

МЕТАБОЛОМНАЯ ОЦЕНКА СОРТОВ ЯБЛОНИ РАЗЛИЧНОГО ЭКОЛОГО-ГЕОГРАФИЧЕСКОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ В УСЛОВИЯХ НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОГО СТРЕССА

Ненько Н.И., д-р с.-х. наук, Киселева Г.К., канд. биол. наук,
Ульяновская Е.В., д-р с.-х. наук, Мишко А.Е., Караваева А.В.

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

Реферат. Представлены результаты физиолого-биохимических исследований сортов яблони различного эколого-географического происхождения на основе метаболомной оценки экспрессии генотипа. Выявлена сезонная динамика содержания отдельных метаболитов (белков, крахмала, сахарозы, пролина, малонового диальдегида, фенолкарбоновых кислот) при адаптации растений яблони к низким температурам. Выделены сорта, обладающие устойчивостью к низкотемпературным стрессам зимнего периода, перспективные для возделывания в южном регионе России.

Ключевые слова: яблоня, метаболом, низкотемпературный стресс, адаптация, белок, малоновый диальдегид

Summary. The results of physiological and biochemical study of apple varieties of different ecological and geographical origin on the basis of metabolome assessment of genotype expression are presented. Seasonal dynamics of individual metabolite content (proteins, starch, sucrose, proline, malon dialdehyde, phenol carboxylic acids) in the process of adaptation of apple plants to low temperatures was revealed. The varieties with resistance to low-temperature stresses of the winter period, promising for cultivation in the Southern region of Russia, are identified.

Key words: apple-tree, metabolome, low temperature stress, adaptation, protein, malonic dialdehyde

Введение. Способность плодовых растений к выживанию в неблагоприятных экологических условиях в значительной степени определяется наличием системы адаптационных реакций, которые связаны с глубокими изменениями в обмене веществ [1-3]. Среди абиотических факторов, действующих на растение, особое место принадлежит температуре. Так, особенности действия температурного фактора различной интенсивности на устойчивость растений проявляются в изменении направленности физиолого-биохимических процессов, связанных с различными сторонами метаболизма [4-6]. Метаболом представляет собой совокупность всех метаболитов, являющихся конечным продуктом обмена веществ в клетке, ткани, органе или организме. По установленной сезонной динамике содержания отдельных метаболитов (белков, крахмала, сахарозы, пролина, малонового диальдегида, фенолкарбоновых кислот) возможно судить об интенсивности физиолого-биохимических изменений, происходящих в тканях плодовых растений в процессе адаптации их к низким температурам.

Метаболомная оценка по физиолого-биохимическим характеристикам позволяет получить более надежную оценку генотипов плодовых на устойчивость к неблагоприятным погодно-климатическим условиям зимнего периода и адаптивность, и может быть использована в качестве косвенных методов диагностики сортов на морозостойкость. Данный подход обес-

печит возможность повышения результативности и эффективности осуществления ускоренного отбора сортов яблони, перспективных для возделывания в южном регионе России.

Цель настоящей работы – провести метаболомную оценку сортов яблони различного эколого-географического происхождения в условиях низкотемпературного стресса, выделить сорта, обладающие устойчивостью к низким температурам зимнего периода.

Объекты и методы исследований. Объектами исследований служили сорта яблони различного эколого-географического происхождения: Айдаред (США), Лигол (Польша), Прикубанское (Россия, СКЗНИИСиВ) 2009 года посадки на подвое СК 4 при схеме посадки 0,9х4,5; сорта Рассвет (2п=2х), Фортуна (2п=2х), Союз (2п=3х), Родничок (2п=3х) (Россия, СКЗНИИСиВ) 2000 г. посадки на подвое М 9 при схеме посадки 2х5; сорта Эрли Мак (2п=2х) (США), Дейтон (2п=2х) (США), Пирс (Германия) 1998 г. посадки на подвое М 9 при схеме посадки 2х5.

Сбор материала для физиолого-биохимических исследований проводился на базе ЗАО ОПХ «Центральное», ФГБНУ СКЗНИИСиВ, г. Краснодар. Использованы современные высокоточные физиолого-биохимические методы исследования водного обмена, содержания фенолкарбоновых, аскорбиновой, абсцизовой кислот, пероксидазы, малонового диальдегида, пролина, сахарозы, белков, антоцианов, халконов, катионов с применением высокоэффективного аналитического оборудования на базе ЦКП «Приборно-аналитический» и лаборатории физиологии и биохимии растений ФГБНУ СКЗНИИСиВ [7-9]. Полученные экспериментальные данные обрабатывали с помощью общепринятых методов вариационной статистики [10].

