

## ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ГОМЕОСТАЗА СОРТОВ ВИНОГРАДА ПРИ ДЕЙСТВИИ ВЫСОКОТЕМПЕРАТУРНОГО И ВОДНОГО СТРЕССОВ<sup>1</sup>

Ненько Н.И., д-р с.-х. наук, Ильина И.А., д-р техн. наук,  
Петров В.С., д-р с.-х. наук, Сундырева М.А., канд. с.-х. наук  
Киселева Г.К., канд. биол. наук, Схалыхо Т.В., Мишко А.Е.,  
Запорожец Н.М., канд. с.-х. наук

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

**Реферат.** Установлены физиолого-биохимические особенности гомеостаза сортов винограда различного эколого-географического происхождения в условиях высокотемпературного и водного стресса анапо-таманской зоны виноградарства, а также в модельных опытах. Проведена метаболомная, протеомная, энзимная оценка экспрессивности генотипов. Выделены специфические белки теплового и водного стресса, определена их пероксидазная активность у изучаемых сортов винограда.

**Ключевые слова:** виноград, сорта, засухоустойчивость, жаростойкость, гомеостаз, протеомная, энзимная, метаболомная оценка

**Summary** The influence of high temperature and water stress of the Anapa-Taman zone of viticulture, as well as in model experiments physiological and biochemical features on homeostasis of grapevine varieties of different ecological and geographical origin was established. Metabolomic, enzymatic, protein evaluation of the expression of the genotype is carried out. In the studied grape varieties the specific heat and water stress proteins were isolated and peroxidase activity was determined.

**Key words:** grapevine, varieties, drought resistance, heat resistance, homeostasis, proteomic, enzyme, metabolomic assessment

**Введение.** В условиях аномального проявления абиотических стрессоров, в том числе летнего периода (экстремально высокая температура и низкая влагообеспеченность) усложняются технологии возделывания винограда, увеличиваются издержки в технологическом процессе, повышается себестоимость готовой продукции. Для более полной реализации биологического потенциала растений винограда в этих условиях актуальным является вовлечение в производство сортов адаптивных к нестабильным погодным условиям умеренно континентального климата юга России, в наибольшей степени реализующие свой биологический потенциал и хозяйственно ценные признаки [1, 2].

Ростовые и продукционные процессы виноградной лозы находятся в тесной зависимости от генетически обусловленной реакции сорта винограда на абиотические факторы среды обитания [3, 4]. Знание биологии растений винограда и их реакции на условия существования позволяет оптимизировать технологии возделывания насаждений. При гармоничном сочетании биологических свойств и условий среды произрастания растения винограда в наибольшей степени реализуют агробиологический и физиолого-биохимический потенциал сортов, способных эффективно сохранять постоянство внутреннего состояния скоординированными реакциями для поддержания внутреннего равновесия [5, 6]. В связи с этим актуально выявление генотипов, способных поддерживать постоянство внутренней среды, быстро реагирующих на экстремальные проявления среды обитания, в том числе высокую температуру и низкую влагообеспеченность в летний период [7].

<sup>1</sup> Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и АКК в рамках научного проекта № 19-44-230021 p\_a

Цель работы – изучить особенности гомеостаза сортов винограда при действии высокой температуры и низкой влагообеспеченности.

**Объекты и методы исследований.** Исследования проводились на базе ампелоколлекции АЗОСВиВ, ЦКП приборно-аналитический, лаборатории физиологии и биохимии растений ФГБНУ СКФНЦСВВ. Для оценки адаптационной устойчивости к абиотическим стрессам, интенсивности ростовых и синтетических процессов растений винограда определяли такие физиолого-биохимические показатели, как влажность, содержание свободной и связанной влаги – весовым методом; жаростойкость – кондуктометрическим методом; пигменты, белки, активность пероксидазы – спектральным методом; изоферментный состав пероксидазы – методом вертикального электрофореза; сахарозу, сумму органических кислот цикла Кребса (яблочной, лимонной, янтарной), фенолкарбоновые (хлорогеновая, кофейная), аскорбиновую, абсцизовую кислоты, пролин, малоновый диальдегид – на приборе Капель 105 Р; при изготовлении анатомических препаратов использовали методы общепринятой ботанической микротехники [8, 9, 10]. Устойчивость растений к стресс-факторам изучалась в естественных условиях и при моделировании стресса (принудительное обезвоживание; температура 55 °С). Экспериментальные данные обрабатывали с помощью общепринятых методов вариационной статистики [11].

Для проведения физиолого-биохимических исследований использовали: микроскопы МБИ-3 и МБИ-10, микроскоп Olympus, спектрофотометры UNICO 2800, LEKI SS1207, кондуктометр Агат 2М, прибор для капиллярного электрофореза Капель 105 Р, весы JW-1-3000 Asom и весы аналитические, центрифуги ЛЭ-402, Туре-310, ЦЛН-16, шкаф сушильный СЭШ-1, прибор для вертикального электрофореза.

**Обсуждение результатов.** При определении устойчивости растений винограда к абиотическим стрессам летнего периода одним из наиболее информативных показателей является водный режим, позволяющий поддерживать постоянство внутренней среды клеток. В летний период 2018 года на территории г. Анапа, где расположена ампелоколлекция, июнь и август были жаркими и засушливыми. Температура воздуха достигала 34 и 38 °С, осадки составили 4 и 1 см, соответственно. Максимальная температура лета превысила максимальную температуру лета 2017 года на 2-6 °С, а минимальная – на 2-5 °С. Особенно экстремальным был август 2018 г. в связи с полным отсутствием осадков (рис. 1).

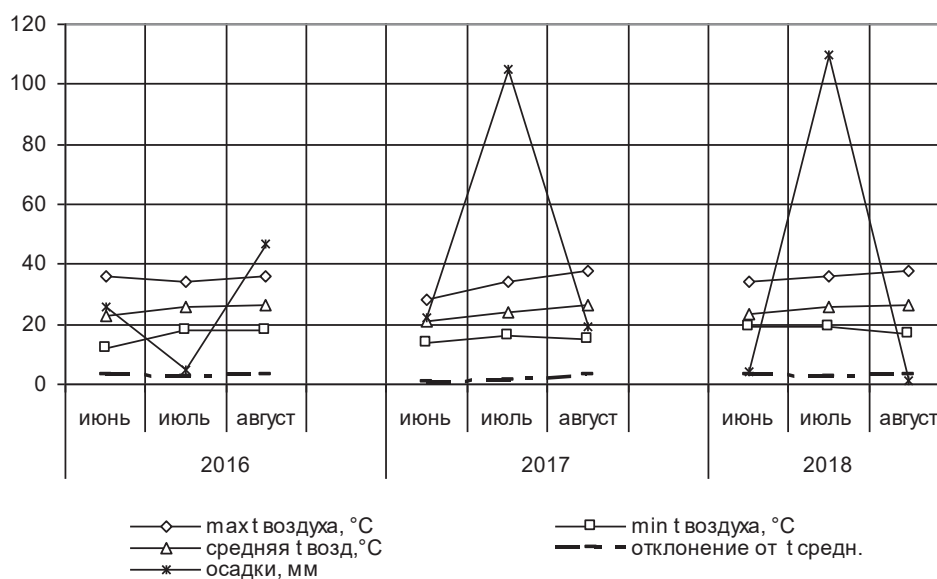


Рис. 1. Гидротермические условия лета 2016-2018 гг. (г. Анапа)

Определение оводненности листьев показало, что на протяжении летнего периода у изучаемых сортов винограда она снижалась на 5,25-21,7 % и больше всего – у сорта Красностоп АЗОС (рис. 2).

