

УДК 581 : 576.5 : 634.224

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ МЕХАНИЗМОВ АДАПТАЦИИ ЯБЛОНИ К УСЛОВИЯМ ЗИМНЕГО ПЕРИОДА

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

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

Реферат. Физиолого-биохимическими методами установлено, что адаптация сортов яблони к зимним стрессам происходит за счет активации синтеза пролина, сахарозы, фенолкарбоновых, абсцизовой кислот и пероксидазы. Выявленные адаптационные особенности доказывают необходимость использования потенциальных возможностей отечественных сортов яблони в селекционном процессе как источника признаков зимостойкости.

Ключевые слова: яблоня, сорта, зимостойкость, оводненность, биохимические показатели

Summary. It is established using physiological and biochemical methods that the adaptation of apple varieties to winter stresses occurs by activation of synthesis of proline, sucrose, phenolcarbonic, and abscisic acids and peroxidase. The revealed adaptive features prove the necessity of using the potential capabilities of domestic apple varieties in the breeding as the sources of winter hardiness signs.

Key words: apple, varieties, winter hardiness, water content, biochemical indicators

Введение. Вопросы адаптации культуры яблони к условиям Северо-Кавказского региона России вызывают повышенный интерес, поскольку получение стабильных высоких урожаев плодов яблони ограничивается воздействием неблагоприятных погодных факторов зимнего периода, приносящие садоводству значительные экономические убытки [1-3].

Воздействие природных стрессоров зимнего периода (низкие критические температуры и длительные морозы в течение всей зимы, морозы после оттепелей и солнечного нагрева с зимним иссушением тканей, заморозки ранней весной) приводит к резкому снижению продуктивности и качества плодов яблони [4].

В условиях Северного Кавказа характерной особенностью зимнего периода являются резкие смены температур, во время которых оттепели сменяются похолоданиями. Это часто вызывает сильное, а иногда полное подмерзание плодовых почек яблони. Особенно опасны возвратные морозы после оттепели в конце зимы, когда деревья яблони выходят из состояния покоя, и теряя закалку, вступают в процесс вегетации [5]. В связи с этим изучение физиолого-биохимических процессов растений яблони, выявление механизмов и поиск диагностических показателей адаптивности к стресс-факторам зимнего периода приобретают особую актуальность.

Цель настоящей работы – на основе физиолого-биохимических методов выявить механизмы адаптации сортов яблони различного эколого-географического происхождения к стресс-факторам зимнего периода в Северо-Кавказском регионе России.

Объекты и методы исследований. Исследования проводили в 2013-2016 гг. на базе ЗАО ОПХ «Центральное» СКФНЦСВВ, в ЦКП «Приборно-аналитический» и лаборатории физиологии и биохимии растений СКФНЦСВВ.

Объектами исследований служили сорта яблони различного эколого-географического происхождения: Айдаред (США), Лигол (Польша), Прикубанское (Россия, СКФНЦСВВ) 2010 г. 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, СКФНЦСВВ) 2000 г. посадки на подвое М 9 при схеме посадки 2х5; сорта Эрли Мак (2п=2х) (США), Дейтон (2п=2х) (США) 1998 г. посадки на подвое М 9 при схеме посадки 2х5.

Использованы современные физиолого-биохимические методы исследования водного обмена, определения содержания пролина, сахарозы, фенолкарбоновых, абсцизовой, кислот, суммы катионов, антоцианов, халконов, активности пероксидазы с применением высокоэффективного аналитического оборудования [6-8]. Микрообъекты изучали и фотографировали с помощью микроскопа «Olympus» ВХ 41 [9, 10].

Полученные экспериментальные данные обрабатывали с помощью общепринятых методов вариационной статистики [11].

Обсуждение результатов. Снижение оводненности тканей при переходе растений из вегетирующего состояния в состояние покоя принято считать одним из показателей повышения их устойчивости к неблагоприятным факторам среды, и этот показатель можно рассматривать как индикатор дифференциации сортов по устойчивости к отрицательным температурам как в период органического, так и вынужденного покоя [11-13].