Обсуждение результатов. При оценке гидротермических условий за 2015-2018 гг. установлено, что в декабре максимальная температура воздуха увеличивается с +12 °С до +16 °С, а минимальная температура воздуха повышалась с -17 °С до -4 °С. В январе 2018 г. минимальная температура воздуха повышалась от -19 °С до -8 °С, а максимальная температура за анализируемый период снизилась на 7 °С и составила 12 °С (рис. 1).

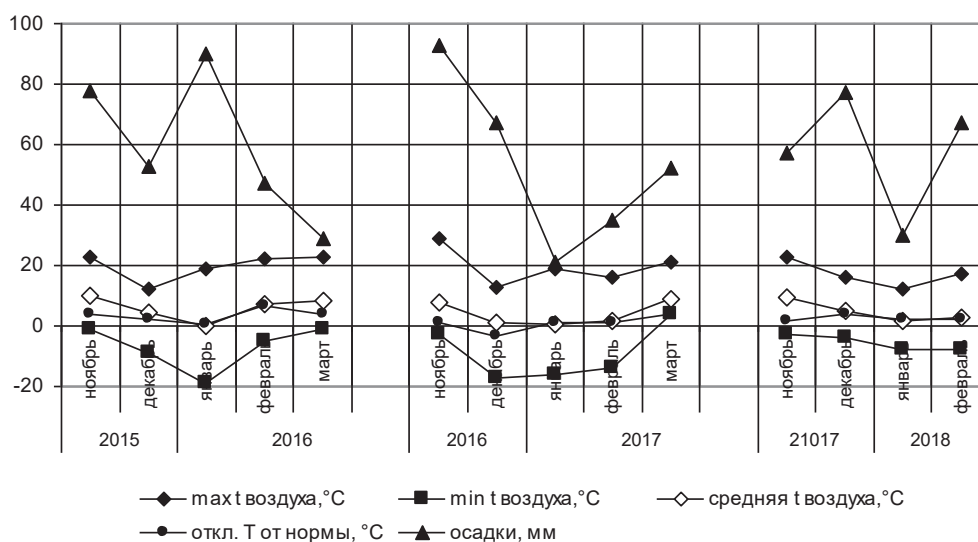


Рис. 1. Гидротермические условия зимы 2015-2018 гг., ОПХ «Центральное»

Центральным звеном метаболизма, как известно, является тотальный синтез белка, который можно рассматривать в качестве маркера изменения активности метаболизма

клеток в целом, поскольку этот показатель очень чутко реагирует на изменение условий возделывания растений. Об интенсивности синтеза белка можно судить по активности белоксинтезирующего аппарата [11].

В ответ на низкотемпературный стресс в растениях происходит синтез белков, обладающих пероксидазной активностью. Для характеристики экспрессивности генетических систем адаптации изучаемых сортов яблони к низким температурам в состоянии органического покоя на примере белков, обладающих пероксидазной активностью, определена активность фермента пероксидазы, а также в состоянии органического и вынужденного покоя дана метаболомная оценка их зимостойкости.

Установлено, что в декабре 2017 г. белковый комплекс с пероксидазной активностью у изучаемых сортов яблони представлен белками с молекулярной массой 150, 130, 110, 100, 90, 70, 60, 50 кДа. С потеплением климата и ростом максимальной и минимальной температур воздуха в белковом спектре в сравнении с зимним периодом 2016-2017 гг. снижается содержание белков с большей молекулярной массой (250, 240 кДа).

Сорта Айдаред и Лигол отличаются от других исследуемых сортов яблони наличием белка с молекулярной массой 110 кДа и большим содержанием белков с молекулярной массой 100, 80, 50 и 40 кДа, что может быть связано с их эколого-географическим происхождением и адаптацией к изменяющимся гидротермическим условиям.

У сорта Союз белки с молекулярной массой 60 кДа содержатся в меньшем количестве, чем у остальных испытуемых сортов яблони. При промораживании побегов яблони в модельном опыте у сорта Лигол появляются белки с пероксидазной активностью, молекулярной массой 140 кДа, и у сортов Рассвет, Фортуна, Союз и Прикубанское – белки с молекулярной массой 100 кДа.