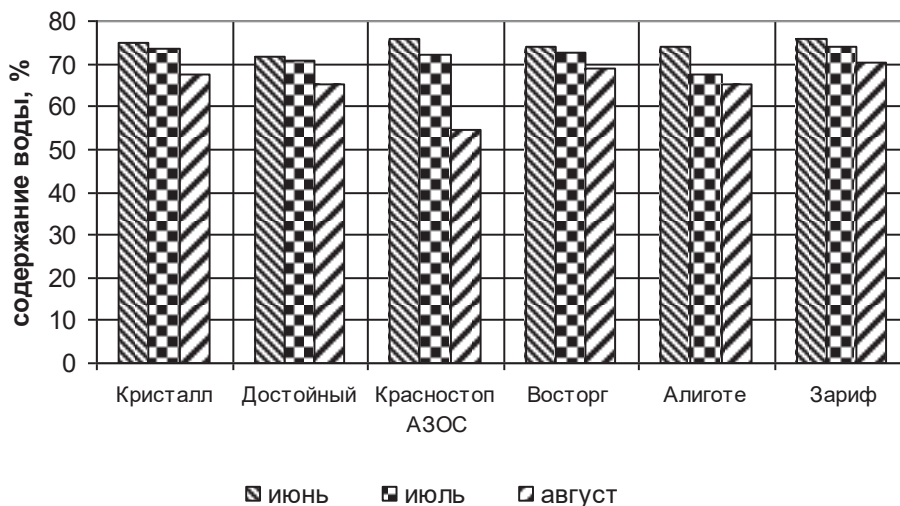


Рис. 2. Содержание воды в листьях сортов винограда в летний период 2018 г.

Определение зависимости оводненности листьев от гидротермических условий летнего периода г. Анапа показало, что она больше зависит от максимальной ( $K_{коррел.} = -0,8 - -0,9$ ) и от минимальной температуры воздуха ( $K_{коррел.} = 0,9 - 1,0$ ) и гораздо в меньшей степени – от количества выпавших осадков ( $K_{коррел.} = 0,25-0,37$ ) (рис. 3).

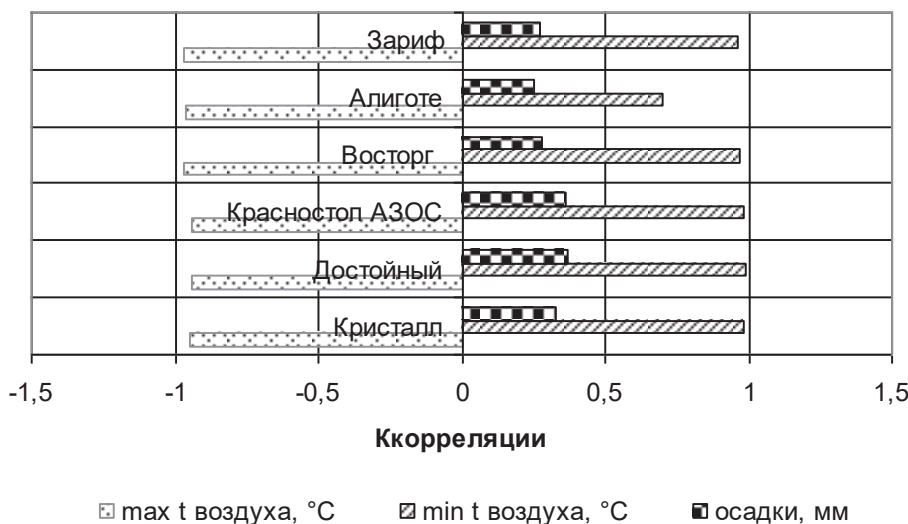


Рис. 3. Зависимость оводненности листьев от гидротермических условий летнего периода 2018 г. (г. Анапа)

В модельном опыте определяли соотношение содержания связанной воды и свободной, которое характеризует способность сорта поддерживать постоянство внутренней среды растения, и чем стабильнее этот показатель, тем более устойчив сорт к воздействию стрессового фактора. В ряду изучаемых сортов более устойчивыми были Кристалл, Достойный, Восторг, Алиготе, Зариф, и менее устойчив – сорт Красностоп АЗОС (рис. 4).

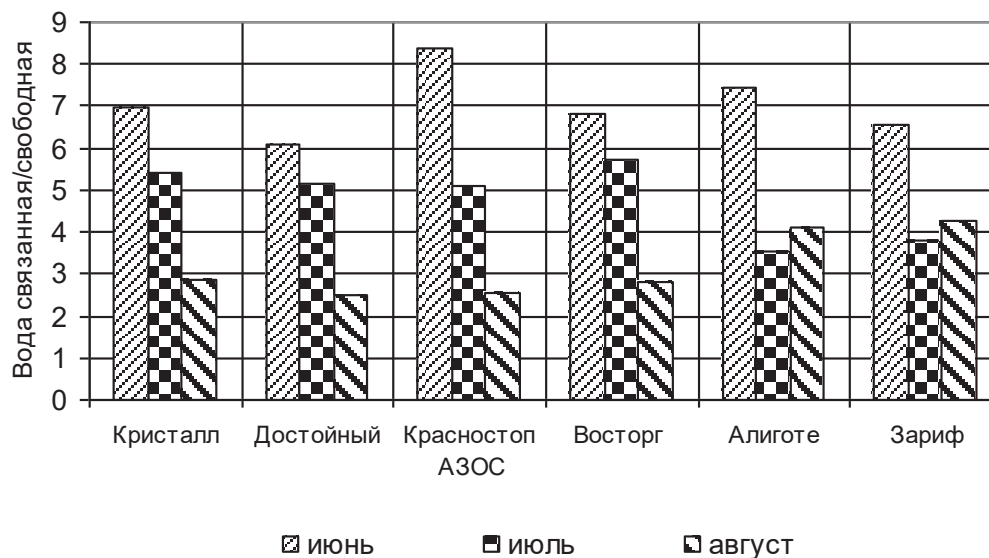


Рис. 4. Динамика отношения содержания связанной воды к свободной в условиях модельного опыта в летний период 2018 г.

