

Н. И. Ненько, зав. лаб. физиологии и биохимии растений, д. с.-х. н.,
В. С. Петров, зав. ФНЦ «Виноградарство и виноделие» д. с.-х. н.,
И. А. Ильина, зам. директора по научной работе, д. т. н.,
Г. К. Киселева, снс лаб. физиологии и биохимии растений, к. б. н.,
М. А. Сундырева, снс лаб. физиологии и биохимии растений, к. б. н.,
В. В. Соколова, снс, к. с.-х. н.
 ФГБНУ «Северо-Кавказский федеральный научный центр садоводства,
 виноградарства, виноделия»,
 350901, Россия, г. Краснодар, ул. 40-летия Победы, 39
 kubansad@kubannet.ru

Физиолого-биохимические механизмы адаптации к низкотемпературным стрессам сортов винограда различного эколого-географического происхождения*

Цель настоящих исследований – выявить физиолого-биохимические закономерности адаптации сортов винограда различного эколого-географического происхождения к низкотемпературному стрессу на основе протеомной, энзимной и метаболомной оценок экспрессии генов. Исследования выполнены на технических сортах винограда Бархатный, Джемете, Достойный, Красностоп АЗОС, Кристалл и Рислинг рейнский в ампелографической коллекции ФГБНУ АЗОСВиВ (г.-к. Анапа), в центре коллективного пользования «Приборно-аналитический», лаборатории физиологии и биохимии растений Северо-Кавказского федерального научного центра садоводства, виноградарства, виноделия. В результате изучения белков холодостресса определена активность фермента пероксидазы и 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. Выявлены физиолого-биохимические закономерности адаптации сортов винограда различного эколого-географического происхождения к абиотическим стрессорам зимнего и летнего периодов на основе протеомной, энзимной и метаболомной оценок экспрессии генов. Выделены специфические белки холодостресса и высокотемпературного стресса с пероксидазной активностью устойчивости сортов винограда различного эколого-географического происхождения к абиотическим стрессорам зимнего и летнего периодов. Определено количество и молекулярная масса белков холодостресса и высокотемпературного стресса, активность и изоферментный состав пероксидазы сортов винограда различного эколого-географического происхождения, устойчивых к комплексу абиотических факторов зимнего и летнего периодов. Установлены физиолого-биохимические закономерности формирования устойчивости сортов винограда различного эколого-географического происхождения к низкотемпературному и высокотемпературному стрессам на основе протеомной, энзимной и метаболомной оценок экспрессии генов.

Ключевые слова: виноград, сорт, эколого-географическое происхождение, физиолого-биохимические особенности, белок.

N. I. Nenko, V. S. Petrov, I. A. Ilyina, G. K. Kiseleva, M. A. Sundyeva, V. V. Sokolova
 FSBSI "North-Caucasian Federal Scientific Center for Horticulture, Viticulture, Winemaking",
 350901, Russia, Krasnodar, 40 let Pobedy str., 39

Physiological and biochemical mechanisms of adaptation to low-temperature stresses of grape varieties of different ecogeographical origin

The purpose of present studies is to reveal the physiological and biochemical patterns of adaptation of grape varieties of different ecological and geographical origin to low-temperature stress on the basis of proteomic, enzymatic and metabolic evaluation of genotype expression. The research was carried out on technical varieties of grapes Barkhatny, Dzhemete, Dostoiny, Krasnostop Azos, Kristall and Riesling of Rhine in the ampelographic collection of