Снижение оводненности побегов сортов яблони Айдаред, Лигол, Прикубанское в декабре 2015 г. на 34,25-70,9 % по сравнению с 2014 г. позволяет предположить более раннее вхождение деревьев в зимний покой и может быть связано с уменьшением количества выпавших осадков на 12 мм, а снижение содержания свободной воды на 52,41-81,45 % свидетельствует о меньшей интенсивности обменных процессов (рис. 1).

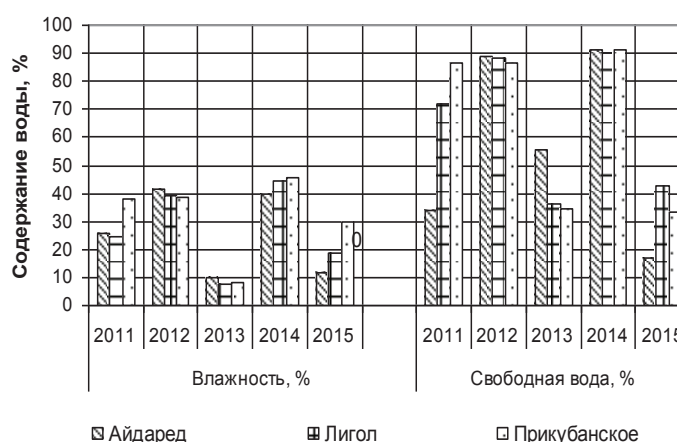


Рис. 1. Водный режим побегов яблони, декабрь 2011-2015 гг.

Общая оводненность тканей не может полностью характеризовать состояние водного режима и устойчивость сорта, поэтому определяется количество свободной и связанной воды. По мнению ряда авторов, именно повышение количества связанной формы воды является показателем устойчивости растения [14, 15].

Содержание связанной формы воды в побегах растений яблони в декабре 2015 г., в сравнении с декабрем 2014 г., увеличивается на 82,15-89,52 %. Отмеченные нами изменения, возможно, связаны с процессами адаптации изучаемых сортов к меняющимся климатическим условиям.

Определение влияния гидротермических условий на оводненность побегов яблони показало, что у сорта Айдаред этот показатель в большей мере зависит от максимальной температуры воздуха (Ккоррел.= 0,83), у сорта Прикубанское – от количества выпавших

осадков ($K_{\text{коррел.}} = 0,89$), у сорта Лигол определяется средней температурой воздуха ($K_{\text{коррел.}} = 0,71-0,73$) (рис. 2).

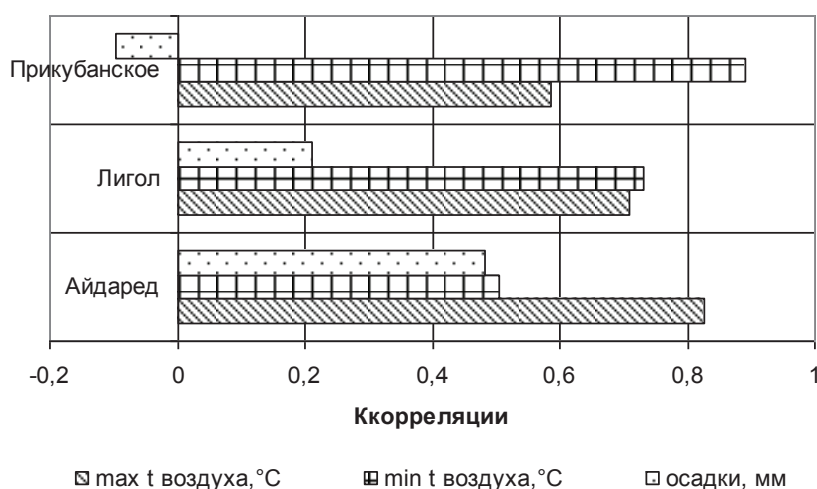


Рис. 2. Зависимость содержания общей воды в побегах яблони от гидротермических условий, декабрь 2012-2015 гг.