У сортов Айдаред и Лигол исчезают белки с молекулярной массой 110 кДа, у сортов Прикубанское, Лигол, Союз, Фортуна, Рассвет появляются белки массой 80 кДа, у сортов Рассвет и Союз – белки с молекулярной массой 75 кДа; у сортов Фортуна, Союз, Родничок исчезают белки с молекулярной массой 70 и 60 кДа.

У изучаемых сортов при воздействии низкотемпературного стресса белки холодового стресса представлены белками с молекулярной массой 100, 80, 75, 70 и 60 кДа (кроме Фортуна, Союз и Родничок).

Активность ферментов пероксидазы в побегах яблони имеет сложный характер, зависящий и от изменяющегося температурного фактора, генотипа, и сильнее проявляется при более жестких условиях перезимовки. Известно, что возрастание активности пероксидазы может свидетельствовать о проявлении защитных реакций тканей на низкотемпературный стресс [12-14].

Пероксидазная активность у исследуемых сортов колеблется от 18,9 сек⁻¹ (сорт Дейтон) до 37 сек⁻¹ (сорт Айдаред), 27,1 сек⁻¹ (сорт Лигол), 27,1 сек⁻¹ (сорт Союз), что характеризует специфику сорта и может быть связано с различиями в спектрах белков, обладающих пероксидазной активностью (рис. 2). Большая активность пероксидазы в побегах яблони сортов Айдаред, Лигол, Прикубанское, Союз, Эрли Мак характеризует повышенную устойчивость их к окислительному стрессу и согласуется с большим содержанием аскорбиновой кислоты в побегах этих сортов (рис. 3).

Сорта Рассвет, Фортуна, Союз, Родничок, Дейтон отличаются повышенным содержанием антоцианов и халконов, обладающих антиокислительной активностью (рис. 4).

Показателем окисленности липидов служит содержание малонового диальдегида (МДА) – продукта деградации полиненасыщенных жирных кислот [15]. При промораживании побегов у всех сортов яблони отмечается снижение содержания малонового диальдегида, характеризующего устойчивость липидов клеточных мембран к окислению, на фоне снижения содержания аскорбиновой кислоты (кроме сорта Родничок) (рис. 5).

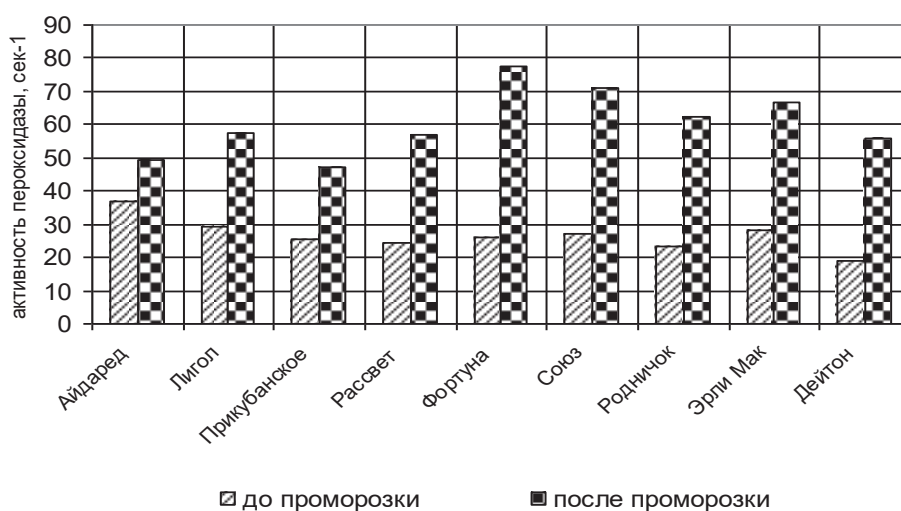


Рис. 2. Активность пероксидазы сортов яблони до и после промораживания побегов

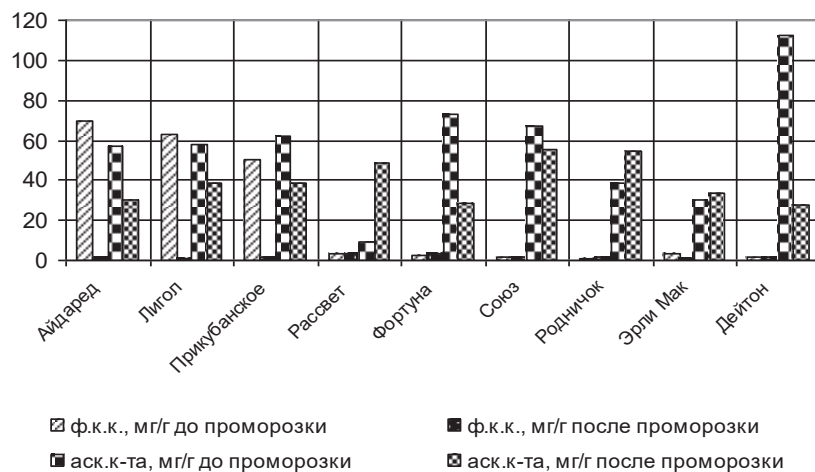


Рис. 3. Содержание в побегах яблони аскорбиновой кислоты и суммы фенолкарбоновых кислот (фкк) до и после промораживания