* Поддержано грантом №16-44-230115 Российского фонда фундаментальных исследований и администрации Краснодарского края

the Anapa zonal experimental station of viticulture and winemaking, in the center of collective use of the Instrument and Analytical Laboratory of the Physiology and Biochemistry of Plants of North-Caucasian federal scientific center of horticulture, viticulture, winemaking. As result of studying the proteins of cold stress, the activity of the enzyme peroxidase was determined and it was established that the protein complex with peroxidase activity in the studied grape varieties is represented by proteins with a molecular weight of 250, 240, 150, 140, 100, 90, 75, 70, 50, 40 and 30 kDa. The physiological and biochemical patterns of adaptation of grape varieties of different ecological and geographical origin to the abiotic stressors of the winter and summer periods were determined on the basis of proteomic, enzymatic and metabolic evaluation of genotype expression. Specific proteins of cold and high-temperature stress with peroxidic activity of resistance of grape varieties of different eco-geographical origin to abiotic stressors of winter and summer periods were singled out. The amount and molecular weight of proteins of cold and high-temperature stresses, activity and isoenzyme composition of peroxidase of grape varieties of various ecological and geographical origin, resistant to a complex of abiotic factors of winter and summer periods were determined. Physiological and biochemical regularities in the formation of resistance of grape varieties of different ecological and geographical origin to low-temperature and high-temperature stresses based on proteomic, enzymatic and metabolic evaluation of genotype expression have been established.

Keywords: *grape, variety, eco-geographical origin, physiological and biochemical features, protein.*

Низкотемпературный стресс является одним из основных абиотических факторов, ограничивающих рост и географическое распространение винограда. Под его действием происходит нарушение физиологических процессов, протекающих в растениях, что приводит к повреждению или полной гибели кустов винограда.

Агротехнологические приемы оказывают влияние на биохимические процессы, протекающие в растениях винограда, и, как следствие, на устойчивость к низким температурам. По данным Özkan Kaуа [1], оставление пасынков на виноградной лозе снижает зимостойкость винограда за счет изменений в содержании связанной воды, белков и сахаров.

По нашему мнению, наиболее сильно адаптивный потенциал растений винограда зависит от биологии и эколого-географического происхождения сорта.

Межвидовая селекция позволяет создавать сорта винограда, сочетающие в себе ценные количественно-качественные показатели урожая и устойчивость к стресс-факторам, что весьма актуально в современных нестабильных погодно-климатических условиях.

В процессе эволюции у некоторых видов винограда, произрастающих в эколого-географических зонах со стрессорами зимнего периода, сформировались адаптивные механизмы к воздействию отрицательных температур. Так, например, в настоящее время в селекции на зимостойкость широко используется *Vitis amurënsis*, выдерживающий температуры до $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ [2]. По данным Werong Xu [3], к одному из механизмов устойчивости этого вида винограда к отрицательным температурам относится накопление пролина до определенного уровня и дальнейший синтез орнитина и аргинина.

В современной науке накоплен большой объем знаний по адаптации растений винограда к абиотическим стресс-факторам, но многие вопросы требуют более глубокого изучения.

Целью исследований являлось выявление физиолого-биохимических закономерностей адаптации сортов винограда различного эколого-географического происхождения к низкотемпературному стрессу на

основе протеомной, энзимной и метаболомной оценок экспрессии генотипа.

В задачи исследований входило: выделение специфических белков теплового, холодового и водного стрессов, характеризующих устойчивость сортов винограда различного эколого-географического происхождения к абиотическим стрессорам зимнего периода; определение содержания белков теплового (БТШ), холодового и водного (дегидрины) стрессов, активности и изоферментного состава пероксидазы и амилазы сортов винограда, устойчивых к низкотемпературным стрессам; установление физиолого-биохимических механизмов формирования устойчивости сортов винограда к низким температурам на основе протеомной, энзимной и метаболомной оценок экспрессии генотипа.

Объекты исследования: технические сорта винограда *Бархатный, Джемете, Достойный, Красностоп АЗОС, Кристалл и Рислинг рейнский.*

Место и время проведения исследований: ампелографическая коллекция ФГБНУ АЗОСВиВ, расположенная в пригороде города-курорта Анапа; ЦКП «Приборно-аналитический»; лаборатория физиологии и биохимии растений ФГБНУ СКФНЦСВВ. Исследования проводились в период 2014-2017 гг.

