

АДАПТИВНЫЕ ПЕРЕСТРОЙКИ МЕТАБОЛИЗМА ВИНОГРАДА В ЗИМНИЙ ПЕРИОД*

Галина Константиновна Киселева, кандидат биологических наук
Ирина Анатольевна Ильина, доктор технических наук
Наталья Михайловна Запорожец, кандидат сельскохозяйственных наук
Виктория Викторовна Соколова, кандидат сельскохозяйственных наук
Евгений Олегович Луцкий

Северо-Кавказский федеральный научный центр садоводства, виноградарства, виноделия, г. Краснодар, Россия
E-mail: galina-kiseleva-1960@mail.ru

Аннотация. В нестабильных погодных условиях Анапо-Таманской зоны Краснодарского края актуальность проблемы зимостойкости винограда возрастает в связи с повышением среднегодовой температуры воздуха на фоне увеличения частоты проявления низких критических температур в зимний период. Изучены адаптивные перестройки метаболизма винограда, связанные с устойчивостью к зимним стрессам. Исследованы сорта винограда различного эколого-географического происхождения: Кристалл, Достойный, Красностоп АЗОС, Восторг, Алиготе, Зариф. Проведенным электрофоретическим разделением пероксидаз в полиакриламидном геле у изучаемых сортов винограда выявлено, что количественный и качественный состав изоформ изменяется в течение зимнего периода и зависит от сорта и влияния стрессового фактора. Осенью и зимой у сортов Кристалл, Красностоп АЗОС, Восторг отмечено повышенное суммарное содержание антоцианов (13,2–14,4 усл. ед.), аскорбиновой кислоты в побегах (13,7–18,4 мкг/г сырого веса) в отличие от Алиготе и Зариф. По результатам исследований установлено, что Кристалл обладает повышенной морозостойкостью, за ним в порядке убывания следуют Красностоп АЗОС, Восторг, Достойный. Указанные сорта обладают большими адаптивными возможностями в нестабильных условиях меняющегося климата и их можно рекомендовать для возделывания в Анапо-Таманской зоне, а также использования в селекции как источников морозостойкости. Сорта Алиготе, Зариф менее морозостойкие.

Ключевые слова: виноград, Анапо-Таманская зона, сорт, морозостойкость, электрофоретическое разделение пероксидаз, антоцианы, аскорбиновая кислота

ADAPTIVE RESTRUCTURING OF GRAPE METABOLISM IN WINTER PERIOD

G.K. Kiseleva, PhD in Biological Sciences
I.A. Ilyina, Grand PhD in Engineering Sciences
N.M. Zaporozhets, PhD in Agricultural Sciences
V.V. Sokolova, PhD in Agricultural Sciences
E.O. Lutsky

Federal State Budgetary Scientific Institution North Caucasian Federal scientific center for horticulture, viticulture, winemaking, Krasnodar, Russia
E-mail: galina-kiseleva-1960@mail.ru

Abstract. In the unstable conditions of the Anapo-Taman zone of the Krasnodar Krai, the urgency of the problem of winter hardiness of grapes increases due to an increase in the average annual air temperature against the background of an increase in the frequency of low critical air temperatures in the winter. The adaptive rearrangements of grape metabolism associated with resistance to winter stresses have been studied. Objects of research: grape varieties of different ecological and geographical origin: Crystal, Dostoiny, Krasnostop AZOS, Vostorg, Aligote, Zarif. The electrophoretic separation of peroxidases in polyacrylamide gel in the studied grape varieties revealed that the quantitative and qualitative composition of isoforms changed during the winter period and depended on the variety and the influence of the stress factor. During the autumn-winter period, the varieties Crystal, Krasnostop AZOS, Vostorg revealed an increased total content of anthocyanins in (13.2–14.4 conventional units), ascorbic acid in shoots (13.7–18.4 µg/g of raw weight) in contrast to the varieties Aligote, Zarif. According to the research, it was found that the Crystal grape variety has increased frost resistance, followed in descending order by Krasnostop AZOS, Vostorg, Dostoiny. These varieties have great adaptive capabilities in unstable conditions of a changing climate and are recommended for cultivation in the Anapo-Taman zone, as well as for use in breeding as sources of frost resistance. Varieties Aligote, Zarif are singled out as less frost-resistant.

