

МЕТАБОЛОМНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА УСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ ВИНОГРАДА К НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОМУ СТРЕССУ

Ненько Н.И., д-р с.-х. наук, Ильина И.А., д-р техн. наук,
Сундырева М.А., канд. с.-х. наук, Киселева Г.К., канд. биол. наук, Схаляхо Т.В.

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

Реферат. Установлены физиолого-биохимические закономерности формирования устойчивости сортов винограда различного эколого-географического происхождения к низкотемпературному стрессу в условиях анапо-таманской зоны виноградарства, на основе метаболомной оценки экспрессии генотипа. Выделены специфические белки холодового стресса с пероксидазной активностью, определяющие устойчивость сортов винограда различного эколого-географического происхождения к низким температурам.

Ключевые слова: виноград, морозостойкость, закономерности, физиолого-биохимические критерии, параметры, экспрессия генотипа, метаболомная оценка

Summary. Physiological and biochemical regularities in the formation of resistance of grape varieties different eco-geographical origin to low-temperature stress under the conditions of the Anapa-Taman zone of viticulture on the basis of metabolomic evaluation of genotype expression have been established. The specific proteins of cold stress with peroxidase activity that determine the resistance of grape varieties different eco-geographical origin to low temperatures are identified.

Key words: grapes, frost resistance, regularities, physiological and biochemical criteria, parameters, expression of genotype, metabolomic estimation

Введение. Одно из перспективных направлений развития современного виноградарства – создание ампелоценозов, устойчивых к абиотическим, биотическим и антропогенным факторам и стабилизация продукционного процесса [1, 2]. В связи с этим актуально изучение закономерностей формирования устойчивости растений винограда к абиотическим стрессорам в условиях изменяющегося климата. Природно-климатические условия Краснодарского края благоприятствуют получению высоких урожаев винограда, способных выдерживать конкуренцию на международном рынке. В то же время получение стабильных высоких урожаев ограничивается воздействием таких неблагоприятных факторов внешней среды, как зимние морозы, особенно после длительной теплой погоды. Поэтому только сорта, сочетающие высокое качество винограда с адаптированностью к условиям данного региона, могут с успехом возделываться здесь в достаточно широких масштабах [3, 4]. Это обуславливает необходимость совершенствования сортимента путем возделывания сортов, лучше приспособленных к погодным условиям мест произрастания. Особенно актуально не только выделить перспективные генотипы, но и определить экспрессивность генетических систем, то есть способность реализовать потенциальные возможности генотипа в изменяющихся условиях среды.

Цель данной работы – выявить закономерности адаптации сортов винограда различного эколого-географического происхождения к стрессорам зимнего периода на основе метаболомной оценки экспрессии генотипа.

Объекты и методы исследований. Исследования проводились на базе ампелографической коллекции ФГБНУ АЗОСВиВ (г.-к. Анапа). Растения одного 1995 года посадки, подвой Кобер 5ББ. Формировка – двусторонний высокоштамбовый спиральный кордон

АЗОС. Схема посадки 3 x 2,5 м. Почва – чернозем южный карбонатный. Объектами исследований являются технические сорта винограда различного эколого-географического происхождения и сроков созревания, контроль – Кристалл (морозостойкий сорт) (табл.1) [5].

Таблица 1 – Характеристика объектов исследований

Сорт	Происхождение сорта
Кристалл (контроль)	Межвидовой гибрид евро-амуро-американского происхождения
Красностоп АЗОС, Джемте, Достойный, Рислинг АЗОС, Восторг	Межвидовые гибриды евро-американского происхождения
Бархатный, Зариф	Восточно-европейского происхождения
Рислинг рейнский, Алиготе	Западно-европейского происхождения
Красностоп анапский	Бассейна Черного моря

Комплексная оценка сортов по *физиолого-биохимическим* характеристикам позволяет получить более надежную оценку генотипов на устойчивость к неблагоприятным погодно-климатическим условиям зимнего периода и адаптивность, выявленные критерии могут быть использованы в качестве косвенных методов диагностики сортов на морозостойкость [6].

Для оценки адаптационной устойчивости растений винограда к абиотическим стрессам определяли физиолого-биохимические показатели (влажность, содержание свободной и связанной воды – весовым методом; жаростойкость – кондуктометрическим методом; пигменты, белки, активность пероксидазы – спектральным методом; изоферментный состав пероксидазы – методом вертикального электрофореза; углеводы (сахароза, глюкоза, фруктоза) органические кислоты цикла Кребса (яблочной, лимонной, янтарной), катионы металлов (K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+}), фенолкарбоновые (хлорогеновая, кофейная), аскорбиновую, абсцизовую, индолилуксусную и аминокислоты, малоновый диальдегид – методом капиллярного электрофореза на приборе Капель 104 Р; при изготовлении анатомических препаратов использовали методы общепринятой ботанической микротехники [7, 8]. Аналитические исследования проводили в ЦКП «Приборно-аналитический» и лаборатории физиологии и биохимии ФГБНУ СКФНЦСВВ.

Устойчивость растений к стресс-факторам изучалась в естественных условиях и при моделировании стресса (принудительное обезвоживание; охлаждение до температуры $-20^{\circ}C$). Экспериментальные данные обрабатывали с помощью общепринятых методов вариационной статистики [9].