Динамика содержания крахмала в побегах яблони свидетельствует о негативном влиянии летней жары и засухи 2015 года на его накопление: количество крахмала в декабре 2015 г. (в сравнении с 2014 г.) снизилось у изучаемых сортов – в 4,1-16,9 раза (рис. 3).

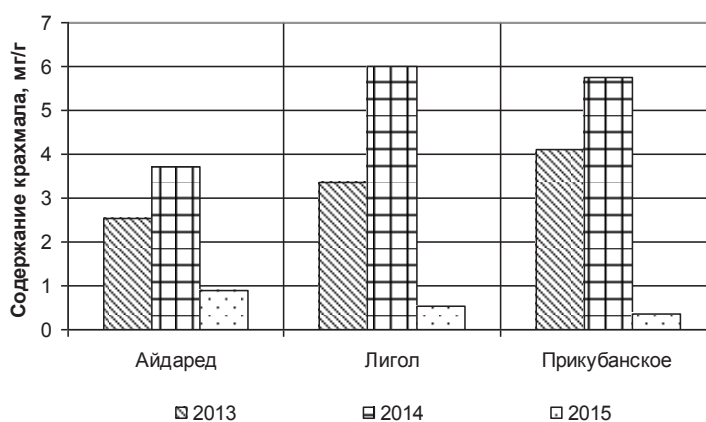


Рис. 3. Динамика содержания крахмала в побегах яблони, декабрь 2013-2015 гг.

Накопление пролина как осмотически активного органического вещества при воздействии стрессовых факторов среды способствует удержанию воды в клетке [16]. Динамика изменения содержания связанной формы воды и таких стресс-протекторов, как пролин и сахароза, в декабре 2012-2015 гг. показало, что в большей мере устойчивость растений яблони сорта Айдаред определяется количеством сахарозы ($K_{\text{коррел.}} = 0,89$), а сорта Прикубанское - пролина ($K_{\text{коррел.}} = 1,0$). У сорта Лигол в поддержании водного баланса принимают участие как пролин, так и сахароза, однако связь между содержанием связанной воды и этими осмопротекторами невысока ($K_{\text{коррел.}} = 0,55$ и $0,61$) (рис. 4, 5).

При низкотемпературном стрессе в клетках растений происходят структурные нарушения, обусловленные распадом белка и накоплением аминокислот [17]. Меньшее содержание свободной формы воды в побегах изучаемых сортов яблони в декабре 2015 г. (в сравнении с 2014 г.) согласуется с уменьшением количества белка, что характеризует низкую активность обменных процессов.

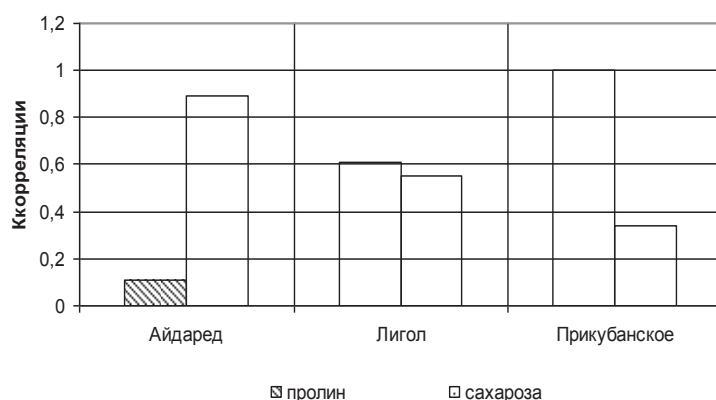


Рис. 4. Влияние стресспротекторов на содержание связанной формы воды в побегах яблони, декабрь 2014-2015 гг.