Keywords: grapes, Anapo-Taman zone, variety, frost resistance, electrophoretic separation of peroxidases, anthocyanins, ascorbic acid

Виноград — высокорентабельная сельскохозяйственная культура, приоритетная для возделывания на Юге России в промышленных масштабах. Из-за большого содержания витаминов, микроэлементов и антиоксидантов ягоды винограда используют для

потребления в свежем виде и производства соков и вина. [3]

Урожайность винограда и качество ягод зависит от условий возделывания, агротехнических приемов, экологических факторов. Важное значение для

* Исследование выполнено при финансовой поддержке Кубанского научного фонда в рамках научного проекта № МФИ-20.1/19 / The research was carried out with the financial support of the Kuban Scientific Foundation within the framework of the scientific project No. IFI-20.1/19.

растения имеет температура воздуха. На территории Анапо-Таманской зоны среднегодовая температура воздуха с 1960 по 1985 год уменьшилась на 0,8°C, а с 1986 по 2021 увеличилась на 2,2°C; максимальная температура воздуха с 1960 по 2021 год возросла на 3,3°C, минимальная – 2,3°C. В то же время участились стрессовые температуры воздуха в зимний период. Если с 1960 по 1990 годы минимальная температура воздуха (ниже минус 18°C) опускалась два раза, то с 1991 по 2021 – пять. [6]

Важным требованием к современному сортименту винограда становится его экологическая пластичность и высокая адаптивность к абиотическим стрессам. [3] Физиолого-биохимические показатели (водный режим, активность ферментов, содержание углеводов, фенольных соединений, аскорбиновой кислоты, пролина) широко используют для выявления устойчивых к низким температурам сортов плодовых и других растений. [5, 11, 13–15]

Цель работы – выявить устойчивые сорта винограда к стрессорам зимнего периода по электрофоретическому разделению пероксидаз, содержанию антоцианов, аскорбиновой кислоты для возделывания в условиях Анапо-Таманской зоны Краснодарского края и использования в селекции.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Образцы отбирали в осенне-зимние периоды 2020–2022 годов на участках ампелографической коллекции Анапской зональной опытной станции виноградарства и виноделия (АЗОСВиВ) – филиал ФГБНУ СКФНЦСВВ (г. Анапа). Физиолого-биохимические исследования проводили в лаборатории физиологии и биохимии растений, центре коллективного пользования технологичным оборудованием по направлениям: геномные и постгеномные технологии; физиолого-биохимические и микробиологические, почвенные, агрохимические и экотоксикологические исследования; пищевая безопасность.

Объект изучения – межвидовые гибриды винограда: *Кристалл* (контроль) – евро-амуро-американского происхождения; *Красностоп АЗОС*, *Достойный* – евро-американского; *Восторг* – амуро-американского; *Зариф* – восточно-европейского; *Алиготе* – западно-европейского происхождения. Год посадки растений – 1995, подвой – Кобер 5ББ. Формировка – двусторонний высокоштамбовый спиральный кордон АЗОС. Возделывали растения на черном паре, схема посадки – 3 × 2,5 м.

Биохимические показатели определяли в однолетних побегах, с которых скальпелем снимали слои опробковевшей и отмершей корки. Затем соскабливали луб с древесиной до сердцевины, измельчали ножницами, из средней пробы брали навеску. Исследования проводили в трехкратной повторности (по 10 побегов). Для получения белкового экстракта использовали жидкий азот. Количество белка в пробах определяли по методике М. Bradford. [10] Экстракты, содержащие 10 мкг белка, разделяли нативным электрофорезом в 12%-м полиакриламидном геле на вертикально расположенных пластинах с последующим окрашиванием бензидином и добавлением пероксида водорода. [7]

В качестве белкового маркера использовали Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder, Thermo Scientific (USA). Перед искусственным промораживанием (морозильная камера Gronland, 24 ч, минус 20°C) и после него побеги выдерживали в холодильной камере при температуре 4°C пять дней.

