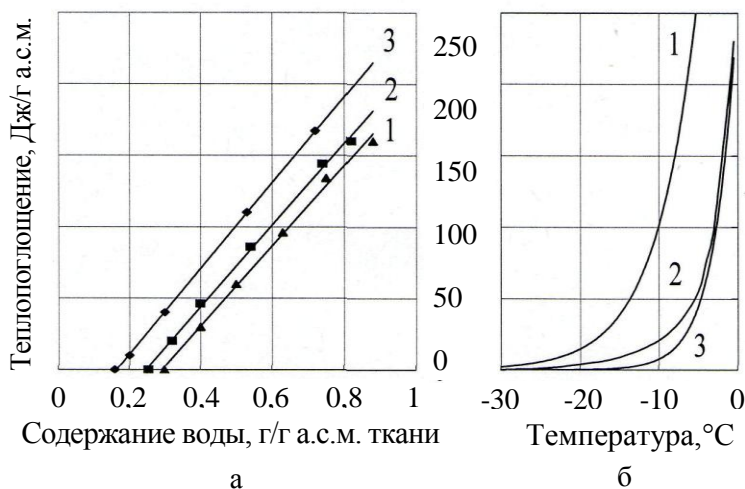
Периферические белки. Площади поверхностей монослоя из ПБ и липидного бислоя (табл. 6) рассчитаны с учетом экспериментально определенной массы белков и липидов в клеточных мембранах и характеристик средних белковых глобул ПБ. Зимой в условиях минимального содержания воды в ткани при снижении температуры степень сорбции водорастворимых белков поверхностями клеточных стенок и мембран возрастает. Имобилизация части водорастворимых белков на внутриклеточных поверхностях и синтез мембранных белков в состоянии глубокого покоя обеспечивают клетки таким количеством ПБ (предполагая глобулярное строение их основной массы), которого вполне достаточно для формирования на поверхности липидного матрикса



1 – 0,3 г H₂O / г а.с.м. ткани; 2 – 0,4 г H₂O / г а.с.м. ткани;
3 – 0,45 г H₂O / г а.с.м. ткани; 4 – 0,7 г H₂O / г а.с.м. ткани

Рисунок 24 – Температурная зависимость изменения теплоемкости в образцах периферического белка с различным содержанием воды, выделенного из клеточных мембран зимующих меристем почек ели

содержанием воды величину теплового эффекта и относя ее к сухой массе образца, получаем зависимость теплопоглощения от содержания воды в образцах. На рис. 25 (а) приведены соответствующие зависимости для различных препаратов. Точка пересечения

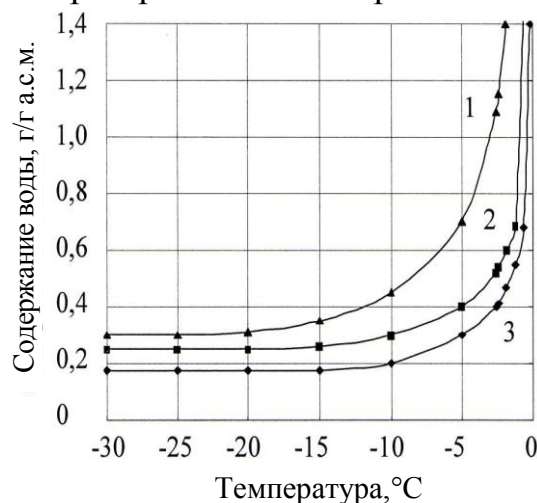


1 – периферический белок клеточных мембран ели (суммарная фракция);
2 – пластиды ели;
3 – пластиды ели с удаленными периферическими белками

Рисунок 25 – Зависимости величины теплопоглощения в области фазовых переходов воды (плавления) в образцах от содержания воды (а) и температуры (б)

белкового монослоя – своеобразного внешнего "каркаса" мембраны.