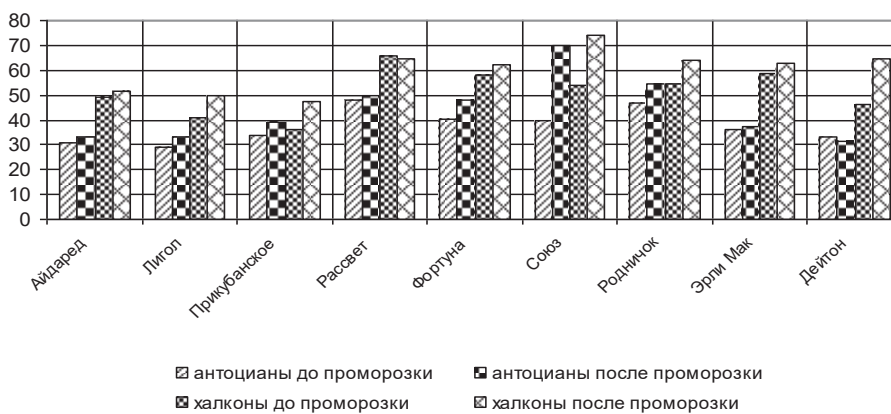


Рис. 4. Содержание антоцианов и халконов в побегах яблони до и после промораживания

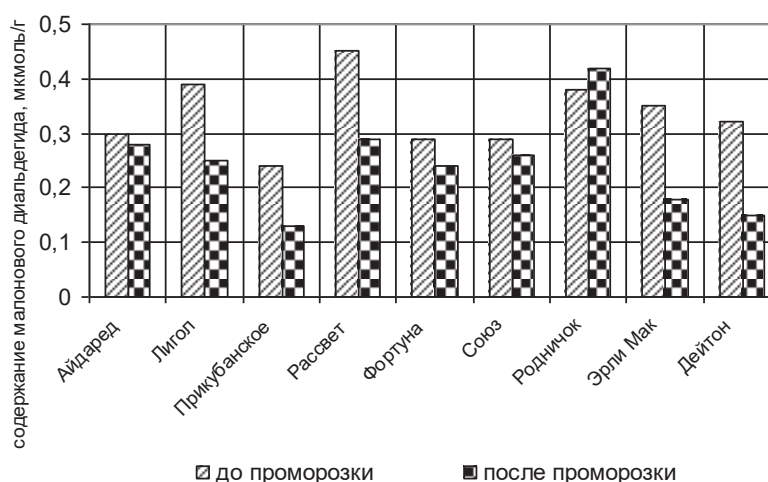


Рис. 5. Содержание малонового диальдегида побегах яблони до и после промораживания