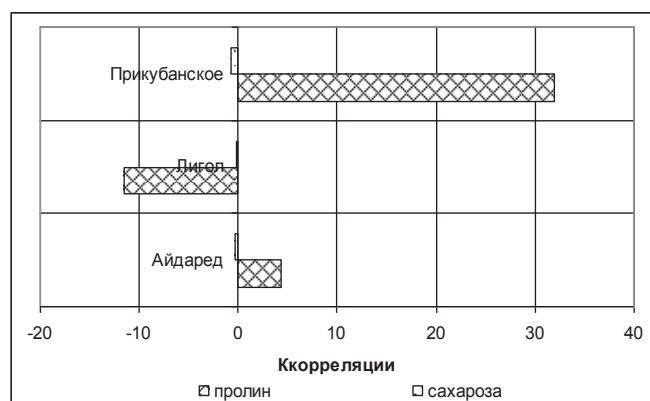


Рис. 5. Влияние осмопротекторов на содержание свободной формы воды в побегах яблони, декабрь 2012-2015 гг.

Искусственное промораживание побегов яблони в декабре 2015 года при температуре минус 25 °С показало, что оводненность побегов уменьшается у сорта Айдаред на 87,5 %, у сорта Лигол – на 66,7 % и у сорта Прикубанское – на 9,5 % (рис. 6).

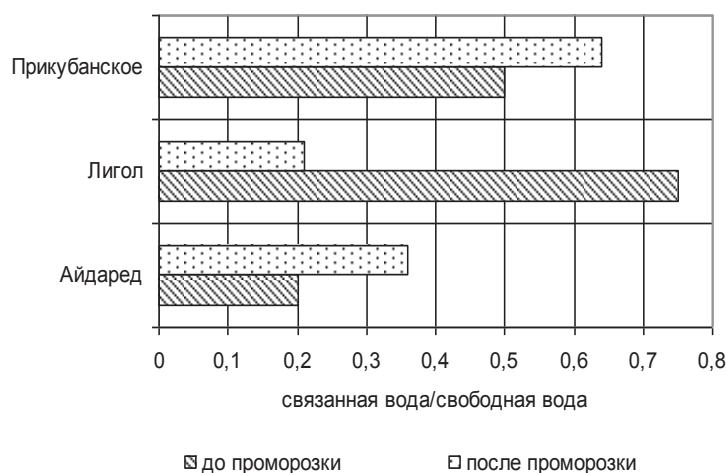


Рис. 6. Изменение отношения содержания связанной формы воды к свободной при промораживании побегов яблони, декабрь 2015 г.

Полученные данные согласуются с оводненностью побегов, так как сорт Прикубанское имел самую низкую оводненность в сравнении с сортами Айдаред и Лигол. При промораживании у сортов Айдаред и Прикубанское увеличивается отношение содержания связанной воды к свободной, у сорта Лигол уменьшается. При этом у сортов Айдаред и Прикубанское повышается содержание пролина в 1,7 и 1,2 раза, соответственно, а у сорта Лигол изменяется незначительно. У сортов Айдаред и Лигол содержание сахарозы снижается в 1,9 и 2,2 раза, соответственно, у сорта Прикубанское – на 63 %.

Установлена обратная корреляционная зависимость между содержанием связанной формы воды в побегах яблони после промораживания в камере и содержанием в них сахарозы ($K_{\text{коррел}} = -1$) и пролина ($K_{\text{коррел}} = -0,85$) до промораживания, что свидетельствует об образовании осмопротекторных белков.

Изучение зависимости между изменением содержания связанной формы воды, сахарозы, пролина, фенолкарбоновых кислот, суммы катионов, в декабре 2012-2015 гг. при промораживании 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 свободнорадикальных процессов при окислительном стрессе, и катионов ($K_{\text{коррел}} = -1,0$), связанное с изменением проницаемости клеточных мембран. Полученные данные при промораживании побегов свидетельствуют о большей устойчивости сорта Прикубанское к низкотемпературному стрессу.

В феврале 2016 года по сравнению с декабрем 2015 г. у сортов Айдаред, Лигол и Прикубанское оводненность побегов изменилась незначительно, у остальных изучаемых сортов она повысилась на 53,7 – 169,4 %, при этом содержание свободной формы воды у сорта Айдаред снизилось на 17,7 %, у всех остальных изучаемых сортов повысилось на 13,9-60,3 %, что свидетельствует об активации обменных процессов (рис. 7).