Одной из основных причин повреждений мембран является их дегидратация при низких температурах. На рис. 24 показаны калориметрические кривые размораживания препаратов ПБ с различным содержанием воды. Плавление льда в образцах начинается с подъема теплоемкости при температурах около минус 30 °С. Этот прирост связан с расстеклованием гидратированного белка, находящегося при более низких температурах в стеклообразном состоянии. Затем в широкой области температур регистрируются пики теплопоглощения, связанные с плавлением различных количеств льда. Рассчитав для образцов ПБ с разным



1 – периферический белок клеточных мембран ели (суммарная фракция);
2 – пластиды ели;
3 – пластиды ели с удаленными периферическими белками

Рисунок 26 – Зависимость содержания незамерзшей (связанной) воды в образцах от температуры

полученных прямых с осью абсцисс соответствует количеству связанной невымораживаемой воды. Суммарная фракция ПБ характеризуется более высоким содержанием невымораживаемой воды по сравнению с препаратом пластид. При удалении ПБ с по-

верхности пластид количество невымораживаемой воды становится еще ниже. Для оценки количества связываемой воды при температурах в области фазового перехода плавления по кривым рис. 25 (а) построены температурные зависимости теплопоглощения образцов с различным влагосодержанием – рис. 25 (б). По данным рис. 25 оценено количество незамерзшей воды, связываемой образцами, при температуре в области $0 \div$ минус $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ (рис. 26). Видно, что именно ПБ связывают повышенное количество воды. Следовательно, еще одна криозащитная функция ПБ состоит в их способности препятствовать излишнему обезвоживанию мембран в условиях льдообразования.

Внутриклеточные поверхности, как правило, имеют микронеоднородную структуру. По этой причине биологических объектов, способных к глубокому переохлаждению, в природе крайне мало. Одним из таких редких представителей являются меристемы некоторых морозоустойчивых древесных видов. Для более полного понимания механизмов переохлаждения меристем в зимний период исследованы свойства поверхностей мембранных структур как центров гетерогенной нуклеации. Несмотря на то, что в тканях сосны и кедра глубокого переохлаждения не наблюдается, оценить свойства поверхностей их клеточных органелл с точки зрения льдообразующей активности в переохлажденной среде не менее интересно. Эксперимент показал, что пластиды зимующих меристем практически не влияли на температуру кристаллизации переохлажденной чистой воды, в которой они были суспендированы. В то же время, температура кристаллизации воды, в которой суспендированы органеллы с удаленными ПБ, в каждом случае была выше примерно на $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ температуры кристаллизации чистой воды. Аналогичным образом влияло на температуру кристаллизации и присутствие хлоропластов из молодой хвои. Это означает, что ПБ клеточных мембран обладают антинуклеационными свойствами. Формируя на поверхности мембран однородный гидрофильный слой, ПБ обеспечивают инактивацию существующих на мембранах неоднородностей, которые могли бы служить центрами гетерогенного зародышеобразования. В результате органеллы зимующих меристем не могут играть роль активных нуклеаторов. Для лиственницы, ели и пихты наличие слоя ПБ с такими свойствами особенно важно, поскольку без него глубокое переохлаждение внутриклеточных растворов было бы невозможно.

Механизм стабилизации клеточных мембран состоит в следующем:

- периферические белки формируют на поверхности липидного бислоя мембран внешний "каркас" в виде монослоя. При низкотемпературном обезвоживании слой периферических белков связывает повышенное количество невымораживаемой воды, тем самым препятствуя излишней дегидратации мембран; одновременно слой гидратированных периферических белков маскирует микронеоднородности поверхностей клеточных органелл, придавая им антинуклеационные свойства;

- интегральные белки, встроенные в мембраны, формируют внутренний "каркас" мембран, ячейки которого заполнены липидным материалом, а высокомолекулярные фракции интегральных белков – водопроводящие каналы, обеспечивающие миграцию воды из клеток, при внеклеточном льдообразовании;

- необходимый уровень структурной подвижности клеточных мембран поддерживается жидким фазовым состоянием модифицированного липидного матрикса.

В адаптированном состоянии меристематические клетки при снижении температуры в отрицательной области могут не только уменьшать содержание способной к кристаллизации части воды, но и переносить деформации без повреждения мембран. Температура начала перехода гидратированных периферических белков мем-

бран в стеклообразное состояние составляет около минус 30 °С (рис. 24). При температурах ниже минус 30 °С, в результате аморфного затвердевания (стеклования) слоя адсорбированных периферических белков, и, вероятно, интегральных белков, структура биомембран фиксируется при условии достаточного уровня обезвоживания клеток и становится нечувствительной к температурному воздействию.