Обсуждение результатов. Гидротермические условия в зимние периоды 2015-2017 гг. на территории анапо-таманской зоны были благоприятны для перезимовки винограда (рис. 1). В зиму 2016-2017 гг. количество выпавших осадков было более выровненным (47-80 мм), чем в 2015-2016 гг. (28-113 мм). Температура воздуха снижалась от $-2^{\circ}C$ до $-16^{\circ}C$, а максимальная температура достигала $25^{\circ}C$ в ноябре и $11^{\circ}C$ в декабре и феврале. Перепад температур достигал $22^{\circ}C$ в феврале и $30^{\circ}C$ – в январе 2017 года.

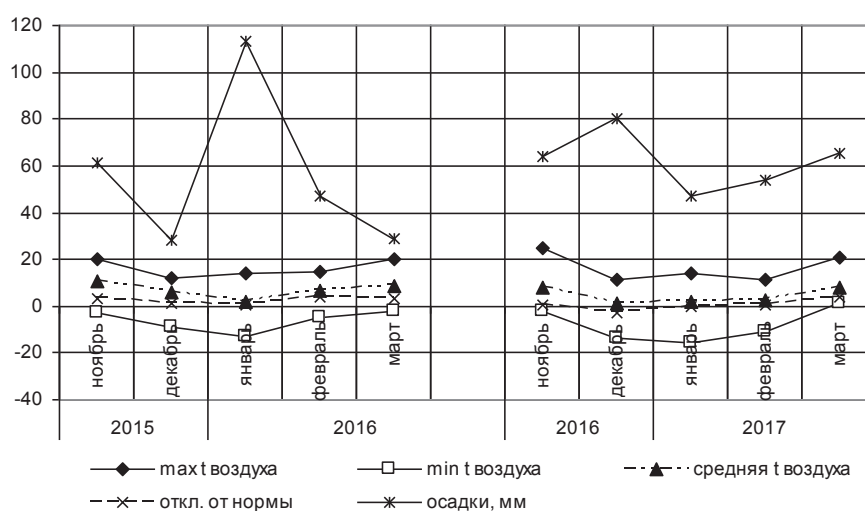
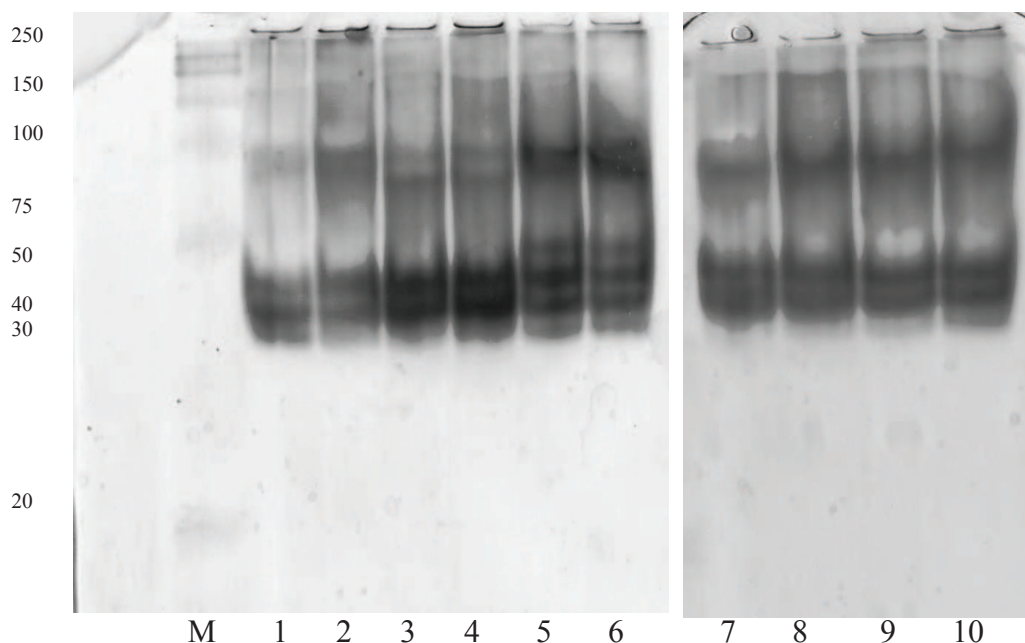


Рис. 1. Гидротермические условия зимнего периода 2015-2017 гг. на территории анапо-таманской зоны

Для характеристики экспрессивности генетических систем адаптации изучаемых сортов винограда к низким температурам зимнего периода 2016-2017 гг. в состоянии органического покоя исследовано состояние белкового комплекса, обладающего пероксидазной активностью, определено количество белков холодового стресса и активность фермента пероксидазы, окисляющего фенольные соединения, проявляющие стресс-протекторные свойства [10, 11, 12] (рис. 2).



1 – Рислинг рейнский до промораживания, 2 – Рислинг рейнский после промораживания, 3 – Бархатный до промораживания, 4 – Бархатный – после промораживания, 5 – Кристалл до промораживания, 6 – Кристалл после промораживания, 7 – Красностоп АЗОС до промораживания, 8 – Красностоп АЗОС после промораживания, 9 – Достойный до промораживания, 10 – Достойный после промораживания, М – маркер молекулярной массы белка

Рис. 2. Электрофореграмма водо-солерастворимой фракции белков с пероксидазной активностью сортов винограда до и после промораживания побегов, декабрь 2016 г.