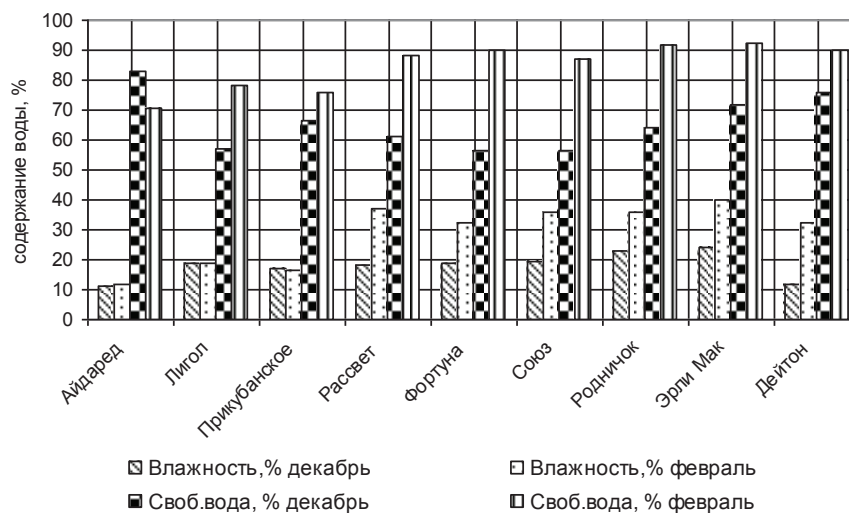


Рис. 7. Водный режим побегов яблони, декабрь 2015-февраль 2016 гг.

Содержание белка в побегах разных сортов яблони в феврале 2016 года в сравнении с декабрем 2015 г. изменялось неоднозначно (рис. 8).

У сортов Прикубанское, Рассвет, Родничок, Эрли Мак количество белка уменьшалось вследствие активации его гидролиза, о чем свидетельствует увеличение значений отношения содержания свободных аминокислот к содержанию белка, у сортов Айдаред и Фортуна эти значения практически не изменяются, у остальных сортов несколько возрастают (рис. 9).

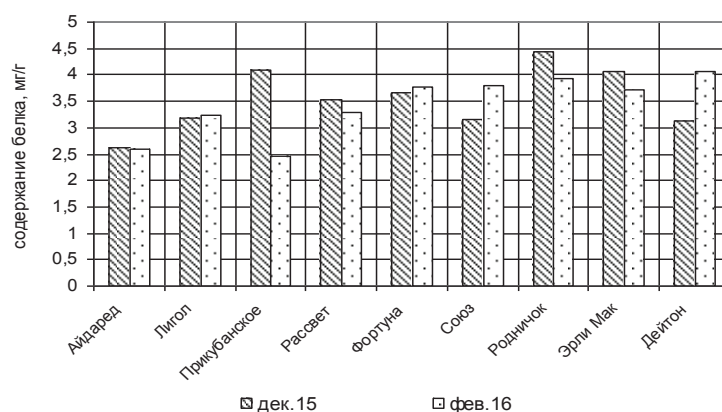


Рис. 8. Содержание белка в побегах яблони, декабрь 2015-февраль 2016 гг.

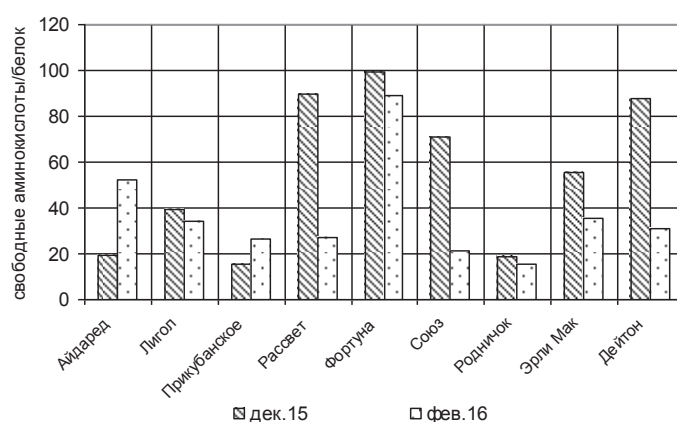


Рис. 9. Отношение содержания свободных аминокислот к содержанию белка в побегах яблони, декабрь 2015-февраль 2016 гг.

