

АКТИВНОСТЬ ПЕРОКСИДАЗЫ В ЛИСТЬЯХ ВИНОГРАДА ПРИ ВЫСОКОТЕМПЕРАТУРНОМ СТРЕССЕ*

Ненько Н.И., д-р с.-х. наук, **Киселева Г.К.**, канд. биол. наук, **Ильина И.А.**, д-р техн. наук,
Соколова В.В., канд. с.-х. наук, **Запорожец Н.М.**, канд. с.-х. наук,
Петров В.С., д-р с.-х. наук, **Караваева А.В.**, **Схляхо Т.В.**

*Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Северо-Кавказский
федеральный научный центр садоводства, виноградарства, виноделия»
(Краснодар)*

Реферат. Изучена активность пероксидазы в листьях винограда различных сортов в нормальных условиях вегетации летнего периода и при искусственном прогревании листьев при 45 °С. Показано что повышение активности пероксидазы играет важную роль в сбалансированности окислительных процессов в растении. Активность фермента пероксидазы предложена в качестве дополнительного диагностического показателя устойчивости сортов винограда к высоким температурам.

Ключевые слова: виноград, сорт, устойчивость, активность пероксидазы, высокие температуры

Summary. The activity of peroxidase in the leaves of various grape varieties was studied under normal summer conditions of vegetation and when the leaves were heated at 45 °C. It is shown that an increase in the peroxidase activity has an important means in the balance of oxidative processes in the plant. The activity of the peroxidase enzyme was proposed as an additional diagnostic indicator of the resistance of grape varieties to high temperatures.

Key words: grapes, variety, resistance, peroxidase activity, high temperatures

Введение. Устойчивость к высоким температурам – важная составляющая адаптивного потенциала регионального сортимента винограда [1]. В связи с этим детальное изучение механизмов устойчивости растений к высоким температурам (жаростойкости) необходимо для разработки методов диагностики устойчивости и выявления наиболее жаростойких сортов винограда. Развитие жароустойчивости растений, адаптация к повышенным температурам связаны с повышением активности антиоксидантных ферментов, в частности пероксидазы. Пероксидазы относятся к наиболее распространенным растительным ферментам. По своей природе это гемсодержащие гликопротеиды, которые кодируются большим количеством генов. Их функции связывают с необходимостью защиты растений от высокого уровня перекисных соединений, утилизацией активных форм кислорода (АФК) и переводом токсических фенольных соединений в биополимеры – лигнин и суберин [2-5]. Особо следует выделить компенсаторное влияние пероксидаз на уровень АФК в условиях их повышения под воздействием различных стрессовых факторов, в том числе высоких температур [6-8].

Роли фермента пероксидазы в устойчивости растений к различным стрессам посвящено большое количество работ, однако ее участие в защитных реакциях продолжает привлекать внимание многих исследователей, так как повышение активности фермента коррелирует с устойчивостью, запрограммированной самим организмом [9]. Несмотря на обширную литературу, посвященную функционированию пероксидаз, очень немного известно о регуляторных или компенсаторных механизмах функционирования пероксидазы у винограда.

* Исследование выполнено при финансовой поддержке Кубанского научного фонда в рамках научного проекта № МФИ-20.1/19

Цель настоящей работы – изучить активность пероксидазы в условиях искусственно моделируемого высокотемпературного стресса у различных сортов винограда.

Объекты и методы исследований. Исследования проводились в 2020 году на базе ампелографической коллекции ФГБНУ АЗОСВиВ, расположенной в г. Анапа, квартал технических сортов винограда на черноземе южном карбонатном, а также ЦКП «Приборно-аналитический» и лаборатории физиологии и биохимии ФГБНУ СКФНЦСВВ. Растения 1995 года посадки, подвой Кобер 5ББ. Формировка – двусторонний высокоштамбовый спиральный кордон АЗОС. Схема посадки 2,5х3,0 м.

Объектами исследований являлись сорта – межвидовые гибриды винограда различного эколого-географического происхождения: Кристалл (контроль), евро-американского происхождения; Красностоп, Достойный, евро-американского происхождения; Восторг, амуро-американского происхождения; Зариф, восточно-европейского происхождения; Алиготе, западно-европейского происхождения. Для исследований ежемесячно в течение летнего вегетационного периода отбирали полностью сформированные листья с трех кустов винограда каждого сорта в 5-кратной повторности. Для моделирования высокотемпературного стресса листья выдерживали в термостате в течение 2 часов при температуре +45 °С в стаканах с дистиллированной водой.