Установлено, что белковый комплекс с пероксидазной активностью у изучаемых сортов винограда представлен белками с молекулярной массой 250, 240, 150, 140, 100, 90, 75, 70, 50, 40 и 30 кДа. Сорт Кристалл евро-амуро-американского происхождения отличается от других исследуемых сортов винограда наличием белка с молекулярной массой 50 кДа и большим содержанием белков с молекулярной массой 75 и 70 кДа, что может быть связано с его эколого-географическим происхождением. В отличие от сортов Бархатный восточного происхождения, Рислинг рейнский западно-европейского происхождения и Кристалл – у сортов Достойный и Красностоп АЗОС евро-американского происхождения белки с молекулярной массой 75 кДа отсутствуют, а с молекулярной массой 70 кДа содержатся в большем количестве.

Пероксидазная активность у исследуемых сортов колеблется от 0,03 до 0,09 сек⁻¹. При этом большая активность пероксидазы отмечается у сортов Кристалл (0,09 сек⁻¹), Достойный и Красностоп АЗОС (0,086-0,087 сек⁻¹) и меньшая – у сортов Бархатный (0,038 сек⁻¹) и Рислинг рейнский (0,033 сек⁻¹), что может быть связано с различиями в спектрах белков, обладающих пероксидазной активностью (рис. 3).

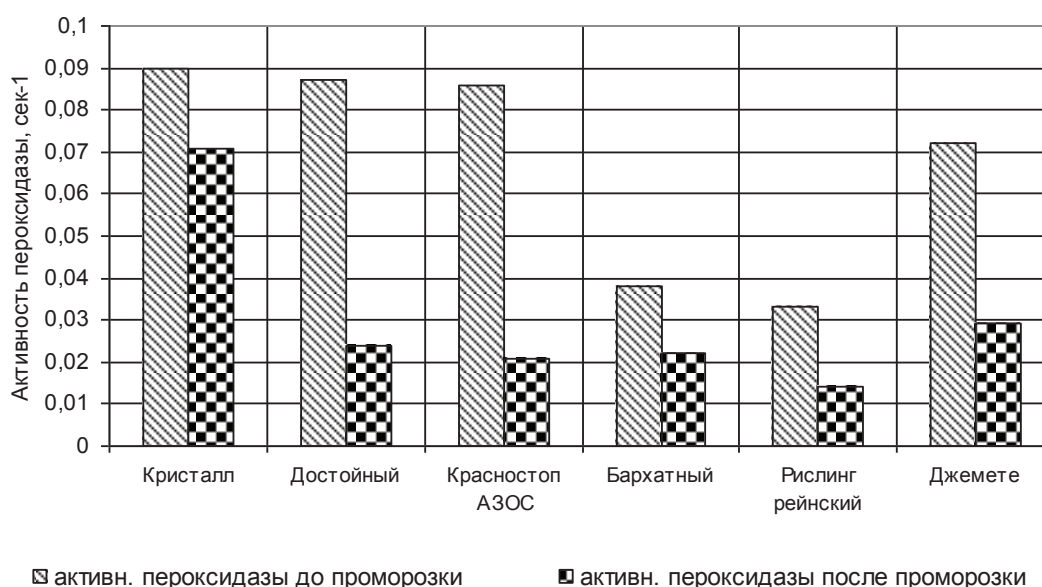


Рис. 3. Активность пероксидазы в побегах винограда до и после промораживания побегов, декабрь 2016 г.

Промораживание побегов винограда в модельном опыте показало, что у сортов Бархатный и Рислинг рейнский появляются белки с пероксидазной активностью молекулярной массой 140 кДа и 90 кДа, у сортов Кристалл, Достойный и Красностоп АЗОС увеличивается содержание белков с молекулярной массой 90 кДа. Можно предположить, что большая активность пероксидазы в лозе винограда сортов Кристалл, Достойный и Красностоп АЗОС характеризует повышенную устойчивость их к окислительному стрессу и согласуется с большим содержанием аскорбиновой кислоты у сортов Кристалл и Достойный и фенолкарбоновых кислот – у сортов Кристалл и Красностоп АЗОС (рис. 4). У всех изучаемых сортов при воздействии низкотемпературного стресса белки холодового стресса представлены белками с молекулярной массой 90 кДа, а у сортов Бархатный и Рислинг рейнский – дополнительно белками с молекулярной массой 140 кДа, обладающими пероксидазной активностью.