У всех изучаемых сортов яблони в феврале 2016 г. увеличивается содержание суммы фенолкарбоновых кислот, выполняющих стресспротекторную функцию, а также повышается активность пероксидазы, разрушающей перекисные соединения, и уменьшается содержание ингибитора роста АБК в сравнении с декабрем 2015 г. (рис. 10-12).

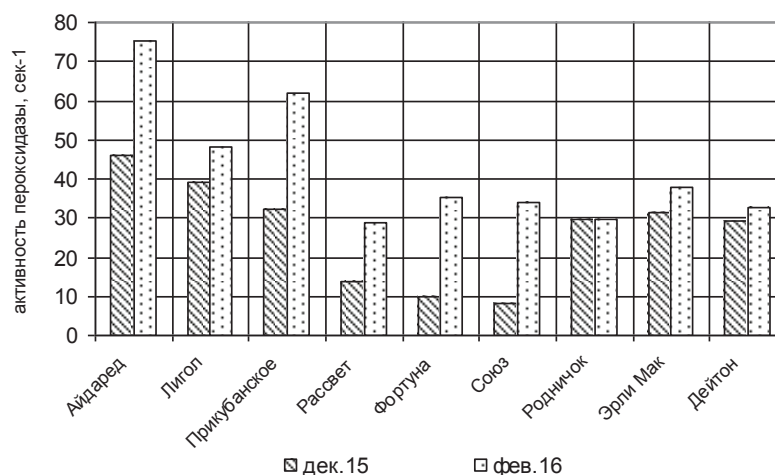


Рис. 10. Активность пероксидазы в побегах яблони, декабрь 2015-февраль 2016 гг.

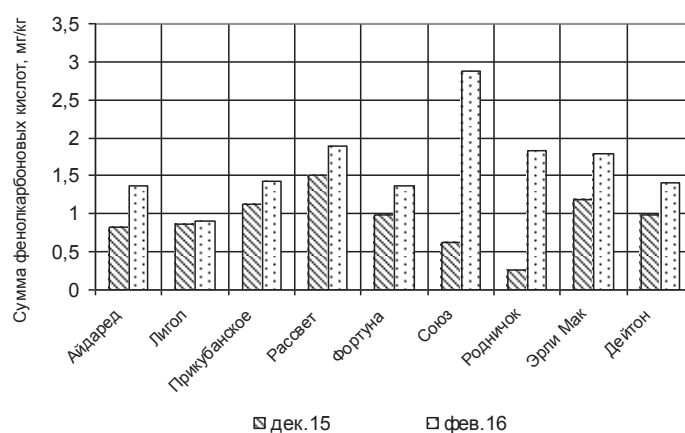


Рис. 11. Содержание суммы фенолкарбоновых кислот в побегах яблони, декабрь 2015-февраль 2016 гг.

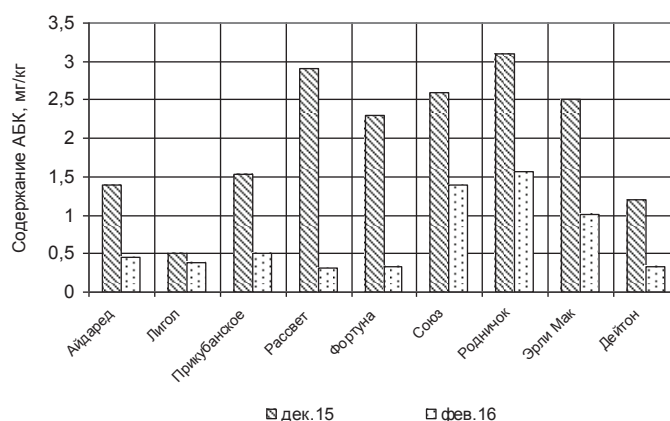


Рис. 12. Содержание абсцизовой кислоты в побегах яблони, декабрь 2015-февраль 2016 гг.