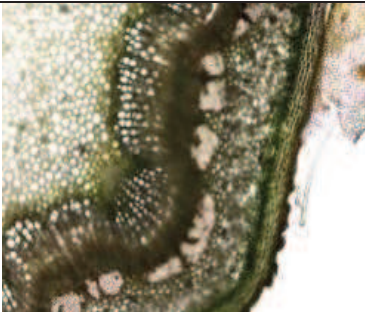
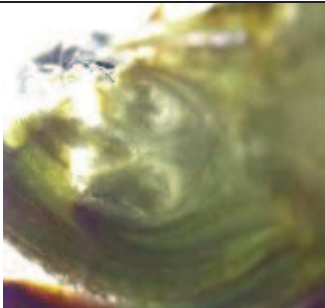
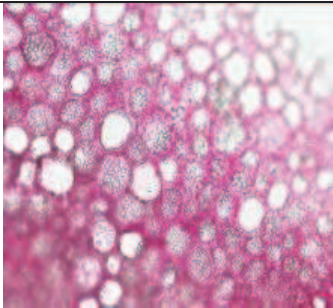
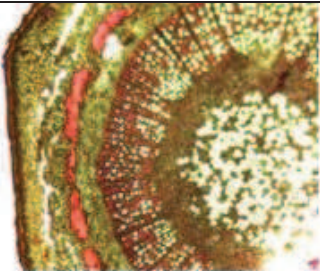
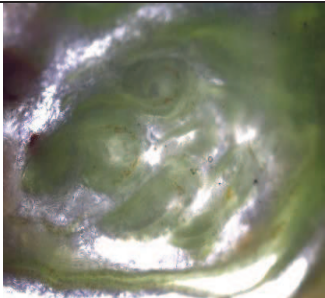
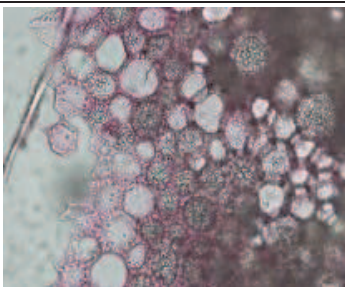
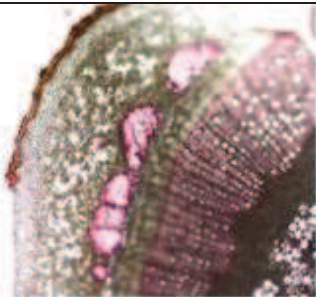
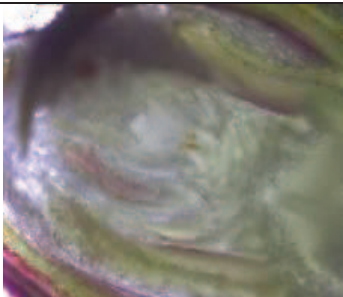
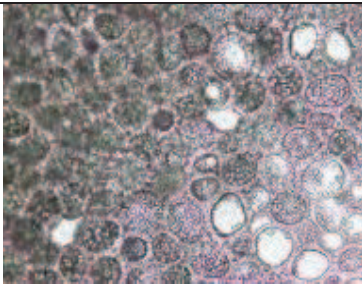
Гистохимические и анатомо-морфологические исследования однолетних побегов яблони показали, что в декабре 2017 года они находились в состоянии вынужденного покоя, что подтверждается методом проращивания срезанных веток (во всех вариантах опыта все почки тронулись в рост). Плодовые почки находятся на Vг этапе органогенеза – образование археспориальной ткани в пыльниках. Повышение средней температуры в декабре 2017 г. по сравнению со среднегодовыми значениями явилось причиной сокращения глубины и продолжительности глубокого покоя, потери адаптивности растений к повреждающим факторам зимнего периода. Сорта Айдаред и Прикубанское отличались большим накоплением крахмала в зоне мелкоклеточной сердцевинки побега и большей зимостойкостью.

Изучение динамики изменения содержания связанной формы воды и таких стресс-протекторов, как пролин и сахаразы в декабре, 2015-2017 гг. показало, что в большей мере устойчивость растений яблони сорта Айдаред определяется содержанием сахаразы ($K_{\text{коррел.}} = 0,89$), а сорта Прикубанское – пролина ($K_{\text{коррел.}} = 1,0$). У сорта Лигол в поддержании водного баланса принимают участие как пролин, так и сахараза, однако связь между содержанием связанной воды и этими осмопротекторами невелика ($K_{\text{коррел.}} = 0,55$ и $0,61$).