Для анализа содержания антоцианов из средней пробы побегов отбирали навеску массой 0,2 г, измельчали и заливали 10 мл 0,1 N соляной кислоты, настаивали 2 ч при периодическом взбалтывании. После центрифугирования интенсивность окраски измеряли на фотокалориметре ФЭК-56, длина волны – 490 нм. Полученные результаты измерений оптической плотности выражали в условных единицах согласно методике. [8] Содержание аскорбиновой кислоты устанавливали методом капиллярного электрофореза на приборе Капель 104Р по методике, основанной на получении электрофоретической картины с помощью прямого детектирования поглощающих компонентов пробы. [9] Экспериментальные данные обрабатывали общепринятыми методами вариационной статистики. [2]

РЕЗУЛЬТАТЫ

За изучаемый период в ноябре максимальная температура воздуха достигала 20°C, минимальная – минус 2°C, декабре – 19°C, минус 8°C, январе – 17°C, минус 10°C, феврале – 16°C, минус 10°C соответственно. Среднемесячное количество осадков – 47,3; 71,0; 85,5; 52,5 мм соответственно.

В стрессовых для растений условиях изменяется изоферментный состав пероксидазы, формируется уникальный набор молекулярных форм фермента (изоформы). При низкой температуре электрофоретический спектр пероксидазы расширяется у растений пшеницы, яблони, винограда. [1, 4, 13]

Проведенным нами электрофоретическим разделением пероксидаз в полиакриламидном геле у сортов выделено три группы изоформ, выявлена их разнокачественность (рис. 1).

В первой группе пероксидазы с молекулярной массой 40, 45, 50 кДа. Изоформы с молекулярной массой 40 кДа (инертные) обнаружены у всех изучаемых сортов, их активность не связана с температурой, они всегда присутствовали в электрофоретическом спектре. Изоформы с массой 45 кДа отмечены у всех сортов только в ноябре, по-видимому, их наличие связано с подготовкой к зимовке. Изоформы с массой 50 кДа найдены в ноябре и январе только у *Кристалла*, у остальных сортов они появлялись в феврале. На основании этого *Кристалл* можно считать сортом с повышенной морозостойкостью. Также изоформы с массой 50 кДа наблюдали при искусственном промораживании побегов при минус 20°C у сорта *Красностоп АЗОС*, поэтому по степени устойчивости его можно поставить после сорта *Кристалл*.

Вторая группа включает изоформы с массой 60, 70 и 90 кДа. Пероксидазы с массой 60 кДа обнаружены в феврале у *Кристалла*, они связаны с повышенной морозостойкостью в конце зимы. Изоформы с массой 70 кДа присутствуют всегда у всех сортов, это инертные формы пероксидаз. Изоформа с массой 90 кДа определена в ноябре у *Кристалла*,