Методики исследований – биометрические показатели роста и развития, элементы первичной продуктивности определяли по общепринятой методике госсортоиспытания [4], в естественных условиях и при моделировании стресса (принудительное обезвоживание; температуры $-25, 55\text{ }^{\circ}\text{C}$). Адаптационную устойчивость растений винограда к температурным и водным стрессам в Черноморской агроэкологической зоне виноградарства изучали по следующим показателям: содержание в растительных тканях (лоза) свободной и связанной форм воды – по М. Д. Кушниренко [5], углеводов (сахароза, глюкоза, фруктоза), органических кислот цикла Кребса (яблочной, лимонной, янтарной) – по методике Н. В. Воробьева [6], белков – спектральным методом (спектрофотометры UNICO 2800, LEKI SS1207), состав и количество органических кислот [7], фенолкарбоновых кислот [8], катионов металлов (K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+}) [9], свободных аминокислот [10]

Анатомо-морфологические исследования почек показали, что они находились в состоянии зимнего покоя. У всех сортов винограда в зимующих почках (глазках) заложены эмбриональные соцветия, обуславливающие урожай следующего года.

Таким образом, в связи с потеплением климата по результатам гистохимических исследований был сделан вывод о том, что сорта винограда *Бархатный*, *Рислинг рейнский* и *Джемте* не вошли в состояние глубокого покоя в зимний период 2016-2017 гг. и не могут отличаться устойчивостью к экстремально низким температурам в этот период (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 °С) в условиях января 2017 г. привело к подмерзанию растений винограда, что сказалось на снижении их продуктивности. Этому также способствовала низкая температура воздуха в первой половине лета. Дефицит тепла сопровождался неполной дифференциацией эмбриональных соцветий, снижением массы грозди. В 2017 г. урожайность сортов Бархатный, Красностоп АЗОС и Кристалл была ниже на 14, 33 и 14 % и составила 6, 4 и 9,5 т/га соответственно.

Урожайность сорта Достойный в 2016 и 2017 гг. была одинаковой – 8 т/га.

Заключение

Выявлены физиолого-биохимические закономерности адаптации сортов винограда различного эколого-географического происхождения к абиотическим стрессорам зимнего и летнего периодов на основе протеомной, энзимной и метаболомной оценки экспрессии генотипа. Выделены специфические белки холодового и высокотемпературного стресса с пероксидазной активностью устойчивости сортов винограда различного эколого-географического происхождения к абиотическим стрессорам зимнего и летнего периодов. Определено количество и молекулярная масса белков холодового и высокотемпературного стрессов, активность и изоферментный состав пероксидазы сортов винограда различного эколого-географического происхождения, устойчивых к комплексу абиотических факторов зимнего и летнего периодов. Установлены физиолого-биохимические закономерности формирования устойчивости сортов винограда различного эколого-географического происхождения к низкотемпературному и высокотемпературному стрессам на основе протеомной, энзимной и метаболомной оценки экспрессии генотипа.