На содержание связанной формы воды в клетках большое воздействие оказывают такие осмопротекторы, как пролин [12, 13] и сахароза (рис. 5). При сочетании высокотемпературного и водного стрессов в условиях ампелоценоза у изучаемых сортов содержание связанной воды обратно коррелирует с содержанием пролина (кроме сорта Кристалл) и сахарозы (кроме сортов Красностоп АЗОС, Алиготе и Зариф), что характеризует различные механизмы регуляции и поддержания водного режима.

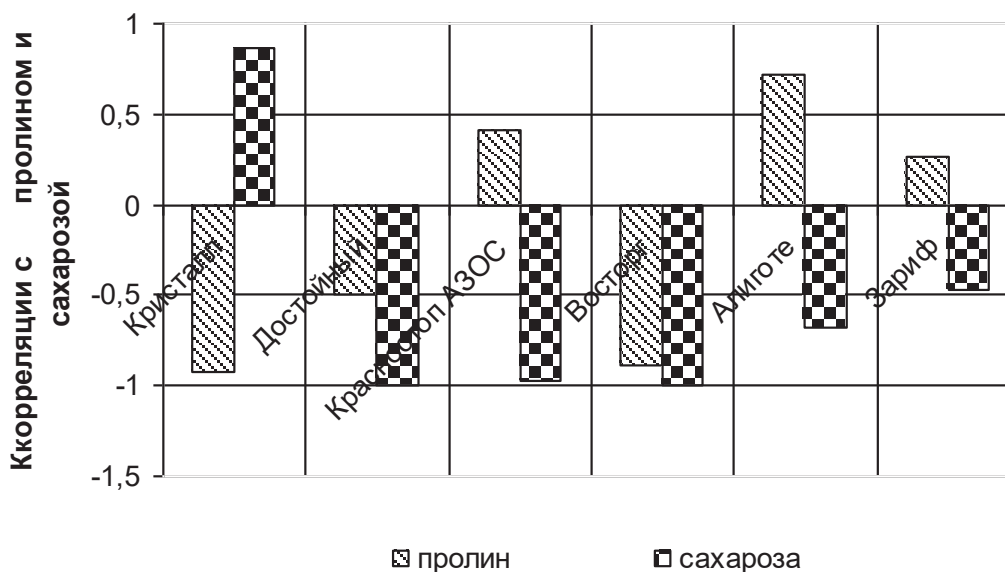


Рис. 5. Механизмы водоудерживающей способности листьев сортов винограда

При воздействии неблагоприятных условий, в частности засухи, в растениях начинает образовываться абсцизовая кислота (рис. 6). Большим содержанием абсцизовой кислоты в условиях августа 2018 г. отличались сорта Достойный, Восторг и Зариф (рис. 6).

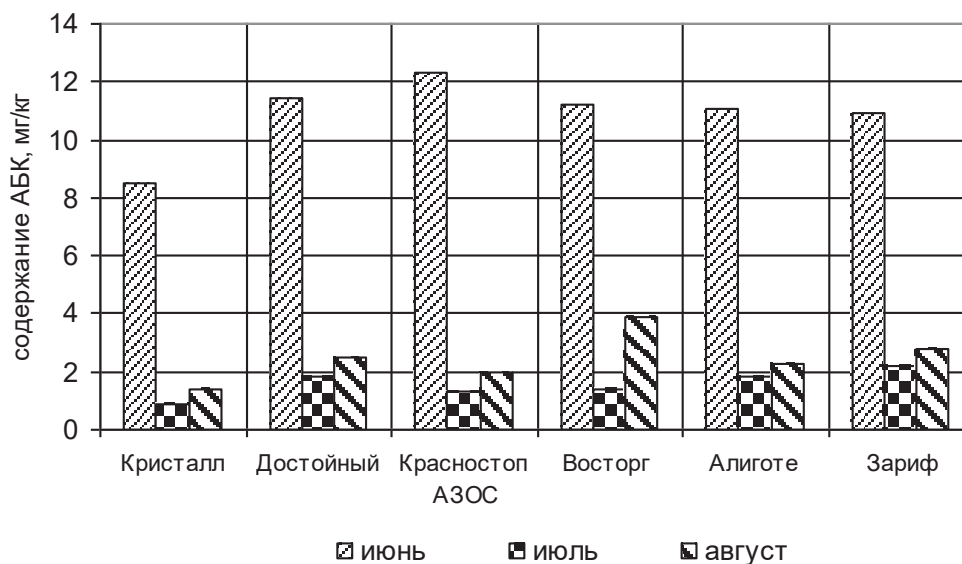


Рис. 6. Динамика содержания абсцизовой кислоты в листьях винограда в летний период 2018 г. (г. Анапа)

Одним из путей синтеза абсцизовой кислоты служит распад каротиноидов [14]. Найдена корреляционная зависимость между содержанием абсцизовой кислоты и каротиноидов в листьях изучаемых сортов винограда. Больше её количество установлено в листьях сортов Зариф, Восторг, Достойный, Кристалл ( $K_{коррел.} = -0,9 - -1,0$ )


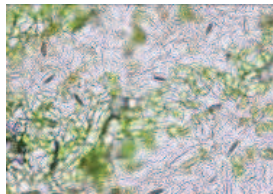
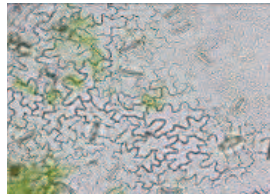
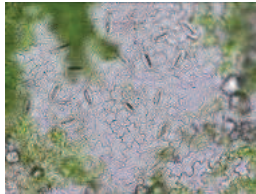
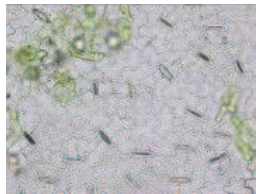
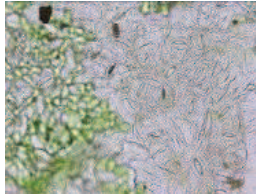
В условиях засухи абсцизовая кислота влияет на водный обмен, уменьшая размеры устьичной щели, что способствует удержанию влаги растениями винограда (табл.).

В летний период 2018 года по анатомо-морфологическим показателям у сортов Кристалл, Восторг в большей степени проявились признаки ксероморфной структуры листовой пластинки: толще слой палисадной паренхимы по сравнению с губчатой, лучше развит верхний эпидермис с кутикулой, большее количество устьиц на единицу площади листовой пластинки, меньше линейные размеры устьиц, что и обуславливает устойчивость растений к засухе [8].