Содержание малонового диальдегида определяли по реакции с тиобарбитуровой кислотой (ТБК) [10]. Определение активности пероксидазы проводили по модифицированному методу Бояркина, основанному на определении скорости реакции окисления бензидина под действием фермента, содержащегося в тканях за определенный промежуток времени (1мин) [11]. Экспериментальные данные обрабатывали с помощью общепринятых методов вариационной статистики [12].

Обсуждение результатов. В течение летнего вегетационного периода 2020 г. среднемесячные температуры воздуха в июне составляли 22,3 °С, максимальная температура воздуха поднималась до +33 °С, минимальная опускалась до +13 °С. Наиболее жарким и засушливым был июль, когда среднемесячные температуры воздуха составляли 26 °С, максимальная температура поднималась до +35 °С, минимальная опускалась до +19 °С. В августе среднемесячная температура воздуха составляла 25 °С, максимальная – до +36 °С, минимальная – до +16 °С. Среднемесячное количество выпавших осадков в июне составляло 7,7 мм; в июле 2,3 мм, в августе 2,7 мм (рис. 1).

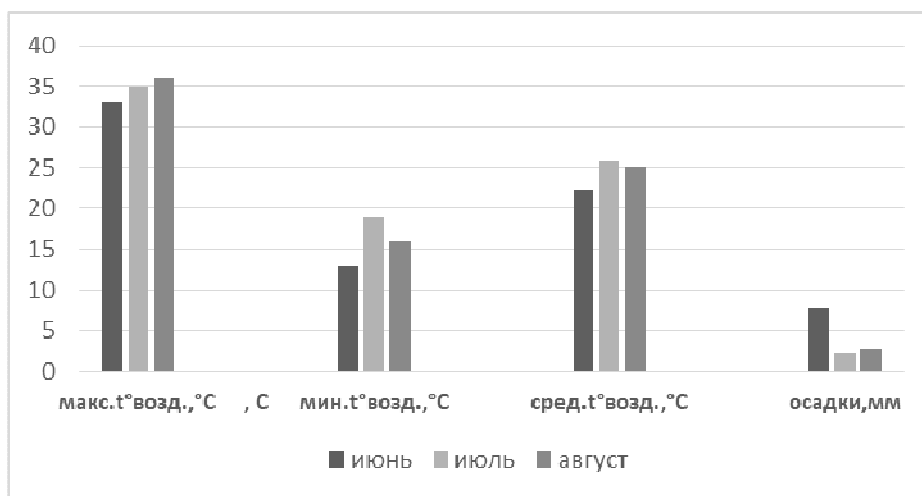


Рис.1. Гидротермические условия анапо-таманской зоны в летний период 2020 г.

Известно, что основной причиной повреждения растений при повышенных температурах являются нарушения структуры и функций клеточных мембран, в состав которых входят липиды. Интенсивность перекисного окисления липидов мембран – важный показатель физиологического состояния растительного организма и его ответной реакции на высокотемпературный стресс [13].

Об интенсивности перекисного окисления липидов (ПОЛ) мембран можно судить по содержанию малонового диальдегида (МДА). В июне минимальный конститутивный уровень малонового диальдегида отмечен у сортов винограда Достойный и Кристалл – 0,06 мкмоль/г сырого веса, свидетельствующий о повышенной устойчивости этих сортов. У сорта Зариф он был выше в 3 раза и составлял 0,18 мкмоль/г сырого веса (рис. 2). После воздействия высокотемпературного стресса содержание малонового диальдегида у изучаемых сортов увеличилось в 1,06-2,7 раз в зависимости от сорта. В меньшей степени содержание МДА увеличилось у сортов Восторг и Зариф (в 1,06), проявивших устойчивость в июне.