Модель механизма формирования устойчивого состояния клеток в условиях зимнего низкотемпературного воздействия отражает наличие у морозоустойчивых хвойных видов двух существенно отличающихся систем криозащиты. В основу формирования устойчивого состояния цитозоля у I группы видов положены физико-химические свойства водорастворимых высоко- и низкомолекулярных соединений; у II группы видов – только низкомолекулярных соединений. Важнейшим этапом, в результате которого приобретает максимальный уровень защиты, является концентрирование внутриклеточных растворов.

Механизм формирования устойчивого состояния клеток состоит в следующем:

В меристемах сосны и кедра:

- в состоянии глубокого покоя значительно повышается содержание низкомолекулярных водорастворимых соединений (преимущественно водорастворимых углеводов и свободных аминокислот), снижающих точку (температуру) замерзания и плавления внутриклеточных растворов; обеспечиваемый уровень переохлаждения внутриклеточного раствора (3÷4 °С) является достаточным для своевременного оттока воды из меристематических клеток к близко расположенным внеклеточным зонам льдообразования;

- благодаря высоким водоудерживающим свойствам водорастворимых соединений в меристематических клетках при низких отрицательных температурах обеспечивается наличие незамерзающей жидкой фазы (почти до минус 40 °С) в виде высококонцентрированного внутриклеточного раствора. Ее наличие обеспечивает возможность протекания в меристемах в зимних условиях биохимических реакций, проявляющихся в изменении содержания, состава и свойств компонентов клеток;

- при температуре минус 20 °С вся свободная (способная к кристаллизации) вода в клетке удерживается только водорастворимыми низкомолекулярными соединениями. Преимущественное связывание способной к кристаллизации воды оказывает криозащитное действие в отношении клеточных мембран, предотвращая нуклеацию в их капиллярно-пористой системе.

В меристемах лиственницы, ели и пихты:

- осенью наблюдается активный синтез водорастворимых белков (в том числе высокомолекулярных), обладающих повышенной способностью к глубокому переохлаждению внутриклеточных растворов, в результате чего создается возможность оттока переохлажденной воды к внеорганическим зонам льдообразования;

- при концентрировании цитоплазматических растворов часть водорастворимых белков адсорбируется поверхностями мембран, увеличивая слой периферических белков и усиливая, таким образом, криозащитное действие в отношении мембран;

- одновременно с водорастворимыми белками синтезируются и водорастворимые низкомолекулярные соединения, которые оказывают криозащитное действие, аналогичное наблюдаемому у сосны и кедра.

ВЫВОДЫ

1 Морозоустойчивые хвойные виды в цитозоле меристематических клеток реализуют две различные системы криозащиты, обусловленные физико-химическими свойствами высоко- и низкомолекулярных водорастворимых соединений. Состав водорастворимых веществ характеризуют ряды убывания содержания основных компонентов: лиственница, ель, пихта (I группа): белки > углеводы > свободные аминокислоты; сосна, кедр (II группа): углеводы > свободные аминокислоты > белки.

2 У видов I и II группы динамика содержания моно- и олигосахаридов в ходе годового цикла имеет закономерный одинаковый характер: в период покоя количество олигосахаридов в меристемах снижается, моноз – увеличивается. Состав моносахаридов почти на 96-98 % представлен фруктозой, глюкозой и галактозой. Кроме того, накапливаются фруктоолигосахариды и галактозосодержащие соединения.

3 Зимой азот в составе свободных аминокислот в основном находится в виде глицина, аргинина и орнитина. Уровень содержания непротеиногенных аминокислот повышен по сравнению с весной примерно в два раза. У сосны (при содержании водорастворимых белков – 2-3 %) непротеиногенных аминокислот вдвое больше, чем у ели (при содержании водорастворимых белков – 28-30 %). В качестве надежного стрессового метаболита можно рассматривать орнитин, содержание которого в меристемах зимующих почек в 3-5 раз выше, чем в набухших почках.

4 У видов I группы зимой в составе водорастворимых белков присутствуют высокомолекулярные фракции ($MM > 100$ кД) – 17-26 %, исчезающие весной с потерей низкотемпературной устойчивости. В составе водорастворимых белков зимующих почек обнаружены пептиды ($MM < 5$ кД) с аномально высоким содержанием пролина – до 35 %.