Одним из показателей, характеризующих уровень окислительного стресса в растении в условиях засухи служит активность антиоксидантных ферментов, к которым относится пероксидаза. Анализ электрофоретических спектров водо-солеорастворимой фракции белков с пероксидазной активностью позволяет охарактеризовать экспрессивность генетических систем изучаемых сортов винограда и в комплексе с целым рядом физиолого-биохимических критериев оценить устойчивость растений к жаре и низкой влагообеспеченности [14].

Электрофоретический спектр белков с пероксидазной активностью в листьях сортов винограда представлен белками с молекулярной массой 250, 130, 110, 100, 80, 70, 60 кДа. В отличие от сорта Кристалл у сорта Достойный в листьях содержится большее количество белков с молекулярной массой 110, 100, 80 кДа, а у сорта Красностоп АЗОС – с молекулярной массой 100, 80 и 70, 60 кДа. Сорт Зариф отличается от остальных изученных сортов большим содержанием белков с молекулярной массой 250, 130, 110 кДа (рис. 7).

Биометрические показатели устьичного аппарата сортов винограда  
различного эколого-географического происхождения (июнь)

Сорт	Параметры устьичного аппарата, мкм.			Микрофото устьичного аппарата
	длина устьиц	ширина устьиц	кол-во, шт./мм <sup>2</sup>	
Достойный	24,4	16,1	201	
Красностоп АЗОС	27,7	13,1	205	
Кристалл	31,0	14,3	215	
Восторг	28,6	15,5	221	
Алиготе	27,3	13,5	218	
Зариф	25,2	16,0	210	



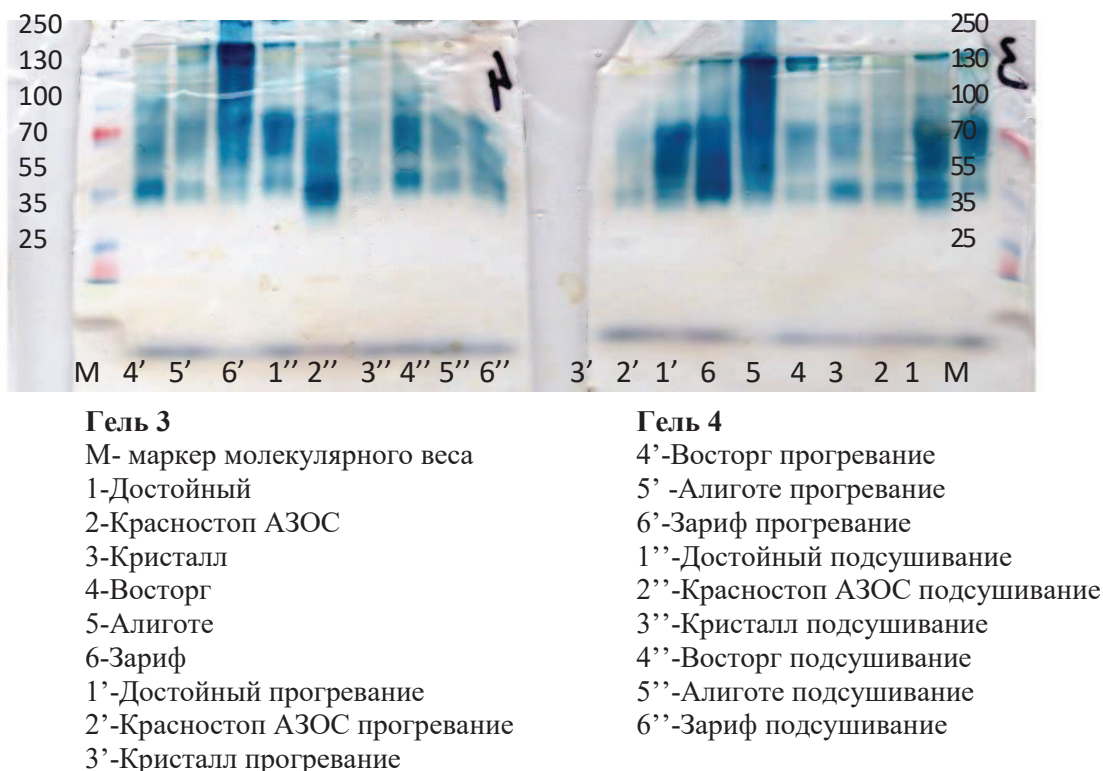


Рис. 7. Спектр водо-солерастворимых белков с пероксидазной активностью (К, Na-фосфатный буфер (рН 7,8) с добавлением 4 % Тритон Х-100) в листьях сортов винограда (август 2018 г., г. Анапа, ампелоколлекция)

Определение активности фермента пероксидазы в августе 2018 г. позволило установить, что среди изучаемых сортов большей пероксидазной активностью в обычных условиях выделяется сорт Кристалл; в модельных опытах при воздействии высокотемпературного стресса – сорта Кристалл и Восторг; при воздействии водного стресса – сорт Кристалл (рис. 8).



Рис. 8. Активность пероксидазы в листьях сортов винограда при тепловом и водном стрессах (август, 2018 г., г. Анапа, ампелоколлекция)

При воздействии высокотемпературного стресса в модельном опыте у сортов Достоянный и Красностоп АЗОС евро-американского происхождения увеличивается содержание белков с более низкой молекулярной массой: у сорта Достоянный – с молекулярной массой 110, 100, 80, 70, 60 кДа и у сорта Красностоп АЗОС – 110, 100, 80, 70 кДа. У винограда Восторг увеличивается содержание белков с молекулярной массой 70 и 60 кДа, у Алиготе снижается количество высокомолекулярных белков (250 кДа). У сорта Зариф уменьшается содержание белков с молекулярной массой 110, 100, 80 и 70 кДа.

При воздействии водного стресса в модельном опыте у сорта Достоянный снизилось содержание белков с молекулярной массой 100, 80 и 70 кДа, у сорта Красностоп АЗОС – 100, 80, 70 кДа, у сорта Восторг – 110, 100, 80 кДа, у сорта Алиготе – 100 и 80 кДа и у сорта Зариф значительно снизилось содержание высокомолекулярных белков (250, 130, 110 кДа). Таким образом, в августе 2018 г. сорта винограда Кристалл, Восторг, Алиготе оказались более устойчивыми к высокотемпературному и водному стрессу, что обусловлено более высоким содержанием белков теплового шока с молекулярной массой 80, 70 и 60 кДа.

При одновременном воздействии высокотемпературного и водного стрессов на растения винограда в условиях ампелоценоза в августе наблюдается нарушение функционирования клеток, вызванное, в том числе, разрушением клеточных мембран в связи с перекисным окислением липидов. При этом в клетках растений увеличивается содержание маркера окислительного стресса – малонового диальдегида – продукта перекисного окисления липидов, показателя степени повреждающего воздействия стресс-фактора. Установлено, что в июне и августе 2018 г. в листьях винограда сортов Кристалл, Достоянный, Восторг, Алиготе и Зариф при комплексном воздействии жары и засухи содержание малонового диальдегида снижается (рис. 9). Следовательно, они обладают комплексной устойчивостью к этим стресс-факторам.