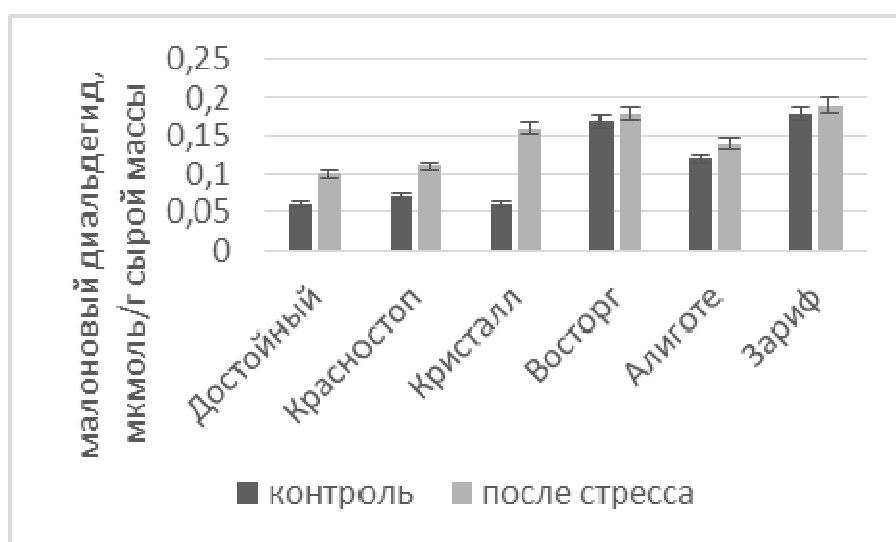


Рис. 2. Содержание малонового диальдегида в листьях винограда в июне.
НСР_{0,5}: контроль – 0,01; после стресса – 0,06.

В июле содержание малонового диальдегида у растений изучаемых сортов винограда повысилось в сравнении с июнем, что связано с реакцией растений винограда на повышенные температуры и недостаток осадков. Минимальный уровень содержания малонового диальдегида до стрессового воздействия отмечен у сорта Красностоп – 0,4 мкмоль/г сырого веса, максимальный у сорта Кристалл – 0,78 мкмоль/г сырого веса (рис. 3). После высокотемпературного стресса содержание МДА у изучаемых виноградных растений увеличилось в 1,01-1,52 раз в зависимости от сорта, в меньшей степени – у сорта Достойный (в 1,01 раз), выделенного в июле как устойчивый.

Если в июне искусственно вызванный температурный стресс увеличил содержание малонового диальдегида у растений винограда максимально в 2,7 раз, то в июле – только до 1,52 раза, что свидетельствует о метаболических перестройках в листовых тканях, приведших к адаптации мембранных структур к повреждениям.

В августе конститутивный уровень содержания малонового диальдегида несколько снизился, в сравнении с июлем, и составлял 0,16-0,26 мкмоль/г сырого веса. Минимальный его уровень до стрессового воздействия отмечен у сорта Красностоп – 0,16 мкмоль/г сырого веса, максимальный у сорта Достойный – 0,26 мкмоль/г сырого веса (рис. 4). По-

сле высокотемпературного воздействия стресса у винограда Алиготе, выделенного как самый устойчивый в августе, содержание малонового диальдегида в листьях не изменилось. У остальных изучаемых сортов его содержание увеличилось в 1,13-1,7 раза.

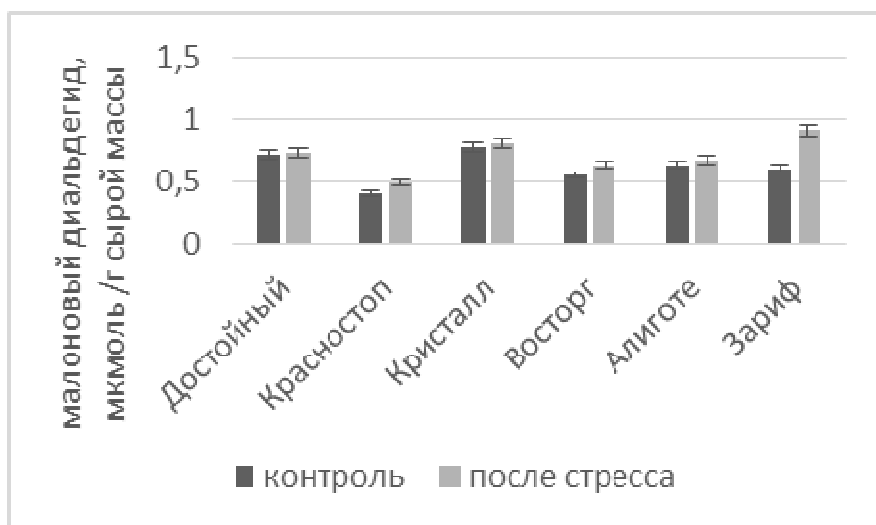


Рис. 3. Содержание малонового диальдегида в листьях винограда в июле.
НСР_{0,5}: контроль – 0,02; после стресса – 0,04.