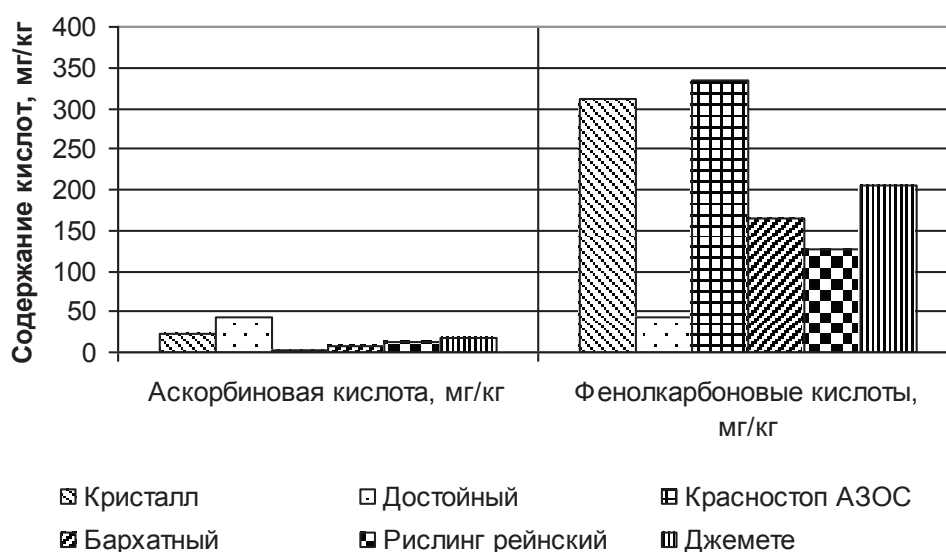


Рис. 4. Содержание аскорбиновой и фенолкарбоновых кислот в побегах винограда до и после промораживания побегов, декабрь 2016 г.

Повышенное содержание аскорбиновой кислоты снижает интенсивность окисления липидов клеточных мембран, сохраняя их текучесть [12, 13]. Показателем окисленности липидов служит количество малонового диальдегида (МДА) – продукта деградации полиненасыщенных жирных кислот [14]. У сортов Кристалл, Достойный и Красностоп АЗОС меньшее содержание МДА (0,05 – 0,08 мкмоль), чем у сортов Бархатный, Рислинг рейнский и Джемте, у которых этот показатель согласуется преимущественно с содержанием фенолкарбоновых кислот (рис. 5). Следовательно, механизм защиты от окислительного стресса у изучаемых сортов разный, в соответствии с их эколого-географическим происхождением.

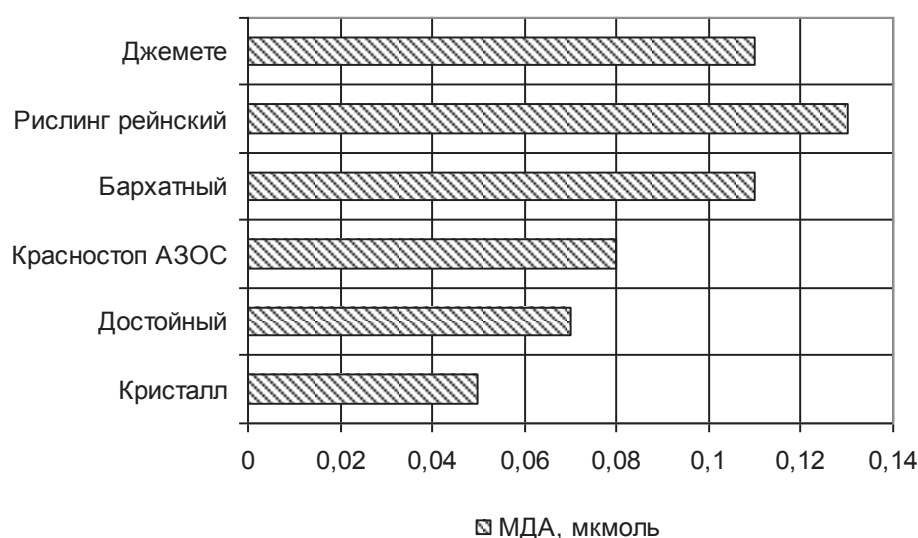


Рис. 5. Содержание малонового диальдегида (МДА) в побегах винограда, декабрь 2016 г.

Большая устойчивость сортов винограда Кристалл, Достойный и Красностоп АЗОС к низкотемпературному стрессу может быть связана с вхождением их в состояние органического покоя и большим содержанием связанной формы воды в тканях растений.

В лозе изучаемых сортов в декабре 2016 г. по сравнению с 2015 г., снижается содержание халконов на 71-93 %, и у сорта Достойный антоцианов – на 57 %, защищающих мембраны клеток от разрушения (рис. 6). Уменьшение содержания халконов в лозе винограда в декабре 2016 г. представляет общую закономерность для всех изучаемых сортов. У сортов Кристалл и Красностоп АЗОС количество антоцианов в лозе повышается на 44 и 22 %, соответственно, что также свидетельствует об устойчивости сортов к окислительному стрессу.

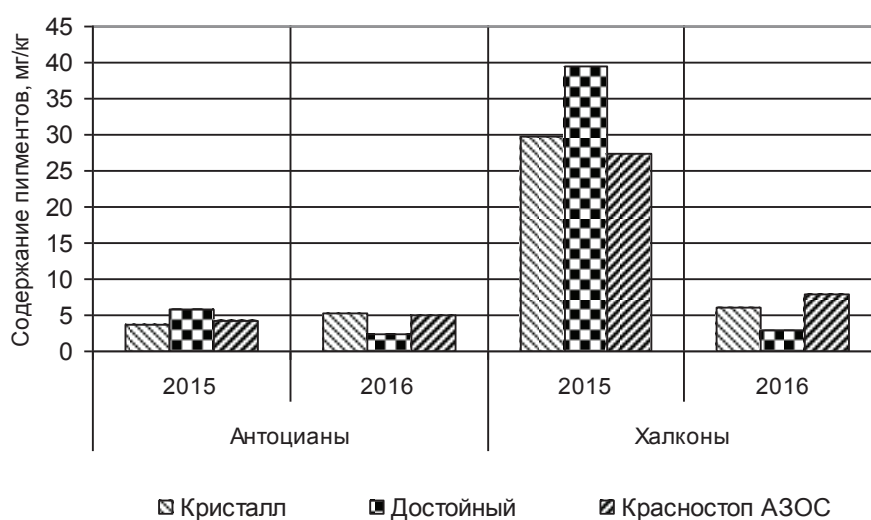


Рис. 6. Содержание пигментов в побегах винограда, декабрь 2016 г.