Список использованной литературы

1. **Özkan Kaya, Cafer Köse.** Determination of resistance to low temperatures of winter buds on lateral shoot present in Karaerik (*Vitis vinifera* L.) grape cultivar // *Acta Physiologiae Plantarum*, 2017. – 39:209. – pp. 255-256.
2. **Wan Y, Schwaninger H, Li D., Simon C., Wang Y., He P.** The eco-geographic distribution of wild grape germplasm in China // *VITIS*, 2008. – № 47(2). – pp. 77-79.
3. **Weirong Xu, Ruimin Li, Ningbo Zhang, Fuli Ma, Yuntong Jiao, Zhenping Wang.** Transcriptome profiling of *Vitis amurensis*, an extremely cold-tolerant Chinese wild *Vitis species*, reveals candidate genes and events that potentially connected to cold stress // *Plant Molecular Biology*, 2014. – Volume 86. – pp. 527-541.
4. Методика государственного сортоиспытания сельскохозяйственных культур. – М.: Колос, 1970. – Вып. 5. – 159 с.
5. **Кушнеренко М.Д., Печерская С.Н.** Физиология водообмена и засухоустойчивости растений. – Кишинев: Штиинца, 1991. – 306 с.
6. **Воробьев Н. В.** Определение содержания сахарозы, фруктозы и глюкозы в растительных тканях с помощью антронового реактива // Бюллетень НТИ ВНИИ риса. – Краснодар, 1985. – Вып. 33. – С. 11-13.
7. **Захарова М. В., Ильина И. А., Киселева Г. К., Лифарь Г. В., Якуба Ю. Ф.** Методика определения массовой концентрации винной, яблочной, янтарной, лимонной кислот с применением капиллярного электрофореза // Методическое и аналитическое обеспечение исследований по садоводству: сб. науч. тр. – Краснодар: ГНУ СКЗНИИСиВ, 2010. – С. 283-288.
8. **Якуба Ю. Ф., Ильина И. А., Киселева Г. К., 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 // В кн. «Современные инструментально-аналитические методы исследования плодовых культур и винограда»: учеб.-метод. пособие. – Краснодар: СКЗНИИСиВ, 2015. – С. 68-73.
9. **Якуба Ю. Ф., Ильина И. А., Киселева Г. К., Захарова М. В., Лифарь Г. В.** Методика определения массовой концентрации катионов аммония, калия, натрия, магния, кальция в побегах и листьях плодовых культур и винограда с применением капиллярного электрофореза // В кн. «Современные инструментально-аналитические методы исследования плодовых культур и винограда»: учеб.-метод. пособие. – Краснодар: СКЗНИИСиВ, 2015. – С. 62-67.
10. **Якуба Ю. Ф., Ильина И. А., Киселева Г. К., Захарова М. В., Лифарь Г. В.** Методика определения массовой концентрации свободных аминокислот в побегах и листьях плодовых культур и винограда с применением капиллярного электрофореза // В кн. «Современные инструментально-аналитические методы исследования плодовых культур и винограда»: учеб.-метод. пособие. – Краснодар: СКЗНИИСиВ, 2015. – С. 80-86.
11. Диагностика устойчивости растений к стрессовым воздействиям (методическое руководство) / Под редакцией Удовенко Г. В. – Л.: Всесоюзный НИИ растениеводства, 1988. – С. 164-165.

12. Ненько Н. И., Ильина И. А., Воробьева Т. Н. и др. Современные инструментально-аналитические методы исследования плодовых культур и винограда: учеб.-метод. пособие / под общ. ред. Н. И. Ненько. Краснодар: СКЗНИИСиВ, 2015. – С. 16-18.

13. Доспехов Б. А. Методика полевого опыта. – М.: Колос, 1979. – 415 с.

References

1. **Özkan Kaya, Cafer Köse.** Determination of resistance to low temperatures of winter buds on lateral shoot present in Karaerik (*Vitis vinifera* L.) grape cultivar, *Acta Physiologiae Plantarum*, 2017, 39:209, pp. 255-256

2. **Wan Y., Schwaninger H., Li D., Simon C., Wang Y., He P.** The eco-geographic distribution of wild grape germplasm in China, *VITIS*, 2008, No. 47(2), pp. 77-79

3. **Weirong Xu, Ruimin Li, Ningbo Zhang, Fuli Ma, Yuntong Jiao, Zhenping Wang.** Transcriptome profiling of *Vitis amurensis*, an extremely cold-tolerant Chinese wild *Vitis* species, reveals candidate genes and events that potentially connected to cold stress, *Plant Molecular Biology*, 2014, Vol. 86, pp. 527-541.