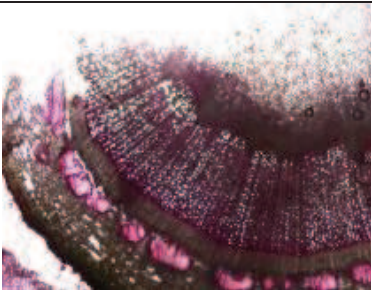
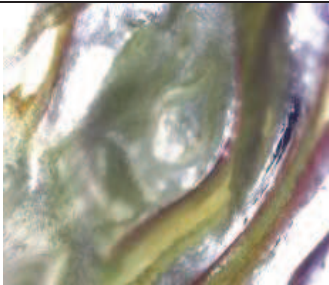
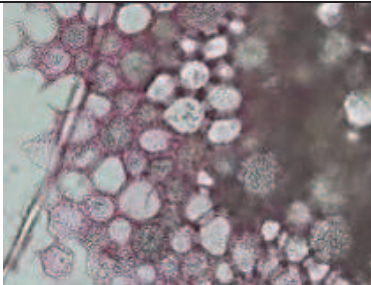
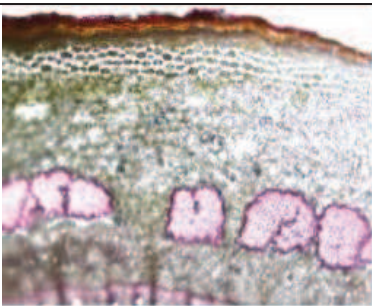
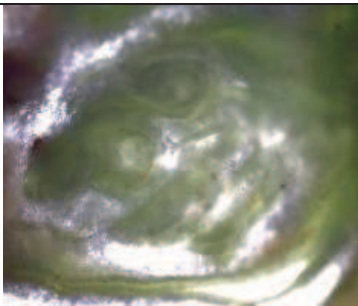
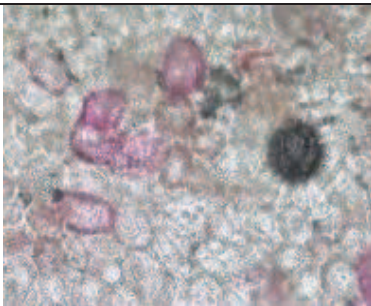
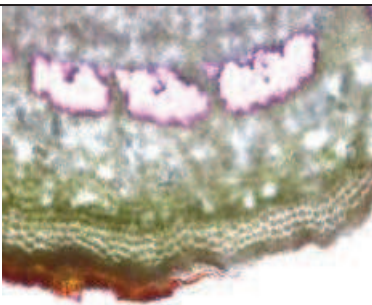
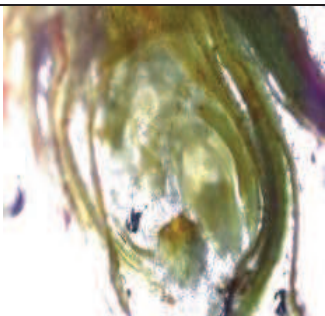
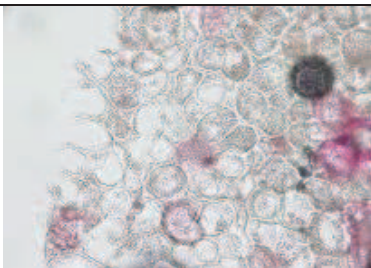
Изучение зависимости между изменением содержания связанной формы воды, сахаразы, пролина, фенолкарбоновых кислот, суммы катионов, антоцианов и халконов в декабре 2015-2017 гг. при промораживании побегов в модельном опыте показало, что наибольший коэффициент корреляции наблюдается между содержанием связанной формы воды и содержанием пролина ($K_{\text{коррел.}} = 0,97$), антоцианов ($0,92$), халконов ($K_{\text{коррел.}} = 1,0$), что связано с ингибированием свободно-радикальных процессов при окислительном стрессе, и катионов ($K_{\text{коррел.}} = -1,0$), характеризующим изменение проницаемости клеточных мембран.