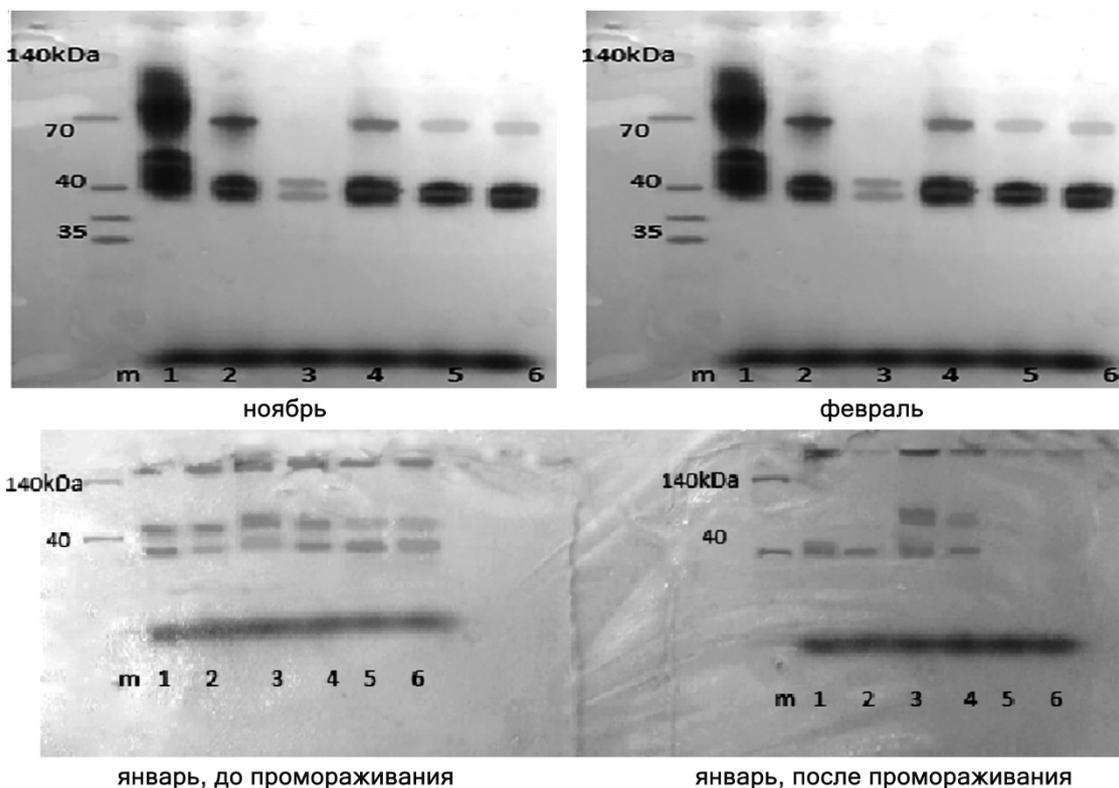


Рис. 1. Электрофоретические энзимограммы изоформ пероксидаз:

1 – *Кристалл*, 2 – *Достойный*, 3 – *Красностон АЗОС*, 4 – *Восторг*, 5 – *Алиготе*, 6 – *Зариф*, m – белковый маркер.

январе – *Восторга*. Она не появляется у последнего после искусственного промораживания, следовательно, *Восторг* менее морозостойчив, чем *Кристалл*.

Третью группу составляют пероксидазы с молекулярной массой 120 и 140 кДа. Изоформы с массой 120 кДа обнаружены в ноябре только у *Кристалла*, в феврале они появляются у всех остальных сортов. Следует отметить, что в январе, в период проявления максимальной морозостойкости и при искусственном промораживании их нет, по-видимому, они не связаны с устойчивостью к экстремально низким температурам. Изоформы с массой 140 кДа найдены у всех сортов в ноябре и январе, в феврале они остаются у сортов *Кристалл*, *Достойный*, *Красностон АЗОС*, *Восторг*, а у *Алиготе*, *Зариф*, выделенных как менее морозостойкие, исчезают, при искусственном промораживании появляются только у *Красностана АЗОС*, *Восторга*, что подтверждает их большую степень морозостойкости по сравнению с *Достойным*, *Алиготе*, *Зарифом*.

Количественный и качественный состав изоформ меняется в зависимости от сорта и влияния стрессового фактора. Только у *Кристалла* в отличие от других сортов обнаружено большее количество изоформ, в том числе специфических (масса – 50, 60, 90 кДа), связанных с его повышенной морозостойкостью. У *Красностана АЗОС* изоформа с массой 50 кДа появляется только при искусственном промораживании, у *Восторга* изоформа с массой 90 кДа – в январе. Поэтому по степени морозостойкости в порядке убывания за *Кристаллом* следуют *Красностон АЗОС*, *Восторг*, *Достойный*, *Алиготе*, *Зариф*, так как у них в феврале исчезают

изоформы с массой 140 кДа в отличие от других изучаемых сортов.

Подготовка виноградной лозы к зиме сопровождается изменениями в метаболизме антоцианов, выполняющих защитную функцию к переменным температурам, как термоаккумулирующий свето-защитный барьер. [4, 5]

В наших исследованиях максимальное содержание антоцианов обнаружено в декабре – 3,2...6,5 усл. ед. в зависимости от сорта (рис. 2).

В январе и феврале содержание антоцианов у всех сортов уменьшалось в связи с расходом на формирование защитного ответа. Повышенное суммарное количество антоцианов отмечено у *Кристалла*, *Красностана АЗОС*, *Восторга* (13,2...14,4 усл. ед.), пониженное – *Алиготе*, *Зарифа* (10,6...10,9 усл. ед.).