4. Методика государственного сортоиспытания сельскохозяйственных культур [Methodology of state variety testing of agricultural crops], Moscow: Kolos, 1970, Issue 5, 159 p. (in Russian)

5. **Kushnerenko M. D., Pecherskaya S. N.** Физиология водообмена и засухоустойчивости растений [Physiology of water exchange and drought tolerance of plants]. – Kishinev: Stiinitca, 1991, 306 p. (in Russian)

6. **Vorob'yev N. V.** Опредeление содержания сахарозы, фруктозы и глюкозы в растительных тканях с помощью антрагонического реактива [Determination of the content of sucrose, fructose and glucose in plant tissues with the help of an antronic reagent], *Byulleten' NTI VNII risa*, Krasnodar, 1985, Issue 33, pp. 11-13. (in Russian)

7. **Zakharova M. V., Il'ina I. A., Kiseleva G. K., Lifar' G. V., Yakuba Yu. F.** Методика определения массовой концентрации винной, яблочной, янтарной, лимонной кислот с применением капиллярного электрофореза [Methodology for determination of mass concentration of tartaric, malic, succinic, citric acids with the use of capillary electrophoresis], *Metodicheskoye i analiticheskoye obespecheniye issledovaniy po sadovodstvu: sb. nauch. tr.*, Krasnodar: GNU SKZNIISiV, 2010, pp. 283-288. (in Russian)

8. **Yakuba Yu. F., Il'ina I. A., Kiseleva G. K., Zakharova M. V., Lifar' G. V.** Методика определения массовой концентрации аскорбиновой, хлорогеновой и кофейной кислот в побегах и листьях плодовых культур и винограда с применением капиллярного электрофореза [Methodology for determination of mass concentration of ascorbic, chlorogenic and coffee acids in shoots and leaves of fruit crops and grapes using capillary electrophoresis], In book «Sovremennyye instrumental'no-analiticheskiye metody issledovaniya plodovykh kul'tur i vinograda». Uchebno-metodicheskoye posobiye, Krasnodar: SKZNIISiV, 2015, pp. 68-73. (in Russian)

9. **Yakuba Yu. F., Il'ina I. A., Kiseleva G. K., Zakharova M. V., Lifar' G. V.** Методика определения массовой концентрации катионов аммония, калия, натрия, магния, кальция в побегах и листьях плодовых культур и винограда с применением капиллярного электрофореза [Methodology for determining the mass concentration of cations of ammonium, potassium, sodium, magnesium, calcium in shoots and leaves of fruit crops and grapes using capillary electrophoresis], In book «Sovremennyye instrumental'no-analiticheskiye metody issledovaniya plodovykh kul'tur i vinograda». Uchebno-metodicheskoye posobiye, Krasnodar: SKZNIISiV, 2015, pp. 62-67. (in Russian)

10. **Yakuba Yu. F., Il'ina I. A., Kiseleva G. K., Zakharova M. V., Lifar' G. V.** Методика определения массовой концентрации свободных аминокислот в побегах и листьях плодовых культур и винограда с применением капиллярного электрофореза [Methodology for determining the mass concentration of free amino acid in shoots and leaves of fruit crops and grapes using capillary electrophoresis], In book «Sovremennyye instrumental'no-analiticheskiye metody issledovaniya plodovykh kul'tur i vinograda». Uchebno-metodicheskoye posobiye, Krasnodar: SKZNIISiV, 2015, pp. 80-86. (in Russian)

11. Диагностика устойчивости растений к стрессовым воздействиям (методическое руководство) [Diagnostics of plant resistance to stresses (methodical guidance)], Ed. Udovenko G. V., Leningrad: Vsesoyuznyy NII rasteniyevodstva, 1988, pp. 164-165. (in Russian)

12. **Nen'ko N. I., Il'ina I. A., Vorob'yeva T. N. et al.** *Sovremennyye instrumental'no-analiticheskiye metody issledovaniya plodovykh kul'tur i vinograda* [Modern instrumental-analytical methods of research of fruit crops and grapes. Teaching-methodical manual.], Ed. Nen'ko N.I., Krasnodar: SKZNIISiV, 2015, pp. 16-18. (in Russian)

13. **Dospikhov B. A.** Методика полевого опыта [Methodology of field experience], Moscow: Kolos, 1979, 415 p. (in Russian)

Материал поступил в редакцию 17.10.2017 г.