Гистохимические и анатомо-морфологические исследования однолетних побегов изучаемых сортов яблони показали, что в декабре 2015 года они находятся в состоянии вынужденного покоя, что подтверждается методом проращивания срезанных веток (во всех вариантах опыта все почки тронулись в рост). Анатомо-морфологические исследования плодовых почек на годичном приросте показали, что они находятся в состоянии вынужденного зимнего покоя на Vг этапе органогенеза – образование археспориальной ткани в пыльниках. Повышение средней температуры воздуха в декабре 2015 г. по сравнению со среднегодовыми значениями явилось причиной сокращения глубины и продолжительности глубокого покоя, потери адаптации растений яблони к повреждающим факторам зимнего периода. Сорта Айдаред и Прикубанское отличались большим накоплением крахмала в зоне мелкоклеточной сердцевинки побега в зимний период, и характеризовались большей зимостойкостью. Прижизненные анатомические исследования тканей однолетних побегов и почек изучаемых сортов яблони показали, что в феврале 2016 г. они находятся в состоянии вынужденного покоя. На поперечных срезах побега в зоне сердцевинки видны многочисленные плазмодесмы (межклеточные цитоплазматические тяжи между клетками), доказывающие активность обменных процессов в клетках растения (рис.13).

Известно, что для морозостойких сортов плодовых характерен быстрый гидролиз крахмала уже с начала зимы. У недостаточно морозостойких сортов гидролиз крахмала задерживается. Установлено, что в феврале 2016 г., по сравнению с декабрем 2015 года, содержание крахмала снизилось вследствие его гидролиза: у сорта Айдаред с 4,9 до 4,8 балла; у сорта Лигол с 4,5 до 4,3 балла; – у сорта Прикубанское с 5,0 до 4,8 балла.

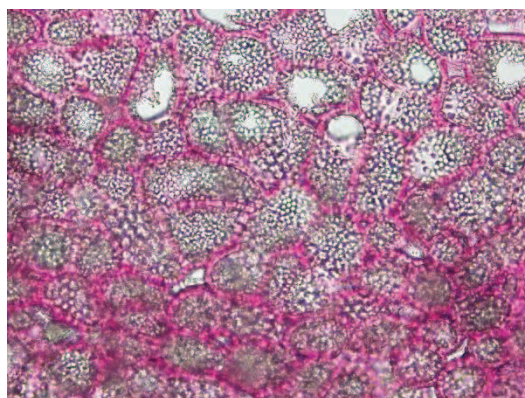


Рис. 13. Микрофото поперечного среза побега яблони сорта Айдаред, увеличение 10х40 (в зоне мелкоклеточной сердцевины, видны крахмальные зерна и плазмодесмы), февраль 2016 г.

Таким образом, сорта яблони Айдаред и Прикубанское отличаются меньшим накоплением крахмала в зоне мелкоклеточной сердцевины побега в зимний период вследствие его гидролиза и являются высокозимостойкими. Сорт Лигол по темпу расходования крахмала проявил себя как зимостойкий.

У триплоидных сортов Союз и Родничок содержание крахмала в зоне мелкоклеточной сердцевины побега существенно снизилось вследствие его гидролиза и составляло 4,4 и 4,3 балла соответственно. Отмечено, что у диплоидных сортов 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 сердцевины 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, а также сорта Айдаред и Прикубанское в условиях зимнего периода 2015-2016 гг. по гистохимическим данным проявили себя как высокозимостойкие.

Выводы. Выявлены адаптационные механизмы устойчивости сортов яблони различного эколого-географического происхождения к стрессорам зимнего периода Северо-Кавказского региона. Выделены наиболее значимые физиолого-биохимические и анатомо-морфологические показатели, характеризующие адаптационную устойчивость сортов яблони к зимним стрессам (связанная форма воды, пролин, сахароза) и механизмы её формирования.

Исследования, проведенные в экологических условиях 2013-2016 гг. показали, что триплоидные сорта Союз и Родничок отечественной селекции, а также диплоидные сорта Айдаред (США) и Прикубанское (отечественной селекции) в зимний период по физиолого-биохимическим параметрам проявили себя высокозимостойкими в сравнении с другими изучаемыми сортами.