5 Закономерность сезонного изменения фракционного состава мембранных белков позволяет предполагать протекторные функции 9-ти высокомолекулярных интегральных белков ($240 \text{ кД} \geq MM \geq 102 \text{ кД}$) и 8-ми периферических белков ($240 \text{ кД} \geq MM \geq 115 \text{ кД}$), присутствующих зимой и не найденных весной. Водоудерживающие и антинуклеационные свойства периферических белков в значительной степени обеспечивают сохранение нативной структуры мембран в условиях низких зимних температур. У видов I группы фракционный и аминокислотный составы периферических и водорастворимых белков имеют значительное сходство.

6 При снижении температуры окружающей среды в осенне-зимний период (на фоне понижения в комплексе клеточных мембран общего содержания липидов до минимума) в составе липидного матрикса почти вдвое увеличивается доля фосфолипидов. В результате липиды клеточных мембран зимой на 65-85 % состоят из фосфолипидов (преимущественно фосфатидилхолинов). Существует взаимосвязь между морозоустойчивостью вида и величиной соотношения фосфолипиды/гликолипиды в комплексе клеточных мембран: у лиственницы – 7,5/1; пихты – 7,0/1; ели – 6,8/1; кедра – 3,9/1; сосны – 2,1/1.

7 У ели и сосны воздействие низких температур индуцирует экспрессию десатурированных генов, обеспечивая жидкостные свойства липидного бислоя; у лиственницы сохранение жидкостных свойств контролируется активацией ацил-липидных десатурированных и синтезом короткоцепочечных жирных кислот преимущественно с нечетным числом атомов углерода. Отдельные участки липидного бислоя мембран при низких отрицательных температурах способны сохранять жидкое фазовое состоя-

ние почти до минус 50 °С, обеспечивая необходимый уровень структурной подвижности мембран. Морозоустойчивость хвойных коррелирует с накоплением полиненасыщенных жирных кислот в составе фосфолипидов: у лиственницы – триеновых и диеновых, у ели и сосны – диеновых.

8 В меристематических клетках вплоть до минус 40 °С присутствует жидкая фаза в виде высококонцентрированного раствора. Ее наличие обеспечивает возможность протекания в зимних условиях биохимических реакций, проявляющихся в изменении содержания, состава и свойств компонентов клеток. Концентрация водорастворимых веществ в цитоплазме клеток при снижении температуры в отрицательной области может возрастать почти в три раза. Максимальных значений (65-69 %) концентрация достигает около минус 40 °С, когда вся способная кристаллизоваться вода уже мигрировала к зонам льдовыделения и фазовые переходы воды в клетках становятся невозможны. Уже при температуре ниже минус 20 °С практически всю воду в клетках, способную кристаллизоваться при дальнейшем снижении температуры, удерживают низкомолекулярные соединения.

9 Первичный механизм, инициирующий повреждения структурно-метаболических систем меристематических клеток при замораживании, связан с фазовым переходом воды, локализованной в капиллярно-пористой системе клеточных мембран. Для возникновения биохимических повреждений достаточно минимального количества способной к кристаллизации воды – 0,02-0,05 г/г а.с.м. ткани. Наибольшую чувствительность к кристаллизации объемной фазы воды и в зимующих и в набухающих меристемах проявляют фосфолипазы, оказывая активное действие на фосфатидилхолины и фосфатидилэтаноламины; самыми устойчивыми являются фосфатидилглицерины и фосфатидилинозиты. Подобная закономерность прослеживается для видов с различным соотношением основных структурных компонентов в мембранах, а также индивидуальных липидных форм в составе фосфолипидов.

10 Переход тканей в состояние низкотемпературной устойчивости связан с существенными структурно-химическими трансформациями клеточных мембран. Механизм, объясняющий стабилизацию мембран в условиях обезвоживания меристематических клеток, льдообразования и изменений температуры окружающей среды, заключается в формировании твердоупругого белкового "каркаса" при снижении доли липидного матрикса с одновременной его модификацией. Для всех исследованных видов данный механизм является универсальным.