Аскорбиновая кислота – косвенный показатель морозостойкости растений. Ее защитные свойства проявляются в торможении поступления воды, изменении ее подвижности внутри клеток. Сорта растений с повышенной зимостойкостью накапливали больше аскорбиновой кислоты. [5, 12] За осенне-зимний период ее повышенное суммарное содержание отмечено у *Кристалла*, *Красностана АЗОС*, *Восторга* (13,7...18,4 мкг/г сырого веса), пониженное – *Алиготе*, *Зарифа* (9,8...10,2 мкг/г сырого веса) (рис. 3).

Данные электрофоретического разделения пероксидаз, содержание антоцианов, аскорбиновой кислоты в побегах можно рассматривать в качестве критериев устойчивости сортов винограда к пониженным температурам зимнего периода. По этим параметрам установлено, что сорт винограда *Кристалл* обладает повышенной морозостойкостью,

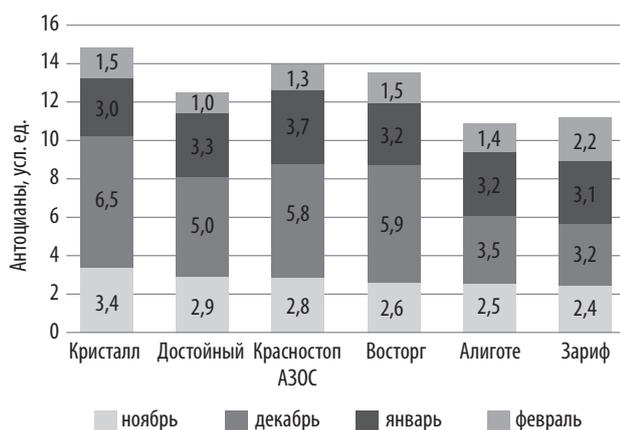


Рис. 2. Динамика суммарного содержания антоцианов в коре винограда (средние значения) в осенне-зимние периоды 2020–2022 годов. НСР_{0,05}: ноябрь – 1,31; декабрь – 1,96; январь – 2,01; февраль – 1,85.

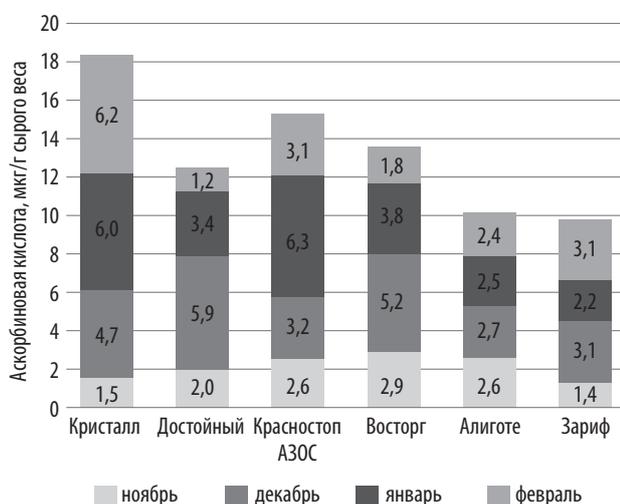


Рис. 3. Динамика суммарного содержания аскорбиновой кислоты в побегах винограда (средние значения) в осенне-зимние периоды 2020–2022 годов. НСР_{0,05}: ноябрь – 1,92; декабрь – 0,86; январь – 1,12; февраль – 1,34.

за ним в порядке убывания следуют *Красностоп AZOS*, *Восторг*, *Достойный*. Указанные сорта обладают большими адаптивными возможностями в нестабильных условиях меняющегося климата и их можно рекомендовать для возделывания в Анапато-Таманской зоне, а также использования в селекции как источников морозостойкости. Сорта *Алиготе*, *Зариф* менее морозостойкие.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Голышкина Л.В. Электрофорез в полиакриламидном геле белковых систем плодовых культур // Селекция и сорторазведение садовых культур. Орел: ВНИИСПК, 2007. С. 56–63.
2. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов исследований). М.: Альянс, 2014. 351 с.
3. Егоров Е.А. Селекция винограда – ключевое звено в развитии виноградарства // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2021. № 25 (4). С. 408–413. DOI: 10.18699/VJ21.045.