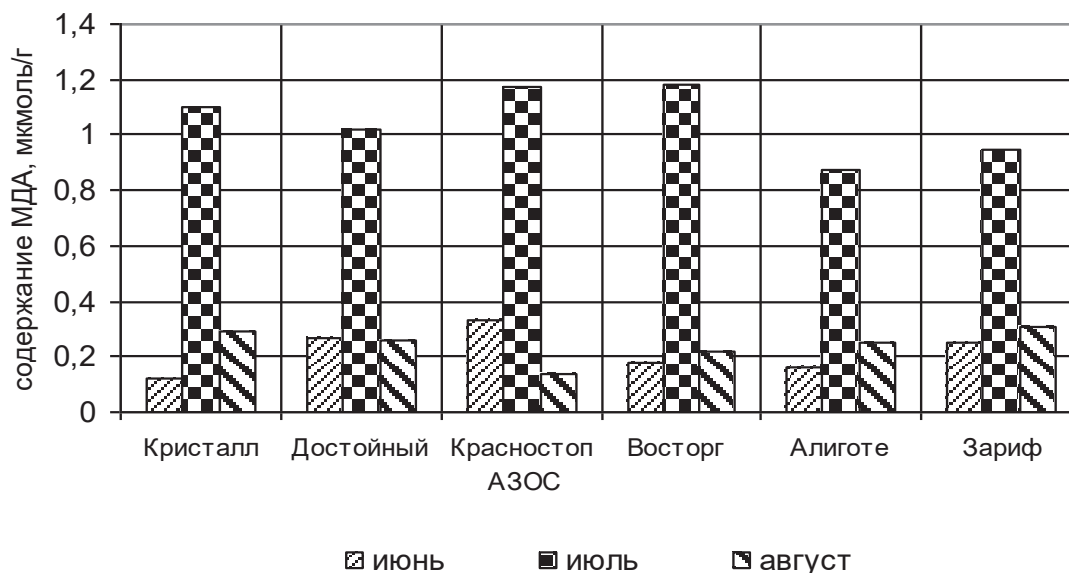


Рис. 9. Динамика содержания малонового диальдегида в листьях сортов винограда в летний период 2018 г. (г. Анапа)

В модельных опытах в листьях изучаемых сортов винограда определяли устойчивость клеточных мембран к разрушению под воздействием высоких температур с использованием кондуктометра (рис. 10).



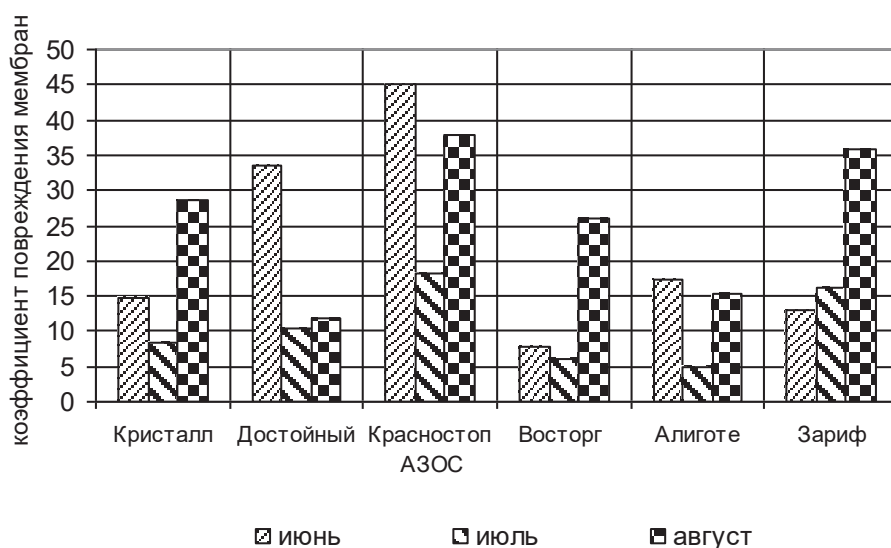


Рис. 10. Динамика жаростойкости сортов винограда в летний период 2018 г. (г. Анапа)

О жаростойкости сортов винограда свидетельствует такой показатель, как коэффициент повреждения мембран. Большой коэффициент повреждения мембран, а, следовательно, меньшая жаростойкость в августе отмечалась у сортов Красностоп АЗОС и Зариф.

Таким образом, по результатам модельных опытов сорта Алиготе и Кристалл более устойчивы к высокотемпературному стрессу, а сорта Кристалл, Восторг, Алиготе, Достойный – к водному стрессу.

Большую роль в регуляции устойчивости растений к окислительному стрессу играют аскорбиновая кислота, фенольные соединения, в том числе фенолкарбоновые кислоты [14]. В августе 2018 года большее содержание аскорбиновой кислоты отмечалось у сортов винограда Кристалл и Восторг, а фенолкарбоновых кислот – у сортов Кристалл, Достойный, Красностоп АЗОС, Алиготе (рис. 11, 12).

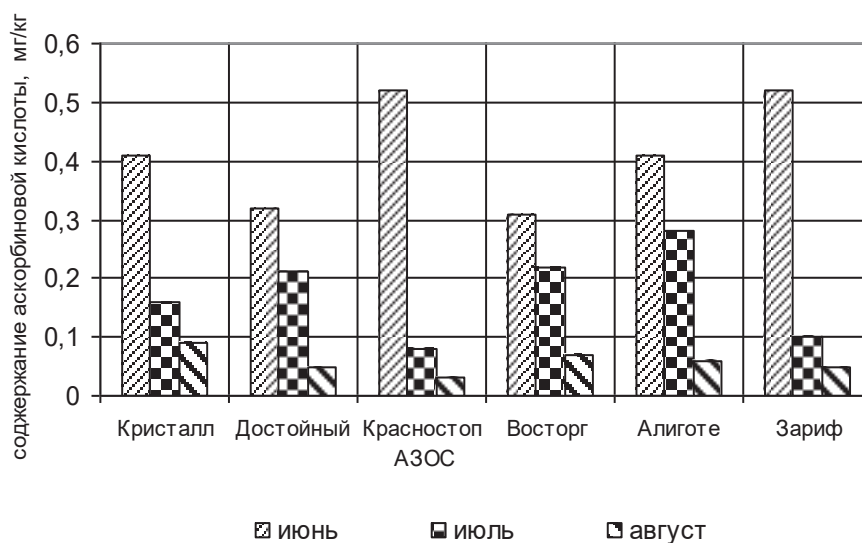


Рис. 11. Динамика содержания аскорбиновой кислоты в листьях сортов винограда в летний период 2018 г. (г. Анапа)