Содержание крахмала в лозе в этот период у сортов Кристалл (4,42 мг/г), Достойный (3,09 мг/г), Красностоп АЗОС (5,07 мг/г) было выше, чем у сортов Бархатный и Рислинг рейнский, что характеризует сорта Кристалл и Красностоп АЗОС как более морозостойкие (рис. 7).

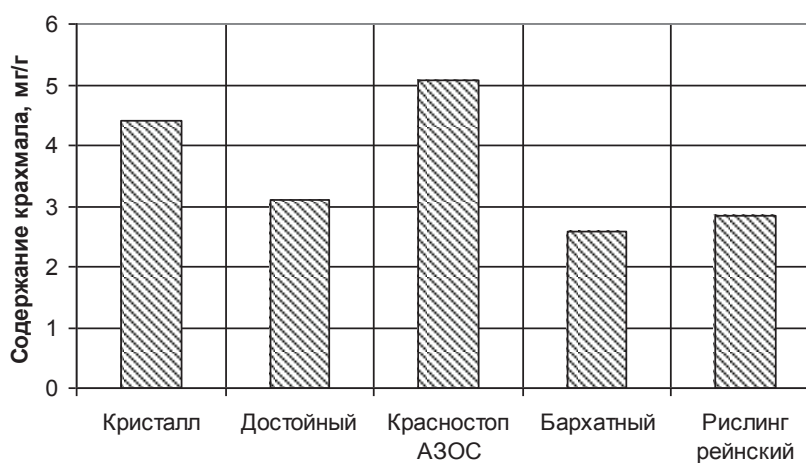


Рис. 7. Содержание крахмала в побегах винограда, декабрь 2016 г.

Оценка механизма устойчивости винограда к обезвоживанию показала, что у сорта Кристалл большее воздействие на содержание связанной формы воды в лозе оказывает пролин ($K_{\text{коррел.}} = 0,9$) и меньшее – сахароза ($K_{\text{коррел.}} = 0,5$), у сорта Красностоп АЗОС – как пролин, так и сахароза ($K_{\text{коррел.}} = 0,8$), а у сорта Достойный пролин и сахароза имеют на указанный показатель незначительное влияние ($K_{\text{коррел.}} = 0,3$). Это позволяет предположить у изучаемых сортов в состоянии органического покоя различные механизмы адаптации к изменяющимся условиям среды. Сорта Кристалл и Красностоп АЗОС отличались большим содержанием белка в побегах с высоким содержанием пролина, укрепляющего клеточные стенки, чем сорта Достойный, Бархатный и Рислинг рейнский.

При промораживании побегов винограда в модельном опыте количество белка у изучаемых сортов (кроме сорта Бархатный) снижалось, а свободных аминокислот – увеличивалось, что свидетельствует о его гидролизе (рис. 8, 9).

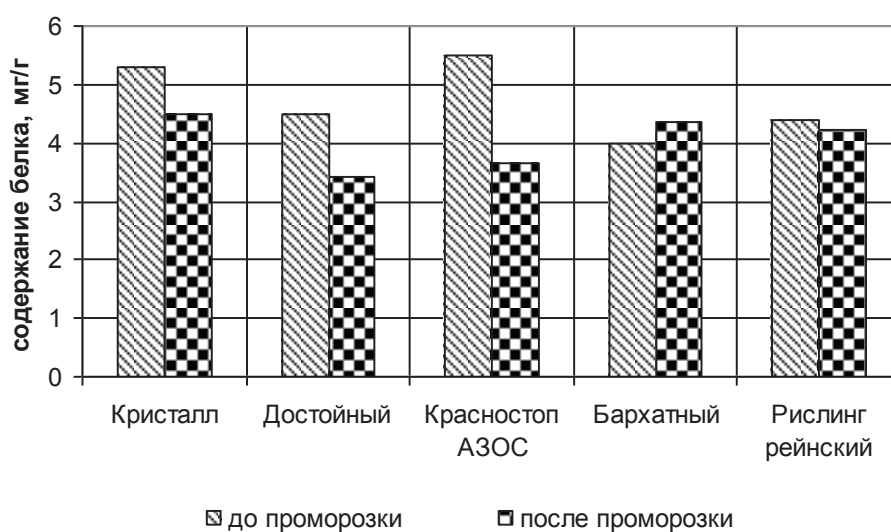


Рис. 8. Влияние низкотемпературного стресса на содержание белка в побегах винограда, декабрь 2016 г.