4. Колупаев Ю.Е., Горелова Е.И., Ястреб Т.О. Механизмы адаптации растений к гипотермии: роль антиоксидантной системы // Вестник Харьковского национального аграрного университета. Серия биология. 2018. № 1 (43). С. 6–33.
5. Красова Н.Г. Адаптивный потенциал сортов яблони // Садоводство и виноградарство. 2015. № 3. С. 38–45. DOI: 10.31676/0235-2591-2015-3-38-45.
6. Петров В.С., Ильина И.А., Панкин М.И. и др. Методология системного управления продукционным потенциалом ампелоценозов в условиях изменения климата и интенсификации производства // Научные труды СКФНЦСВВ. 2022. Т. 34. С. 99–112. DOI: 10.30679/2587-9847-2022-34-99-112.
7. Радюкина Н.Л., Иванов Ю.В., Шевякова Н.И. Методы оценки содержания активных форм кислорода, низкомолекулярных антиоксидантов и активностей основных антиоксидантных ферментов // Молекулярно-генетические и биохимические методы в современной биологии растений. Под ред. Вл.В. Кузнецова, В.В. Кузнецова, Г.А. Романова. М.: 2012, С. 355–356.
8. Соловьева М.А. Оценка зимостойкости плодовых культур // Диагностика устойчивости растений к стрессовым воздействиям (методическое руководство). Ленинград: ВИР, 1988. С. 163–164.
9. Якуба Ю.Ф., Ильина И.А., Захарова М.В., Лифарь Г.В. Методика определения массовой концентрации аскорбиновой, хлорогеновой и кофейной кислот в побегах и листьях плодовых культур и винограда с применением капиллярного электрофореза // Современные инструментально-аналитические методы исследования плодовых культур и винограда. Краснодар: СКЗНИИСиВ, 2015. С. 68–73.
10. Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Analytical Biochemistry. 1976. No. 72. P. 248–254. DOI: 10.1016/0003-2697(76)90527-3
11. Călugăr A., Cordea M.I., Babeş A., Fejer M. Dynamics of Starch Reserves in Some Grapevine Varieties (*Vitis vinifera* L.) During Dormancy // Bulletin UASVM Horticulture. 2019. No. 76 (2). P. 185–192. DOI: 10.15835/buasvmcn-hort:2019.0008.
12. Ishikawa T., Maruta T., Yoshimura K., Smirnoff N. Biosynthesis and regulation of ascorbic acid in plants // Antioxidants and antioxidant enzymes in higher plants. Springer, Cham, 2018. P. 163–179. DOI: 10.1007/978-3-319-75088-0.
13. Jahnke G. Isoenzyme and microsatellite analysis of *Vitis vinifera* L. varieties from the Hungarian grape germplasm // Scientia Horticulturae. 2009. No. 120 (2). P. 213–221. DOI: 10.1016/j.scienta.2008.11.021.
14. Karami H., Rezaei M., Sarkhosh A. Cold Hardiness Assessment in Seven Commercial Fig Cultivars (*Ficus carica* L.) // Gesunde Pflanzen. 2018. No. 70. P. 195–203. DOI: 10.1007/s10343-018-0431-2.
15. Wang Y., Hu Y., Chen B. et al. Physiological mechanisms of resistance to cold stress associated with 10 elite apple rootstocks // Journal of integrative agriculture. 2018. No. 17 (4). P. 857–866. DOI: 10.1016/S2095-3119(17)61760-X.

REFERENCES

1. Golyshkina L.V. Elektroforez v poliakrilamidnom gele belkovykh sistem plodovykh kul'tur // Selekcija i sortorazvedenie sadovykh kul'tur. Orel: VNIISPК, 2007. S. 56–63.