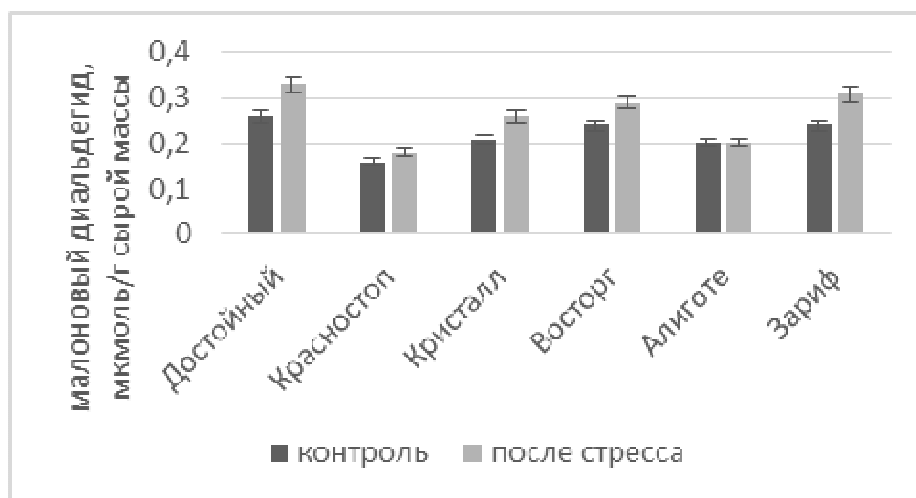


Рис.4. Содержание малонового диальдегида в листьях винограда в августе.
НСР_{0,5}: контроль – 0,01; после стресса – 0,03.

Нарушение структуры и функций мембран в результате действия высоких температур способствует накоплению активных форм кислорода и развитию окислительного стресса. Ключевую роль в предотвращении повреждений окислительного характера играют системы дезактивации АФК, в которой важная роль отводится пероксидазе [14, 15].

В июне низкая интенсивность окислительных процессов и, как следствие, минимальный уровень малонового диальдегида, отмеченный у сорта Достойный, объясняется высокой конституционной активностью пероксидазы – 0,592 у.е./мг белка (табл.). После стрессового воздействия высокой температурой активность пероксидазы в листьях данного сорта снизилась в связи с обезвреживанием гидроперекисей в 29,6 раза, а у остальных

сортов – в 0,95-11,4 раза. Таким образом, у сорта Достойный высокий конституционный уровень активности пероксидазы играет важную роль в сбалансированности окислительных процессов до и после высокотемпературного воздействия.

Таблица – Активность пероксидазы в листьях винограда при моделировании высокотемпературного стресса (усл. ед./мг белка)

Сорт	До стресса			После стресса		
	июнь	июль	август	июнь	июль	август
Достойный	0,592±0,001	0,73±0,016	0,32±0,03	0,02±0,001	0,01±0,001	0,07±0,01
Красностоп	0,162±0,006	0,49±0,006	2,57±0,02	0,04±0,006	2,43±0,095	2,26±0,11
Кристалл	0,169±0,002	0,81±0,018	0,10±0,00	0,02±0,001	0,05±0,001	0,36±0,05
Восторг	0,077±0,032	0,63±0,014	0,11±0,01	0,02±0,000	0,04±0,001	0,11±0,00
Алиготе	0,114±0,012	0,63±0,011	0,12±0,01	0,01±0,001	0,15±0,003	0,15±0,02
Зариф	0,019±0,001	0,60±0,012	0,35±0,02	0,02±0,001	0,04±0,001	0,05±0,00
НСР _{0,05}	0,002	0,011	0,024	0,001	0,053	0,016

В июле наблюдался пик пероксидазной активности в тканях листьев растений винограда. В ответ на жаркие и засушливые условия активность фермента пероксидазы у всех изучаемых сортов повысилась. При действии искусственно вызванного высокотемпературного стресса уровень активности данного фермента снижался в связи с ее антиоксидантной функцией. У сорта Достойный активность пероксидазы снизилась в 73,1 раза, остальных сортов – в 4,2-16,2 раза.

В августе пероксидазная активность в листьях растений винограда несколько снизилась в сравнении с июлем – в 0,5-8 раз в зависимости от сорта. После воздействия температурного стресса показатель активности пероксидазы изменялся разнонаправленно: у сортов Достойный и Зариф уменьшался, у сорта Восторг изменений не наблюдалось, остальных сортов пероксидазная активность увеличивалась в 0,27-0,8 раза.