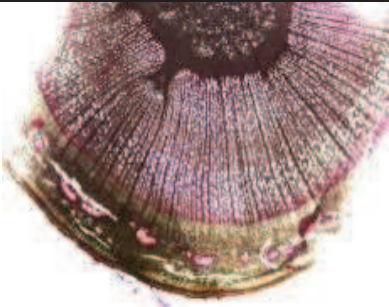
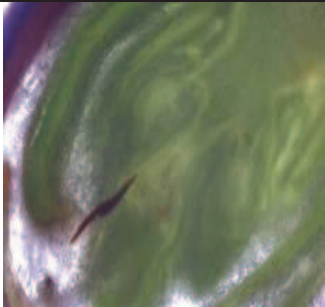
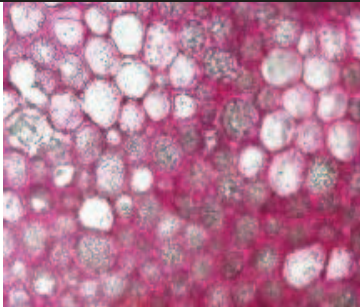
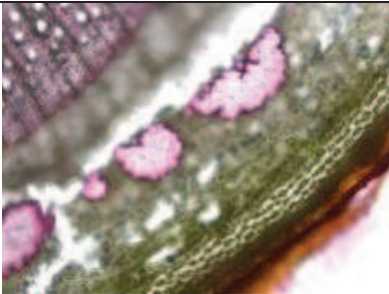
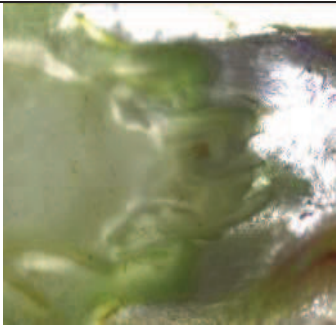
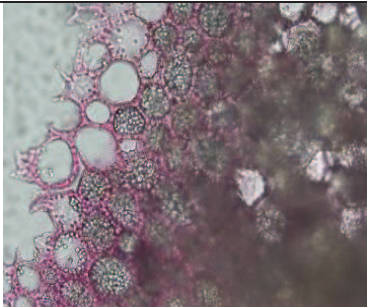
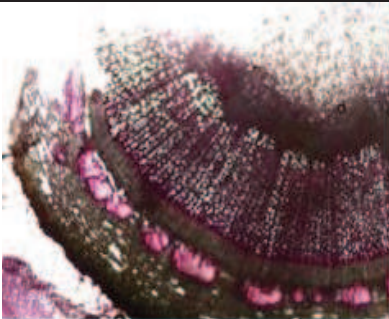
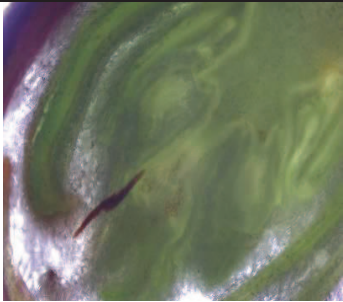
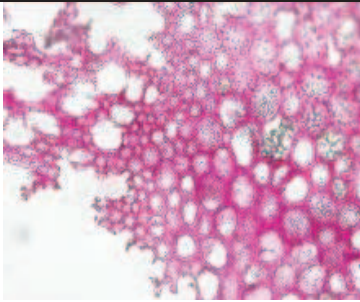
Прижизненные анатомические исследования тканей однолетних побегов и плодовых почек изучаемых сортов яблони показали, что в феврале 2018 года они пребывали в состоянии вынужденного покоя. Плодовые почки находились на Vг этапе органогенеза – образование археспориальной ткани в пыльниках. У триплоидных сортов Союз и Родничок содержание крахмала в зоне мелкоклеточной сердцевинки побега существенно снизилось вследствие его гидролиза и составило 4,4 и 4,3 балла соответственно (табл.). Отмечено, что у диплоидных сортов яблони гидролиз крахмала задерживается, его количество варьировало от 4,4 до 4,6 балла. Так, у диплоидных сортов Рассвет, Эрли Мак, Айдаред, Прикубанское содержание крахмала в зоне мелкоклеточной сердцевинки побега составляло 4,6 балла, у сорта Фортуна – 4,5 балла, что характеризует его как зимостойкий, у диплоидных сортов Дейтон, Лигол – 4,4 балла (среднезимостойкие). Таким образом, триплоидные сорта Союз и Родничок, Айдаред и Прикубанское в условиях февраля 2018 года по физиолого-биохимическим и гистохимическим данным проявили себя высокозимостойкими.

Анатомо-морфологическое строение однолетних побегов и почек различных сортов яблони
до искусственного промораживания (14.12.2017 г.)

Сорт	Поперечный срез побега	Продольный срез плодовой почки	Содержание крахмала в баллах	Зимостойкость
Рассвет			 4,6 балла	Зимостойкий
Фортуна			 4,6 балла	Зимостойкий
Эрли Мак			 4,7 балла	Зимостойкий

Продолжение таблицы

Дейтон			 4,3 балла	Средне-зимостойкий
Союз			 5,0 балла	Высоко-зимостойкий
Родничок			 4,9 балла	Высоко-зимостойкий

Продолжение таблицы				
Айдаред			 5,0 балла	Высоко-зимостойкий
Лигол			 4,6 балла	Зимостойкий
Прикубан-ское			 5,0 балла	Высоко-зимостойкий

Выводы. Проведена метаболомная оценка сортов яблони различного эколого-географического происхождения в условиях низкотемпературного стресса. Выделены специфические белки с пероксидазной активностью, обуславливающие устойчивость яблони к стрессу. У изучаемых сортов (кроме Айдаред, Родничок) белки холодового стресса представлены белками с молекулярной массой 100, 80, 75, 70 и 60 кДа. Выявлены наиболее информативные физиолого-биохимические показатели метаболических процессов, участвующих в механизмах устойчивости яблони к низкотемпературному стрессу (активность пероксидазы, содержание пролина, сахарозы, малонового диальдегида, фенолкарбоновых кислот). Сорта Рассвет, Фортуна, Союз, Родничок, Дейтон отличаются повышенным содержанием антоцианов и халконов, обладающих антиокислительной активностью, и, следовательно, повышенной устойчивостью к низким температурам.