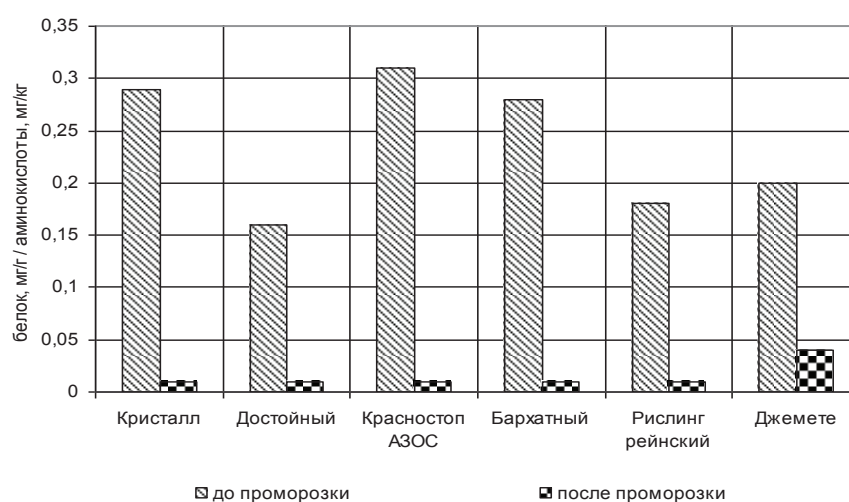


Рис. 9. Отношение содержания белка к содержанию суммы свободных аминокислот в побегах сортов винограда, декабрь 2016 г.

В условиях февраля 2017 года (в сравнении с декабрем 2016 г.) содержание связанной формы воды в побегах винограда сортов Кристалл, Достойный и Красностоп АЗОС увеличилось, а у сортов Бархатный, Рислинг рейнский и Джемте снизилось, что свидетельствует о более активном протекании обменных процессов у последних трех сортов (рис. 10). Содержание пролина в побегах увеличивается: большее его количество отмечалось у сортов Кристалл, Достойных, Бархатный (связано со стресс-протекторными свойствами пролина) (рис. 11).

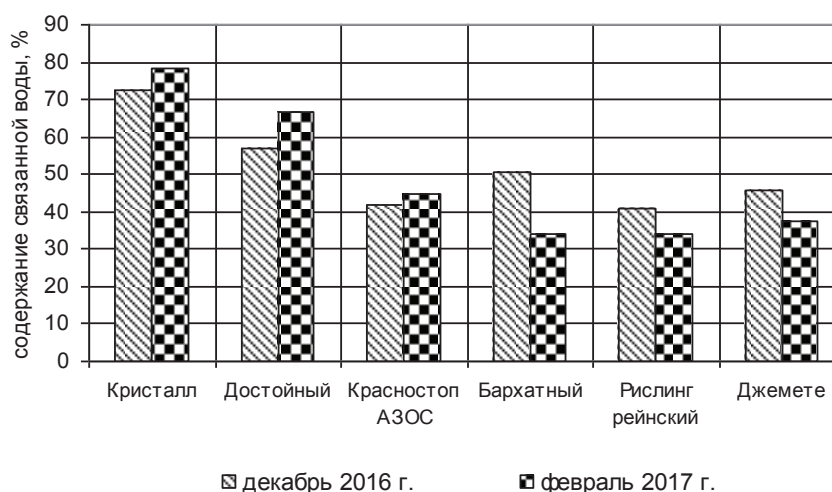


Рис.10. Содержание связанной формы воды в побегах винограда в зимний период 2016-2017 гг.

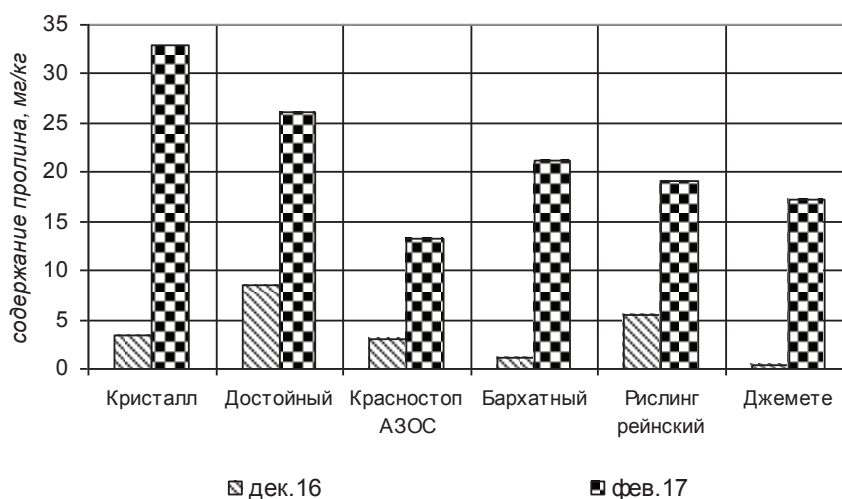


Рис. 11. Содержание пролина в побегах сортов винограда в зимний период 2016-2017 гг.

В феврале 2017 г. уменьшается содержание антистрессового гормона – АБК в побегах всех изучаемых сортов винограда в 1,7-3,6 раза (рис. 12). При этом снижается также содержание суммы фенолкарбоновых кислот, и в большей мере – у сортов Кристалл и Красностоп АЗОС (рис. 13).