11 У лиственницы, ели и пихты (видов I группы) при низкотемпературной адаптации синтезируются водорастворимые белки с высокой антинуклеационной активностью, обеспечивающие переохладение цитоплазматических растворов на 15÷25 °С ниже точки плавления и соответственно возможность оттока из меристематических клеток переохлажденной воды к внеорганическим зонам льдообразования, удаленным от меристем на значительное расстояние. В то же время в условиях льдообразования и концентрирования внутриклеточных растворов часть водорастворимых белков адсорбируется поверхностями клеточных органелл, придавая им антинуклеационные свойства и повышая водоудерживающую способность. Водорастворимые белки, синтезирующиеся весной, также обладают антинуклеационной активностью.

12 Низкомолекулярные водорастворимые соединения снижают температуру (точку) плавления при обезвоживании и концентрировании внутриклеточных рас-

творов на $2\div 15$ °С. Обеспечиваемый уровень переохлаждения цитозоля ($3\div 4$ °С) позволяет сосне и кедру (видам II группы) своевременно эвакуировать из меристематических клеток основную массу способной к кристаллизации внутриклеточной воды к близко расположенным внеклеточным зонам льдообразования.

Практические рекомендации:

1 Основные результаты исследования состава и свойств белков и липидов меристем почек морозоустойчивых хвойных древесных растений используются в ГОУ ВПО «Сибирский государственный технологический университет» с 2008 г. в процессе преподавания курса «Биохимия растений» для бакалавров по направлению 240100 Химическая технология и биотехнология (подтверждено актом о внедрении).

2 Рекомендовать дендрарию при Институте леса СО РАН им. В.Н. Сукачёва, кафедре селекции и озеленения и Ботаническому саду им. В.М. Крутовского ФГБОУ ВПО «Сибирский государственный технологический университет», занимающимся вопросами интродукции древесных видов в северные регионы, проводить отбор хвойных древесных растений, имеющих следующие биохимические показатели:

- высокий уровень водорастворимых белков цитоплазмы, синтезирующихся при адаптации к низким температурам;

- высокий уровень орнитина и γ -аминомасляной кислоты (при низком содержании водорастворимых белков цитоплазмы в зимний период);

- высокое соотношение белок/липид в клеточных мембранах зимующих меристем (в пределах $3,5/1 - 2/1$).

Список основных работ, опубликованных по теме диссертации.

Монографии:

- 1 Миронов, П.В. Низкотемпературная устойчивость живых тканей хвойных: монография / П.В. Миронов, Е.В. Алаудинова, С.М. Репях. – Красноярск : СибГТУ, 2001. – 221 с.
- 2 Алаудинова, Е.В. Хвойные Сибири в условиях низкотемпературной адаптации: структурно-химические изменения липидов: монография / Е.В. Алаудинова, П.В. Миронов. – Красноярск : СибГТУ, 2009. – 175 с.

Статьи в изданиях, рекомендованных ВАК РФ:

- 3 Левин, Э.Д. Глицериды и фосфолипиды камбиальной зоны лиственницы сибирской / Э.Д. Левин, Л.П. Рубчевская, Е.В. Вол // Химия древесины. – 1983. – № 4. – С. 97-100.
- 4 Вол, Е.В. Методика выделения фосфолипидов из камбиальной зоны лиственницы сибирской и определение их группового состава / Е.В. Вол, Э.Д. Левин // Химия древесины. – 1984. – № 1. – С. 99-101.
- 5 Алаудинова, Е.В. Жирные кислоты мембранных липидов живых тканей почек лиственницы сибирской / Е.В. Алаудинова, П.В. Миронов, С.М. Репях // Химия растительного сырья. – 2000. – № 2. – С. 41-45.
- 6 Характеристика мембранного комплекса живых тканей лиственницы сибирской / Е.В. Алаудинова [и др.] // Химия растительного сырья. – 2000. – № 4. – С. 49-53.
- 7 Алаудинова, Е.В. Характеристика липидов меристем почек *Larix sibirica* / Е.В. Алаудинова, П.В. Миронов, С.М. Репях // Химия природных соединений. – 2002. – № 4. – С. 259-262.
- 8 Алаудинова, Е.В. Характеристика белков меристем почек *Pinus sylvestris* L. / Е.В. Алаудинова, П.В. Миронов, Ю.С. Шимова // Химия растительного сырья. – 2002. – № 4. – С. 25-29.