Выводы. Проведены сравнительные исследования стабильности клеточных мембран листовых тканей винограда в нормальных условиях летнего вегетационного периода и в условиях искусственно вызванного высокотемпературного стресса (прогревание листьев при 45 °С). Установлено, что при действии повышенных летних температур низкая интенсивность окислительных процессов, оцениваемая по содержанию малонового диальдегида, поддерживается за счет возрастания активности пероксидазы.

Наиболее устойчивыми к высоким температурам по содержанию малонового диальдегида и активности пероксидазы в июне были сорта винограда Достойный и Кристалл; в июле и августе – сорт Красностоп. У сорта Достойный высокий конститутивный уровень активности пероксидазы играет важную роль в сбалансированности окислительных процессов как в нормальных, так и в стрессовых условиях. Показано, что у этого сорта при действии искусственно вызванного высокотемпературного стресса уровень активности пероксидазы снижался в связи с ее антиоксидантной функцией в 73,1 раза; у остальных изучаемых сортов – в 4,2-16,2 раза.

Полученные результаты указывают на вовлечение пероксидазы в ответную реакцию на действие высокой температуры, что позволяет изменению ее активности служить дополнительным диагностическим показателем устойчивости сортов винограда к высоким температурам.

Литература

1. Закономерности адаптации сортов винограда к абиотическим и биотическим стрессорам летнего периода [Электронный ресурс] / Н.И. Ненько [и др.]. // Плодоводство и виноградарство Юга России. 2017. № 45(3). С. 49-64. URL: <http://journalkubansad.ru/pdf/17/03/05.pdf>. (дата обращения: 02.02.2021)
2. Smirnoff N. Antioxidants and Reactive Oxygen Species in Plants. – John Wiley & Sons, 2008. – 320 с.
3. Газарян И.Г., Хушпульян Д.М., Тишков В.И. Особенности структуры и механизма действия пероксидаз растений // Успехи биологической химии. 2006. Т. 46. С. 303-322.
4. Filimon R.V., Rotaru L., Filimon R.M. Quantitative investigation of leaf photosynthetic pigments during annual biological cycle of *Vitis vinifera* L. table grape cultivars // South African Journal of Enology and Viticulture. – 2016. – № 37 (1). – P. 1-14. scielo.org.za
5. Колупаев Ю.Е. Антиоксиданты растительной клетки, их роль в АФК-сигналинге и устойчивости растений // Успехи соврем. биологии. 2016. Т. 136. № 2. С. 181-198
6. Минибаева Ф.В., Гордон Л.Х. Продукция супероксида и активность внеклеточной пероксидазы в растительных тканях при стрессе // Физиология растений. 2003. Т. 50. С. 459-464.
7. Прадедова Е.В., Ишеева О.Д., Саляев Р.К. Классификация системы антиоксидантной защиты как основа рациональной организации экспериментального исследования окислительного стресса у растений // Физиология растений. 2011. Т. 59. С.177-185.
8. Noctor G., Mhamdi A., Foyer C.H. The roles of reactive oxygen metabolism in drought: not so cut and dried // Plant. [Physiol](#)[K1][B2]. – 2014. – V. 164. – P. 1636-1648.
9. Активность, изоферментный спектр пероксидаз и дегидрины некоторых видов растений, произрастающих на берегах озера Байкал при абиотическом стрессе / М.А. Живетьев [и др.] // Journal of Stress Physiology & Biochemistry. – 2010. – V.6.– № 4. – P. 42-50.
10. Ненько Н.И., Киселева Г.К. Физиолого-биохимические методы оценки сортов плодовых культур для адаптивной селекции и промышленного возделывания // Современные методология, инструментарий оценки и отбора селекционного материала садовых культур и винограда. Краснодар, 2017. С. 66-78.
11. Методы биохимического исследования растений / А.И. Ермаков [и др.]. Л.: Агропромиздат. 1987. С. 41-45.
12. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов исследований). М., 1979. 463 с.
13. Yamauchi Y., Furutera K., Seki Y., Toyoda K., Tanaka A., Sugimoto Y. Malondialdehyde generated from peroxidized linolenic acid causes protein modification in heat-stressed plants // Plant Physiol. and Biochem. – 2008. – V. 46. – P. 786-793.
14. Almeselmani M., Deshmukh P.S., Sairam R.K. et. al. Protective role of antioxidant enzymes under high temperature stress // Plant Science. – 2006. – V.171. – P. 382-388.
15. Рогожин В. В. Пероксидаза как компонент антиоксидантной системы живых организмов. СПб.: ГИОРД, 2004, 240 с.