Сорта Айдаред (селекция США), Союз, Родничок, Прикубанское (селекция СКЗНИИСиВ) также отмечают повышенной устойчивостью к низкотемпературному стрессу.

Литература

1. Arora R., Rowland L.J. Physiological Research on Winter-hardiness: Deacclimation Resistance, Reacclimation Ability, Photoprotection Strategies, and a Cold Acclimation Protocol Design // HortScience. – 2011. – № 46(8). – P. 1071-1078.
2. Trejo-Martínez M.A., Orozco A., Almaguer-Vargas G., Carvajal-Millán E., Gardea A.A.. Metabolic activity of low chilling grapevine buds forced to bud break // Thermochim. Acta. – 2009. - № 481. – P. 28-31.
3. Bonhomme M., Rageau R., Lacoite A., Gendraud M. Influences of cold deprivation during dormancy on carbohydrates contents of vegetative and floral primordia and nearby structures of peaches buds (*Prunus persica* L. Batch) // Sci. Hortic. – 2005. – № 105 – P. 223-240.
4. Nenko N.I., Kiseleva G.K., Ulyanovskaya E.V. Yablonskay E.K., Karavaeva A.V. Winter resistance of the apple tree varieties in the south of Russia // Austrian Journal of Technical and Natural Sciences. 2018. № 3-4. P. 3-10.
5. Адаптационная устойчивость яблони к гидротермическим условиям зимнего и летнего периодов [Электронный ресурс] / Н.И. Ненько, Г.К. Киселева [и др.] // Плодоводство и виноградарство Юга России. 2017. № 45(3). С.33-48. Режим доступа: journalkubansad.ru/pdf/17/03/04.pdf
6. Комплексный подход к отбору ценных генотипов яблони, устойчивых к стрессовым факторам среды / Е.В. Ульяновская, И.И. Супрун, С.В. Токмаков, Я.В. Ушакова // Плодоводство и виноградарство Юга России. 2014. № 25 (1). С. 182-187. URL: <http://journalkubansad.ru/pdf/14/01/02.pdf>.
7. Ненько Н.И., Дорошенко Т.Н., Гасанова Т.А. Физиологические методы в адаптивной селекции плодовых культур // Современные методологические аспекты организации селекционного процесса в садоводстве и виноградарстве. Краснодар, СКЗНИИСиВ, 2012. С. 189-198.
8. Физиолого-биохимические методы изучения исходного и селекционного материала / Н.И. Ненько, И.А. Ильина [и др.]// Современные методологические аспекты организации селекционного процесса в садоводстве и виноградарстве. Краснодар: СКЗНИИСиВ, 2012. – С. 530-540.
9. Современные инструментально-аналитические методы исследования плодовых культур и винограда / Н.И. Ненько, И.А. Ильина, Т.Н. Воробьева [и др.]; под общ. ред. Н.И. Ненько. Краснодар: СКЗНИИСиВ, 2015. 115 с.
10. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов исследований). М., 1979. 463 с.
11. Sha Valli Khan P.S., Nagamallaiiah G.V., Rao M. D., Sergeant K., Hausman J.F. Abiotic stress tolerance in plants: insights from proteomics // Emerging Technologies and Management of Crop Stress Tolerance. 2014. V. 2. P. 23-68.
12. Гольпшклина Л. В., Красова Н.Г., Галашева А.М. Влияние гипертермии на активность ферментной системы пероксидазы в тканях однолетних побегов яблони // Современное садоводство. 2014. №4. С. 50-59.
13. Agarwal S., Sairam R.K., Srivatava G.C., Tyagi A., Meena R.C. Role of ABA, salicylic acid, calcium and hydrogen peroxide on antioxidant enzymes induction in wheat seedlings // Plant Science. 2005. № 169. P. 559-570.
14. Hossain M. A., Hoque M. A., Burritt D.J., Fujita M. Proline protects plants against abiotic oxidative stress: biochemical and molecular mechanisms / M. A. Hossain, / Oxidative Damage to Plants. 2014. № 5. P. 477-522.
15. Кошкин Е.И. Физиология устойчивости сельскохозяйственных культур. М.: Дрофа, 2010. 638 с.