2. Dospekhov B.A. Metodika polevogo opyta (s osnovami statisticheskoy obrabotki rezul'tatov issledovaniy). M.: Al'yans, 2014. 351 s.
3. Egorov E.A. Selekcija vinograda – klyuchevoe zveno v razvitii vinogrado-vinodel'cheskoj otrasli // Vavilovskij zhurnal genetiki i selekcii. 2021. № 25 (4). S. 408–413. DOI: 10.18699/VJ21.045.
4. Kolupaev Yu.E., Gorelova E.I., Yastreb T.O. Mekhanizmy adaptacii rastenij k gipotermii: rol' antioksidantnoj sistemy // Vestnik Har'kovskogo nacional'nogo agrarnogo universiteta. Seriya biologiya. 2018. № 1 (43). S. 6–33.
5. Krasova N.G. Adaptivnyj potencial sortov yabloni // Sadovodstvo i vinogradarstvo. 2015. № 3. S. 38–45. DOI: 10.31676/0235-2591-2015-3-38-45.
6. Petrov V.S., Il'ina I.A., Pankin M.I. i dr. Metodologiya sistemnogo upravleniya produkcionnym potencialom ampelocenzov v usloviyah izmeneniya klimata i intensivizacii proizvodstva // Nauchnye trudy SKFNCSVV. 2022. T. 34. S. 99–112. DOI: 10.30679/2587-9847-2022-34-99-112.
7. Radyukina N.L., Ivanov Yu.V., Shevyakova N.I. Metody ocenki sodержaniya aktivnyh form kisloroda, nizkomolekulyarnyh antioksidantov i aktivnostej osnovnyh antioksidantnyh fermentov // Molekulyarno-geneticheskie i biohimicheskie metody v sovremennoj biologii rastenij. Pod red. V.I.V. Kuznecova, V.V. Kuznecova, G.A. Romanova. M.: 2012, S. 355–356.
8. Solov'eva M.A. Ocenka zimostojkosti plodovyh kul'tur // Diagnostika ustojchivosti rastenij k stressovym vozdeystviyam (metodicheskoe rukovodstvo). Leningrad: VIR, 1988. S. 163–164.
9. Yakuba Yu.F., Il'ina I.A., Zaharova M.V., Lifar' G.V. Metodika opredeleniya massovoj koncentracii askorbinovoj, hlorogenovoj i kofejnoj kislot v pobegah i list'yah plodovyh kul'tur i vinograda s primeneniem kapillyarnogo elektroforeza // Sovremennye instrumental'no-analiticheskie metody issledovaniya plodovyh kul'tur i vinograda. Krasnodar: SKZ-NIISiV, 2015. S. 68–73.
10. Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Analytical Biochemistry. 1976. No. 72. P. 248–254. DOI: 10.1016/0003-2697(76)90527-3.
11. Călugăr A., Cordea M.I., Babeş A., Fejer M. Dynamics of Starch Reserves in Some Grapevine Varieties (*Vitis vinifera* L.) During Dormancy // Bulletin UASVM Horticulture. 2019. No. 76 (2). P. 185–192. DOI: 10.15835/buasvmcn-hort:2019.0008.
12. Ishikawa T., Maruta T., Yoshimura K., Smirnov N. Biosynthesis and regulation of ascorbic acid in plants // Antioxidants and antioxidant enzymes in higher plants. Springer, Cham, 2018. P. 163–179. DOI: 10.1007/978-3-319-75088-0.
13. Jahnke G. Isoenzyme and microsatellite analysis of *Vitis vinifera* L. varieties from the Hungarian grape germplasm // Scientia Horticulturae. 2009. No. 120 (2). P. 213–221. DOI: 10.1016/j.scienta.2008.11.021.
14. Karami H., Rezaei M., Sarkhosh A. Cold Hardiness Assessment in Seven Commercial Fig Cultivars (*Ficus carica* L.) // Gesunde Pflanzen. 2018. No. 70. P. 195–203. DOI: 10.1007/s10343-018-0431-2.
15. Wang Y., Hu Y., Chen B. et al. Physiological mechanisms of resistance to cold stress associated with 10 elite apple rootstocks // Journal of integrative agriculture. 2018. No. 17 (4). P. 857–866. DOI: 10.1016/S2095-3119(17)61760-X.

Поступила в редакцию 03.03.2023

Принята к публикации 17.03.2023