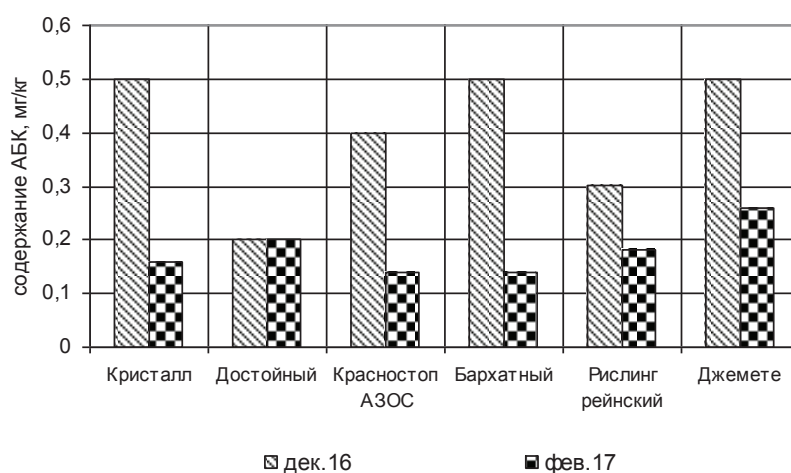


Рис. 12. Содержание АБК в побегах сортов винограда в зимний период 2016-2017 гг.

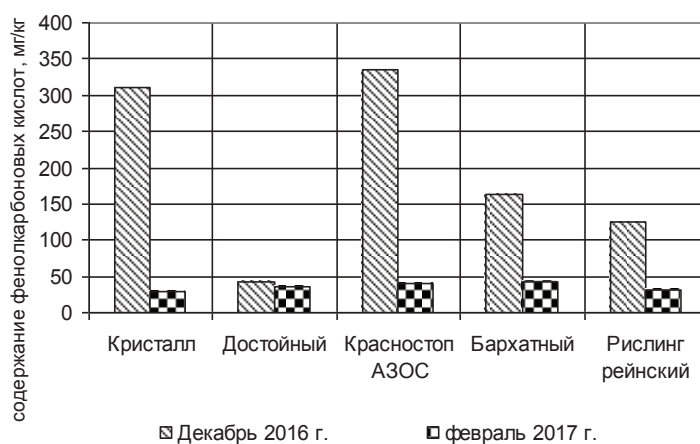


Рис. 13. Содержание фенолкарбоновых кислот в побегах винограда в зимний период 2016-2017 гг.

У сортов Бархатный, Рислинг рейнский и Джемте в феврале уменьшается содержание малонового диальдегида в побегах, что позволяет предположить стабилизацию клеточных мембран в связи с меньшей интенсивностью распада липидов (рис. 14).

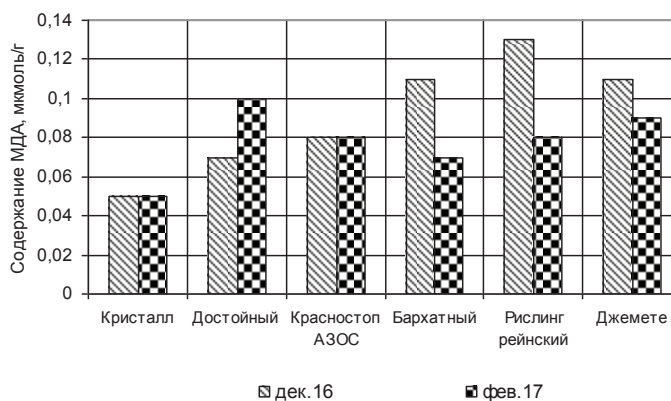


Рис.14. Содержание малонового диальдегида в побегах винограда в зимний период 2016-2017 гг.

Гистохимические исследования показали, что содержание крахмала в зоне мелко-клеточной сердцевинки побегов у сортов Кристалл и Достойный – 5,0 баллов, у сорта Красностоп АЗОС – 4,7 балла, что позволяет охарактеризовать их как высокоморозостойкие и морозостойкий, соответственно. Анатомо-морфологическими исследованиями почек установлено, что они находятся в состоянии зимнего покоя. У всех сортов винограда в зимующих почках (глазках) заложены эмбриональные соцветия, обуславливающие урожай следующего года (рис. 15).



Срез побега винограда сорта Кристалл

Срез почки винограда сорта Кристалл

Рис. 15. Микроскопические исследования побегов винограда сорта Кристалл

Таким образом, в связи с потеплением климата в зимний период 2016-2017 гг. растения винограда не вошли в состояние глубокого покоя и не отличались устойчивостью к экстремально низким температурам (второй компонент зимостойкости). В состоянии вынужденного покоя при благоприятных климатических условиях февраля 2017 г. сорта можно охарактеризовать положительно по третьему компоненту зимостойкости. Проявление низких температур (-16°C) в январе привело к незначительному подмерзанию растений, вызвало небольшие изменения в лубе лозы и не повредило ее сердцевину.

Биохимические показатели устойчивости изучаемых сортов винограда за период 2007-2017 гг. приведены в табл. 2.

Таблица 2 – Биохимические показатели адаптации межвидовых гибридов винограда к стрессорам зимнего периода 2007-2017 гг.