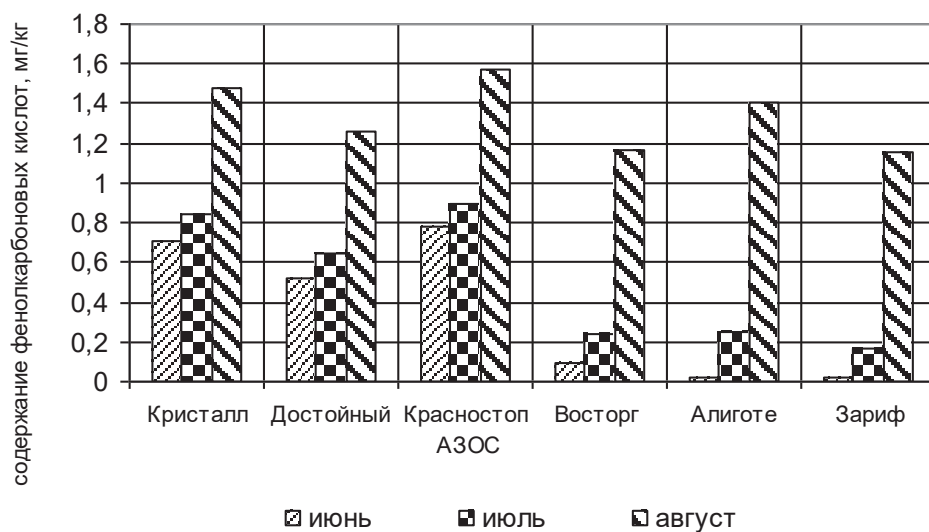


Рис. 12. Динамика содержания суммы фенолкарбоновых кислот в листьях сортов винограда в летний период 2018 г. (г. Анапа)

Одним из важных показателей засухоустойчивости служит содержание пигментов в листьях растений. В условиях засухи и экстремально высоких температур воздуха отмечается снижение содержания хлорофилла (а+б) в листьях винограда вследствие его разрушения, большее его количество у сортов Кристалл, Достойный, Восторг, Алиготе (рис. 13).

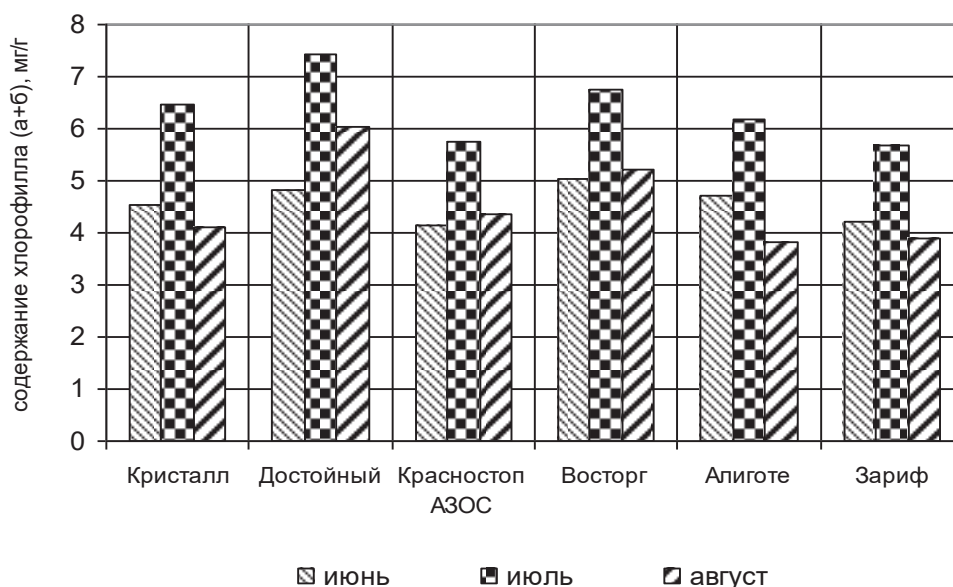


Рис. 13. Динамика содержания хлорофилла (а+б) в листьях винограда в летний период 2018 г. (г. Анапа)

Большее содержание каротиноидов, защищающих хлорофилл от разрушения, отмечалось в августе 2018 года у сортов винограда Кристалл, Достойный, Красностоп АЗОС, Восторг, Алиготе (рис. 14, 15).

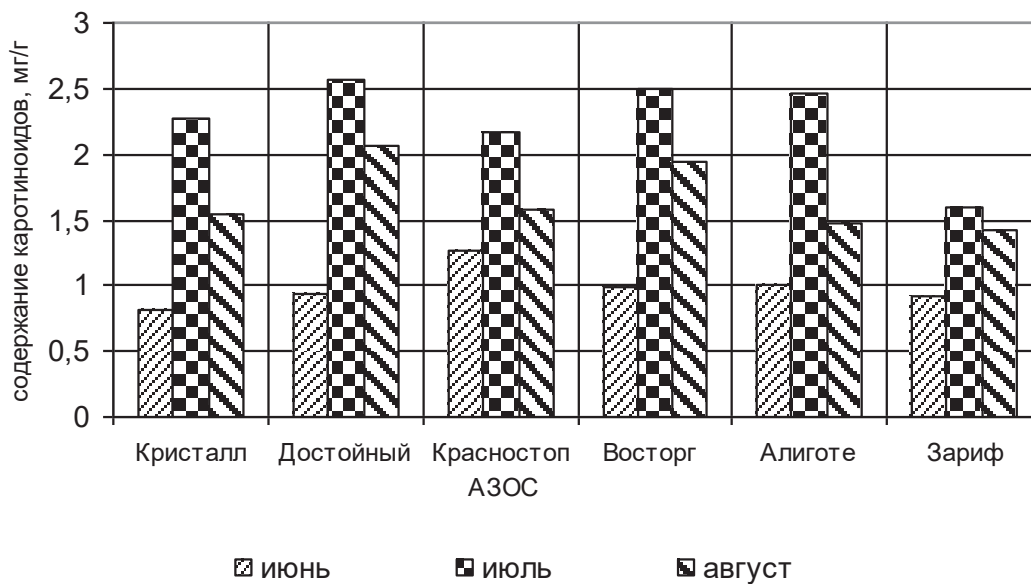


Рис. 14. Динамика содержания каротиноидов в листьях винограда в летний период 2018 г. (г. Анапа)