- 9 Alaudinova, E.V. Lipids Characterization of Buds Meristems of *Larix sibirica* / E.V. Alaudinova, P.V. Mironov, S.M. Repyakh // Chemistry of Natural Compounds. – 2002. – V. 38, N4. – P. 310-313.
- 10 Физико-химические свойства криозащитных белков меристем зимующих почек ели и пихты / Е.В. Алаудинова [и др.] // Лесной журнал. – 2003. – № 6. – С. 75-81.
- 11 Алаудинова, Е.В. Характеристика белков меристем ели и пихты в условиях низкотемпературной устойчивости / Е.В. Алаудинова, П.В. Миронов, Ю.С. Шимова // Химия растительного сырья. – 2006. – № 2. – С. 33-36.
- 12 Фракционный состав водорастворимых цитоплазматических белков меристем зимующих почек ели и пихты / Е.В. Алаудинова [и др.] // Хвойные бореальной зоны. – 2006. – № 2. – С. 228-231.
- 13 Белки цитоплазмы меристем почек ели: динамика аминокислотного состава / Е.В. Алаудинова [и др.] // Химия растительного сырья. – 2007. – № 4. – С. 95-100.
- 14 Алаудинова, Е.В. Сезонные изменения содержания воды в меристематических тканях почек *Picea obovata* L. и *Pinus sylvestris* L. и её распределение в клетках / Е.В. Алаудинова, С.Ю. Симкина, П.В. Миронов // Хвойные бореальной зоны. – 2007. – № 4-5. – С. 487-491.
- 15 Поваляева, В.А. Особенности состава фосфолипидов живых тканей хвойных в условиях низкотемпературной адаптации / В.А. Поваляева, Е.В. Алаудинова // Вестник КрасГАУ. – 2008. – Вып.15. – С. 207-211.
- 16 Алаудинова, Е.В. Сезонно-климатические аспекты метаболизма лесообразующих хвойных видов Красноярского края / Е.В. Алаудинова, П.В. Миронов // Вестник МАНЭБ. – 2009. – № 6. – С. 197-202.
- 17 Симкина, С.Ю. Высокомолекулярные водорастворимые белки меристем зимующих почек ели в климатических условиях Красноярского края / С.Ю. Симкина, Е.В. Алаудинова // Вестник МАНЭБ. – 2009. – № 6. – С. 202-205.
- 18 Поваляева, В.А. Молекулярная структура фосфатидилэтаноламинов и фосфатидилсериинов зимующих почек *Pinus silvestris* L. / В.А. Поваляева, Е.В. Алаудинова // Вестник МАНЭБ. – 2009. – № 6. – С. 192-197.
- 19 Алаудинова, Е.В. Липиды меристем лесообразующих хвойных пород Центральной Сибири в условиях низкотемпературной адаптации 1. Характеристика состава жирных кислот фосфолипидов зимующих меристем *Larix sibirica* L., *Picea obovata* L. и *Pinus sylvestris* L. / Е.В. Алаудинова, П.В. Миронов // Химия растительного сырья. – 2009. – № 2. – С. 69-74.
- 20 Алаудинова, Е.В. Липиды меристем лесообразующих хвойных пород Центральной Сибири в условиях низкотемпературной адаптации 2. Особенности метаболизма жирных кислот фосфолипидов меристем *Larix sibirica* L., *Picea obovata* L. и *Pinus sylvestris* L. / Е.В. Алаудинова, П.В. Миронов // Химия растительного сырья. – 2009. – № 2. – С. 75-80.
- 21 Алаудинова, Е.В. Сравнительная характеристика липидов меристем почек *Picea obovata* L. и *Pinus sylvestris* L. / Е.В. Алаудинова, П.В. Миронов // Химия природных соединений. – 2009. – № 6. – С. 666-669.
- 22 Алаудинова, Е.В. Особенности обмена глицеридов меристем почек *Larix sibirica* L. / Е.В. Алаудинова, П.В. Миронов // Хвойные бореальной зоны. – 2009. – № 6. – С. 288-291.
- 23 Alaudinova, E.V. Comparative characterctics of Bud Meristems Lipids from *Picea obovata* and *Pinus sylvestris* / E.V. Alaudinova, P.V. Mironov// Chemistry of Natural Compounds. – 2009. – V. 45, N 6. – P. 792-795.
- 24 Алаудинова, Е.В. Исследование молекулярной структуры фосфатидилэтаноламинов и фосфатидилсериинов меристем почек *Picea obovata* L. в период низкотемпературной устойчивости / Е.В. Алаудинова, П.В. Миронов, В.А. Поваляева // Вестник КрасГАУ. – 2010. – Вып. 1. – С. 104-108.