Показатель	Состояние глубокого покоя	Состояние вынужденного покоя
Оводненность побега, %	10,15– 31,87	12,42– 34,60
Содержание сухих веществ, %	68,13 – 89,85	65,40– 87,58
Содержание свободн. воды, %	27,31– 81,25	21,53– 80,43
Содержание связанной воды, %	18,65 – 72,69	19,85 – 78,47
Отношение связ.вода/своб.	0,34 – 2,66	0,24 – 3,64
Содержание сахарозы, мг/г	1,07– 11,83	1,35 – 6,15
Содержание крахмала, мг/г	1,67– 15,24	1,51– 8,51
Содержание пролина, мг/кг	1,1 – 92,0	13,21– 190,0
Содержание белка, мг/г	2,43– 6,58	2,49 – 8,21
Сумма катионов, мг/г	1,46 – 3,34	1,54 – 3,67
Сумма фенолкарб. и аскорб. кислот, мг/г	0,03 – 13,4	0,01 – 0,06

Выводы. Выявлены физиолого-биохимические закономерности адаптации сортов винограда различного эколого-географического происхождения к абиотическим стрессорам зимнего периода на основе метаболомной оценки экспрессии генотипа.

Выделены специфические белки холодового стресса с пероксидазной активностью, определяющие устойчивость сортов винограда различного эколого-географического происхождения к абиотическим стрессорам зимнего периода.

Литература

1. Егоров, Е.А. Основные направления повышения эффективности воспроизводственных процессов в отраслевом производстве / Е.А. Егоров, Ж.А. Шадрин, Г.А. Кочьян // Научные труды СКФНЦСВВ. – Том 13. – Краснодар: СКФНЦСВВ, 2017. – С. 7-16.
2. Егоров, Е.А. Состояние и перспективы научного обеспечения устойчивого развития виноградарства / Е.А. Егоров, К.А. Серпуховитина, В.С. Петров // Виноделие и виноградарство. – 2008. – № 3. – С. 6-8.
3. Петров, В.С. Адаптивный и продукционный потенциал шенофонда винограда в нестабильных условиях умеренно континентального климата юга России / В.С. Петров, Н.И. Ненько, И.А. Ильина, Е.Т. Ильницкая, М.А. Сундырева, Ю.Ф. Якуба // Вестник Российской сельскохозяйственной науки. – 2017. – № 4. – С. 25-29.
4. Петров, В.С. Онтогенетическая реакция винограда на природные и антропогенные факторы среды произрастания в условиях умеренно континентального климата юга России / В.С. Петров, Т.П. Павлюкова, М.А. Сундырева и др. // Научные труды СКЗНИИСИВ. – Том 12. – Краснодар: СКЗНИИСИВ, 2017. – С. 112-120.
5. Егоров, Е.А. Анапская ампелографическая коллекция / Е.А. Егоров, О.М. Ильяшенко, А.Г. Коваленко [и др.]. – Краснодар: СКЗНИИСИВ, 2009. – 215 с.
6. Ненько, Н.И. Критериальная оценка адаптации винограда различного эколого-географического происхождения к низкотемпературному стрессу / Н.И. Ненько, И.А. Ильина, Г.К. Киселева, М.А. Сундырева, Н.М. Запорожец Т.В. Схалыхо // Научные труды СКЗНИИСИВ. – Том 12. – Краснодар: СКЗНИИСИВ, 2017. – С. 121-129.
7. Ненько, Н.И. Физиолого-биохимические методы изучения исходного и селекционного материала / Н.И. Ненько, И.А. Ильина, В.С. Петров, М.А. Сундырева // Современные методологические аспекты организации селекционного процесса в садоводстве и виноградарстве. – Краснодар: СКЗНИИСИВ, 2012. – С. 530-540.
8. Современные инструментально-аналитические методы исследования плодовых культур и винограда. Учебно-методическое пособие / под общей редакцией Н.И. Ненько. – Краснодар: СКЗНИИСИВ, 2015. – 115 с.
9. Доспехов, Б.А. Методика полевого опыта / Б.А. Доспехов. – М.: Колос, 1979. – 415 с.
10. Колесниченко, А.В. Белки низкотемпературного стресса / А.В. Колесниченко, В.К. Войников. – Иркутск: Арт-Пресс, 2003. – 196 с.
11. Кошкин, Е.И. Физиология устойчивости сельскохозяйственных культур / Е.И. Кошкин. – М.: Дрофа, 2010. – 640 с.
12. Nenko, N.I. Physiological and biochemical parameters of resistance of grape varieties to the stressors of the winter period in the South of Russia/ N.I. Nenko, I.A. Ilina, G.K. Kiseleva, M.A. Sundyeva // Yale Journal of Science and Education, "Yale University Press", 2015, № 1(16).- P. 587-598
13. Ильина, И.А. Физиолого-биохимические исследования морозоустойчивости межвидовых гибридов винограда в осенне-зимний период / И.А. Ильина, Н.И. Ненько, В.С. Петров, М.А. Сундырева, Н.М. Запорожец, Т.В. Схалыхо // Плодоводство и виноградарство Юга России [Электронный ресурс]. – Краснодар: СКЗНИИСИВ, 2013 – № 23 (5). – С. 19–32. – Режим доступа: <http://journalkubansad.ru/pdf/13/05/03.pdf>
14. Nenko, N.I. Physiological and biochemical characteristics of grape varieties of different ecological and geographical origin to the stress factors of summer season / N.I. Nenko, I.A. Ilina, G.K. Kiselyova, M.A. Sundyeva // Austrian Journal of Technical and Natural Sciences, 2017.- № 1-2.- P.3-11.