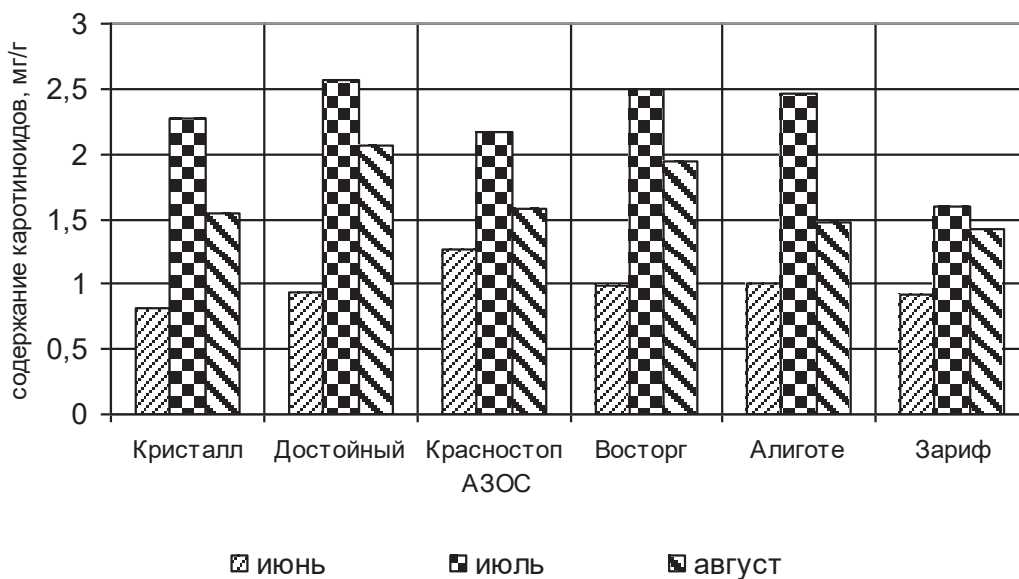


Рис.15. Динамика защитной функции каротиноидов к хлорофиллу в листьях винограда в летний период 2018 г. (г. Анапа)

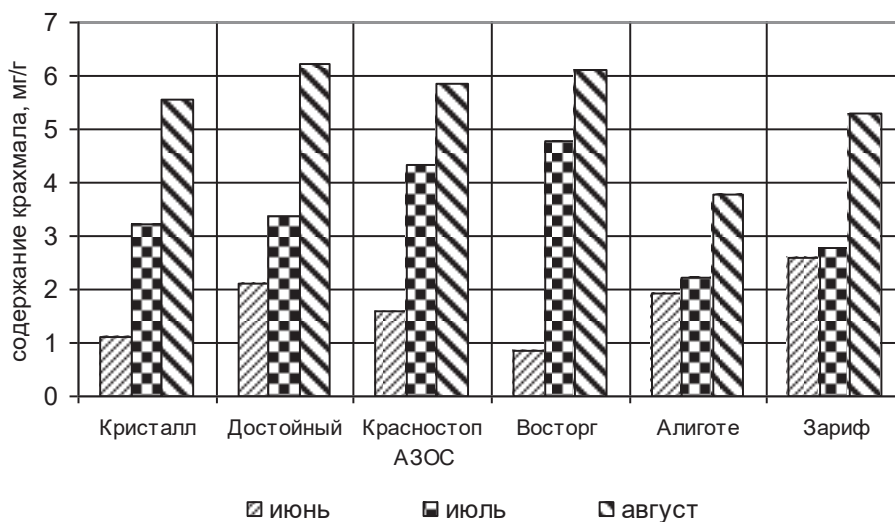


Рис. 16. Динамика содержания крахмала в листьях сортов винограда в летний период 2018 г. (г. Анапа)

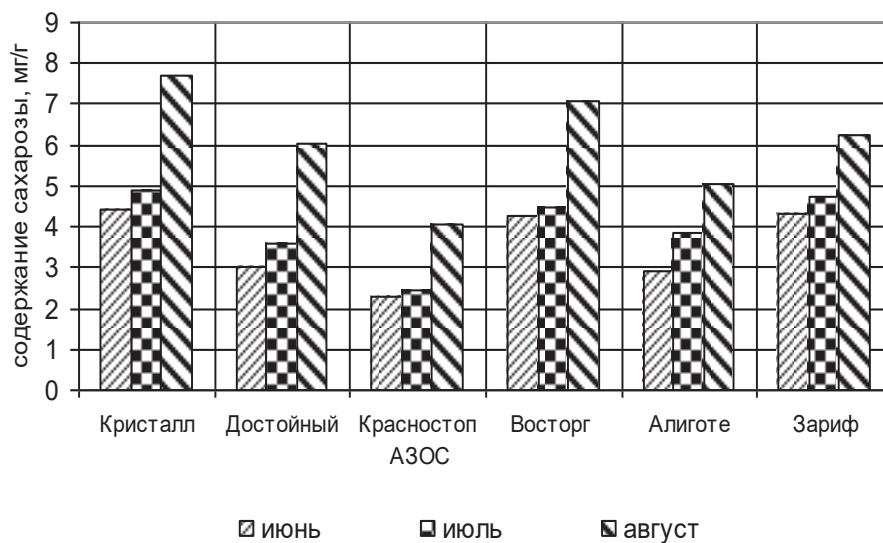


Рис.17. Динамика содержания сахарозы в листьях сортов винограда в летний период 2018 г. (г. Анапа)

В экстремальных условиях отмечается активация гидролиза белка, о чем свидетельствует уменьшение его содержания. Особенно наглядно это у винограда сортов Алиготе и Красностоп АЗОС. У остальных изучаемых сортов этот показатель варьировал от 13,06 до 17,07 мг/г (рис. 18).

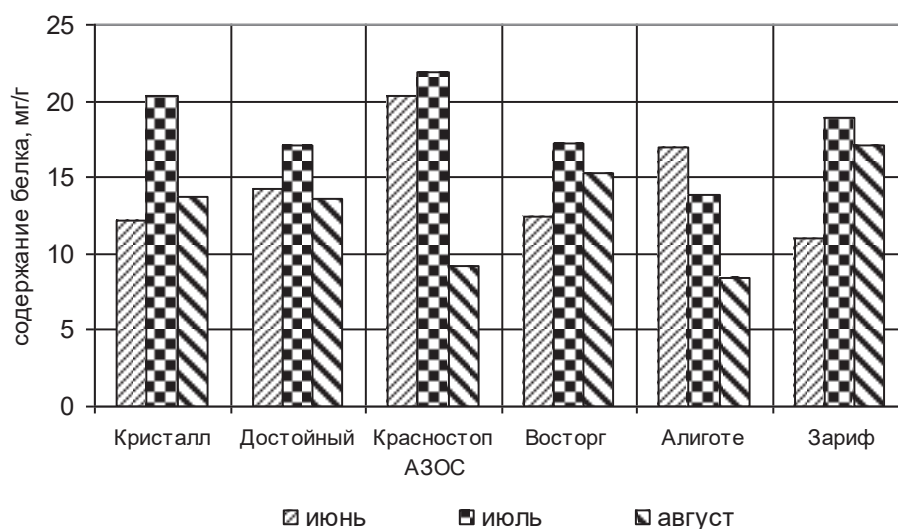


Рис. 18. Динамика содержания белка в листьях сортов винограда в летний период 2018 г. (г. Анапа)

Показателем адаптивности сорта к стрессовым факторам среды служит содержание органических кислот в листьях. Сорта Кристалл, Восторг и Алиготе характеризовались повышенным содержанием органических кислот, что снижало токсичность продуктов гидролиза белков, и характеризовало повышенную интенсивность дыхания растений, связанную с адаптационными процессами (рис. 19).