- 25 Алаудинова, Е.В. 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 // Сибирский экологический журнал – 2010. – № 2. – С. 227-333.
- 26 Алаудинова, Е.В. Сравнительная характеристика водорастворимых белков меристем почек *Larix sibirica* L., *Picea obovata* L. и *Abies sibirica* L. / Е.В. Алаудинова, П.В. Миронов // Химия природных соединений. – 2010. – № 3. – С. 364-358.
- 27 Alaudinova, E.V. Lipids of the Meristems of the Main Coniferous Edificators from Central Siberia under Low-Temperature Adaptation: 1. The Characteristics of the Fatty Acid Composition of Phospholipids from Winter Meristems of *Larix sibirica* L., *Picea obovata* L., and *Pinus sylvestris* L. / E.V. Alaudinova, P.V. Mironov // Russian Journal of Bioorganic Chemistry. – 2010. – V. 36, N7. – P. 1-5.
- 28 Алаудинова, Е.В. Липиды меристем лесообразующих хвойных пород Центральной Сибири в условиях низкотемпературной адаптации 3. Особенности обмена нейтральных липидов меристем почек *Larix sibirica* L., *Picea obovata* L. и *Pinus sylvestris* L. / Е.В. Алаудинова, П.В. Миронов // Химия растительного сырья. – 2010. – № 1. – С. 67-74.
- 29 Alaudinova, E.V. Water-Soluble Substances in Meristematic Bud of *Picea obovata* L. and *Pinus sylvestris* L.: Concentrations, Composition and Properties during the Development of Freezing Tolerance / E.V. Alaudinova, S.Yu. Simkina, P.V. Mironov // Siberian Journal of Ecology. – 2010. – V. 17, N 2. – P. 327-333.
- 30 Alaudinova, E.V. Comparative characteristics of water-soluble proteins from *Larix sibirica*, *Picea obovata* and *Abies sibirica* Bud Meristems / E.V. Alaudinova, P.V. Mironov // Chemistry of Natural Compounds. – V. 46, N 3. – 2010. – P. 430-435.
- 31 Alaudinova, E.V. Lipids of the Meristems of the Main Coniferous Edificators from Central Siberia under Low-Temperature Adaptation: 2. Features of the Fatty Acid Metabolism of Phospholipids from Winter Meristems of *Larix sibirica* Ledeb., *Picea obovata* L., and *Pinus sylvestris* L. / E.V. Alaudinova, P.V. Mironov // Russian Journal of Bioorganic Chemistry. – 2010. – V. 36, N 7. – P. 29-34.
- 32 Алаудинова, Е.В. Фенологические особенности обмена гликолипидов в меристемах почек *Pinus sylvestris* L. / Е.В. Алаудинова, П.В. Миронов // Вестник КрасГАУ. – 2011. – Вып. 4. – С. 35-38.

Статьи в сборниках всероссийских и международных научных конференций:

- 33 Алаудинова, Е.В. Эколого-физиологические особенности адаптации живых тканей почек сосны и ели к низким температурам / Е.В. Алаудинова, П.В. Миронов, В.А. Поваляева // Непрерывное экологическое образование и экологические проблемы: матер. всерос. науч. конф. – Красноярск, 2004. – С. 57-61.
- 34 Алаудинова, Е.В. Сезонная динамика липидного матрикса меристем почек хвойных при адаптации к низким температурам / Е.В. Алаудинова, П.В. Миронов, В.А. Поваляева // Современная физиология растений: от молекул до экосистем: матер. междунар. конф. – Сыктывкар, 2007. – С. 323-324.
- 35 Алаудинова, Е.В. Аминокислотный состав фракций водорастворимых белков цитоплазмы меристем почек *Picea obovata* L. в зимний период / Е.В. Алаудинова, П.В. Миронов, С.Ю. Симкина // Современная физиология растений: от молекул до экосистем: матер. междунар. конф. – Сыктывкар, 2007. – С. 368-369.
- 36 Алаудинова, Е.В. Сезонные изменения фосфолипидов меристем *Larix sibirica* L. / Е.В. Алаудинова, П.В. Миронов // Дендрозэкология и лесоведение: матер. всерос. конф. – Красноярск, 2007. – С. 17-20.
- 37 Алаудинова, Е.В. Вододерживающие свойства меристематических клеток зимующих хвойных: роль низкомолекулярных водорастворимых соединений / Е.В. Алаудинова,