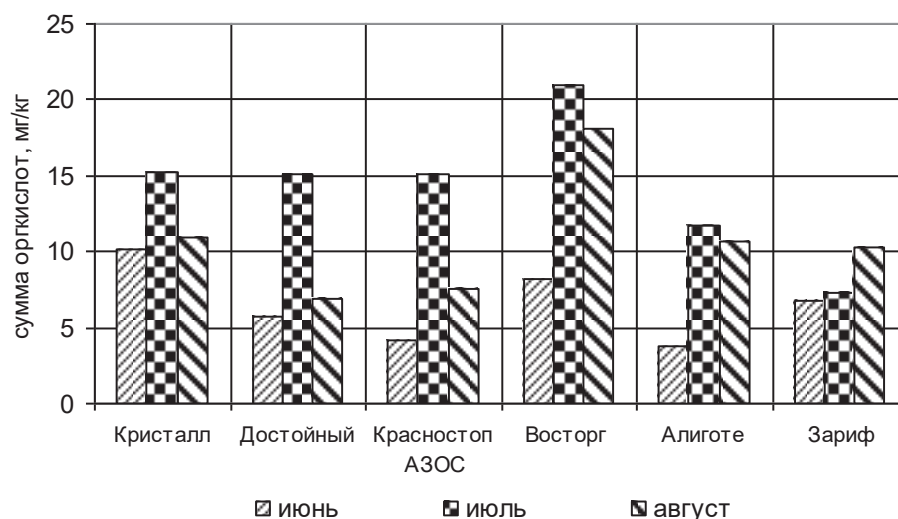


Рис. 19. Динамика содержания органических кислот в листьях сортов винограда в летний период 2018 г. г. Анапа

**Заключение.** Для характеристики гомеостаза сортов винограда изучен водный режим растений. Установлено, что на водный режим изучаемых сортов большее влияние оказывал температурный фактор. В летний период 2018 г. в сравнении с летним периодом 2017 г. содержание воды в листьях сортов винограда снижалось на 5,25-21,7 %.

Сорт Красностоп АЗОС оказался менее устойчивым, на протяжении летнего периода отношение содержания связанной воды к свободной у него изменялось в большей степени. Лучшей способностью сохранять постоянство внутренней среды характеризовались

сорта Кристалл, Достойный, Восторг, которые отличались от сортов Красностоп АЗОС, Алиготе и Зариф механизмом водоудерживающей способности.

Повышенная устойчивость к стрессорам лета у сортов Достойный, Восторг и Зариф связана с большим содержанием в листьях гормона стресса – абсцизовой кислоты, сужающей устьичные щели и снижающей водопотери. При анализе белковых спектров установлено, что они обладают пероксидазной активностью, а сорта Кристалл, Восторг, Алиготе оказались более устойчивыми к высокотемпературному и водному стрессу, что обусловлено более высоким содержанием белков теплового шока с молекулярной массой 80, 70 и 60 кДа. Сорта амуро-американского происхождения Кристалл и Восторг также характеризуются большей активностью пероксидазы, что защищает их от окислительного стресса. Таким образом, сорта винограда Кристалл, Достойный и Алиготе обладают лучшим гомеостазом, в сравнении с сортами Красностоп АЗОС и Зариф.

### Литература

1. Жученко А.А. Адаптивная система селекции растений (эколого-генетические основы). Т. II. М.: Изд-во РУДН «Агрорус», 2001. 708 с.
2. Егоров Е.А., Шадрина Ж.А., Кочьян Г.А. Модель и механизм управления процессами ресурсосбережения в промышленном плодоводстве и виноградарстве // Научные труды СКЗНИИСиВ. Т. 12. Краснодар: СКЗНИИСиВ, 2017. С. 7-12
3. Arun-Chinnappa K.S., Ranawake L., Seneweera S. Impacts and Management of Temperature and Water Stress in Crop Plants. In: Minhas, P., Rane, J., Pasala, R. (eds.) Abiotic Stress Management for Resilient Agriculture. Singapore: Springer. 2017: 221-233
4. Nenko N.I., Ilina I.A., Kiseleva G.K., Sundryeva M.A. Physiological and biochemical characteristics of grape varieties of different ecological and geographical origin to the stress factors of summer season // Austrian Journal of Technical and Natural Sciences, 2017.- № 1-2.- P.4-11
5. Ryan, C.A. The systemic signalling pathways: differential activation of plant defensive genes / C.A. Ryan // Biochim. Biophys. Acta. 2000. № 1477. P. 112–121.
6. Yordanov I. Velikova V., Tsonev T. Plant responses to drought and stress tolerance / I. Yordanov, Environmental Stress and Sustainable Agriculture «ESSA»: proceedings of the European Workshop (Varna. 7-12 Sept., 2002) // Bulg. J. Plant Physiol, Spec. Issue. - 2003. – V. XXIX, No 3-4. – P. 187-206.
7. Физиологические и биохимические изменения технических сортов винограда в весенне-летний период / И.А. Ильина, В.С. Петров, Н.И. Ненько, В.В. Кудряшова, Н.М. Запорожец, Т.А. Схаляхо // Виноделие и виноградарство. 2009. № 5. С. 20-22.
8. Современные инструментально-аналитические методы исследования плодовых культур и винограда / под общ. ред. Н.И. Ненько. Краснодар: СКЗНИИСиВ, 2015. 115 с.
9. Ненько Н.И., Ильина И.А., Петров В.С., Сундырева М.А. Физиолого-биохимические методы изучения исходного и селекционного материала // Современные методологические аспекты организации селекционного процесса в садоводстве и виноградарстве. Краснодар: СКЗНИИСиВ, 2012. С. 530-540.
10. Методическое и аналитическое обеспечение исследований по садоводству. Краснодар: СКЗНИИСиВ. 2010. 300 с.
11. Доспехов, Б.А. Методика полевого опыта. М.: Колос. 1979. 415 с.
12. Кузнецов В.В., Шевякова Н.И. Пролин при стрессе: биологическая роль, метаболизм, регуляция // Физиология растений. 1999. Т. 46. № 2. С. 321-336.
13. Jie Y., Yang H., Zhang H., Zhang W. Promotion of proline accumulation in apple leaves by bioregulators. Acta Hort., 2008 774, 237-242 (doi: 0.17660/ActaHortic.2008.774.30)
14. Кошкин Е.И. Физиология устойчивости сельскохозяйственных культур. М.: Дрофа, 2010. 640 с.