- П.В. Миронов // Новые достижения в химии и химической технологии растительного сырья: матер. всерос. конф. – Барнаул, 2009. – Ч.2. – С. 284-288.
- 38 Алаудинова, Е.В. Особенности трансформации состава индивидуальных жирных кислот типа C_{18} в структуре фосфолипидов меристем хвойных Центральной Сибири / Е.В. Алаудинова, П.В. Миронов // Новые достижения в химии и химической технологии растительного сырья: матер. всерос. конф. – Барнаул, 2009. – Ч.2. – С. 134-138.
- 39 Алаудинова, Е.В. Изменение состава гидрофильных водорастворимых белков цитоплазмы меристематических клеток хвойных при низкотемпературной адаптации / Е.В. Алаудинова, С.Ю. Симкина, П.В. Миронов // Физико-химические основы структурно-функциональной организации растений: тез. докл. междунар. науч. конф. – Екатеринбург, 2008. – С. 364-365.
- 40 Алаудинова, Е.В. Липидный состав живых тканей хвойных как показатель их адаптивных возможностей к низкотемпературному стрессу / Е.В. Алаудинова, В.А. Поваляева, П.В. Миронов // Физико-химические основы структурно-функциональной организации растений: тез. докл. междунар. науч. конф. – Екатеринбург, 2008. – С. 334-335.
- 41 NMR microimaging application for investigation of water distribution in Siberian larch wintering bud tissues / E.V. Alaudinova [et al] // Nuclear Magnetic Resonance in Condensed Matter. 6th meeting: NMR in Heterogeneous Systems: International Symposium and Summer School in Saint Petersburg. – Saint Petersburg, Russia, 2009. – P. 7.
- 42 Алаудинова, Е.В. Особенности метаболизма мембранных липидов в меристемах сосны обыкновенной: сезонная динамика жирных кислот типа C_{18} / Е.В. Алаудинова, П.В. Миронов // Химия и технология растительных веществ: тез. докл. VI всерос. науч. конф. – Санкт-Петербург, 2010. – С. 6.
- 43 Алаудинова, Е.В. Характеристика белков комплекса клеточных мембран живых тканей почек сосны обыкновенной и ели сибирской / Е.В. Алаудинова, П.В. Миронов, Ю.С. Шимова // Химия и технология растительных веществ: тез. докл. VI всерос. науч. конф. – Санкт-Петербург, 2010. – С. 219.

В работе приняты следующие сокращения:

а.с.м. – абсолютно сухая масса	НМС – низкомолекулярные соединения
ВМС – высокомолекулярные соединения	ПБ – периферические белки
ВРБЦ – водорастворимые белки цитоплазмы	ПНЖК – полиненасыщенные жирные кислоты
ВРВ – водорастворимые вещества цитоплазмы	СА – свободные аминокислоты
ВУ – водорастворимые углеводы	СХДГ – сульфохиновозилдиацилглицерин
ГЛ – гликолипиды	ФГ – фосфатидилглицерин
ДГДГ – дигалактозилдиацилглицерин	ФИ – фосфатидилинозит
ЖК – жирные кислоты	ФК – фосфатидная кислота
ИБ – интегральные белки	ФЛ – фосфолипиды
ККМ – комплекс клеточных мембран	ФС – фосфатидилсерин
КМ – клеточные мембраны	ФХ – фосфатидилхолин
КС – клеточные стенки	ФЭ – фосфатидилэтаноламин
МГДГ – моногалактозилдиацилглицерин	

*Сдано в производство 14.07.2011.
Формат 60x84 1/16. Усл. печ. л. 2.
Изд. № 5/6. Заказ №1200. Тираж 100 экз.*

*Редакционно-издательский центр СибГТУ
660049. г. Красноярск, пр. Мира, 82*