Физиолого-биохимическими методами доказано, что адаптация сортов яблони к зимним стрессам достигается за счет повышенного синтеза осмопротекторов (сахарозы, пролина), антоцианов, халконов, фенолкарбоновых, абсцизовой кислот, суммы катионов и увеличения активности пероксидазы.

Выявленные адаптационные особенности показывают необходимость использования потенциальных возможностей отечественных сортов яблони в селекционном процессе как источников признаков зимостойкости. Данные, полученные в специфических климатических условиях Северо-Кавказского региона России, дополняют фундаментальные исследования физиологических основ адаптации растений яблони к стрессовым условиям.

Литература

1. Ненько, Н.И. Сравнительная физиолого-биохимическая характеристика устойчивости сортов яблони различного эколого-географического происхождения к абиотическим стрессам / Н.И. Ненько, Г.К. Киселева, Е.В. Ульяновская // Садоводство и виноградарство. – 2016. – № 1. – С. 29-33.
2. Ненько, Н.И. Адаптационные механизмы устойчивости яблони к стресс-факторам зимнего периода / Н.И. Ненько, Г.К. Киселева, Е.В. Ульяновская, А.В. Караваева // Международный научно-исследовательский журнал. – 2016. – № 5 (47). – С.87-89.
3. Ненько, Н.И. Физиолого-биохимическая оценка устойчивости растений яблони к стрессорам зимнего и летнего периодов / Н.И. Ненько, Г.К. Киселева, А.В. Караваева, Е.В. Ульяновская // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. – 2016. – № 3. – Т. 6. – С. 65-71.
4. Henfrey, J. Physiological stress responses in apple under replant conditions / Joana Lua Henfrey, Gerhard Baab, Michaela Schmitz // Scientia Horticulturae. – 2015. – V. 194. – P. 111-117.
5. Артюх, С.Н. Динамика белков и пролина в побегах сортов яблони по разным компонентам зимостойкости [Электронный ресурс] / С.Н. Артюх, Н.И. Ненько, Н.Г. Красова // Плодоводство и виноградарство юга России [Электронный ресурс]. – Краснодар: СКЗНИИСиВ, 2014. – № 25(1). – С. 42-50. Режим доступа: <http://journalkubansad.ru/pdf/14/01/05.pdf>
6. Ненько, Н.И. Физиологические методы в адаптивной селекции плодовых культур / Н.И. Ненько, Т.Н. Дорошенко, Т.А. Гасанова // Современные методологические аспекты организации селекционного процесса в садоводстве и виноградарстве. – Краснодар: СКЗНИИСиВ, 2012. – С. 189-198.
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. Якуба, Ю.Ф. Методика определения массовой концентрации катионов аммония, калия, натрия, магния, кальция в побегах и листьях плодовых культур и винограда с применением капиллярного электрофореза / Ю.Ф. Якуба, И.А. Киселева, М.В. Захарова, Г.В. Лифарь // Современные инструментально-аналитические методы исследования плодовых культур и винограда; под общ. ред. Н.И. Ненько. – Краснодар: СКЗНИИСиВ, 2015. – С. 62-67.
9. Киселева, Г.К. Оценка морозостойкости плодовых культур и винограда по степени накопления крахмала в зоне мелкоклеточной сердцевины побега / Г.К. Киселева, Н.И. Ненько // Современные инструментально-аналитические методы исследования плодовых культур и винограда; под общ. ред. Н.И. Ненько. – Краснодар: СКЗНИИСиВ, 2015. – С. 34-36.
10. Ненько, Н.И. Оценка зимостойкости плодовых культур и винограда микроскопическими методами / Н.И. Ненько, Г.К. Киселева // Методическое и аналитическое обеспечение исследований по садоводству. – Краснодар: ГНУ СКЗНИИСиВ, 2010. – С.157-161.
11. Hamlyn, G. Thermal infrared imaging of crop canopies for the remote diagnosis and quantification of plant responses to water stress in the field / G. Hamlyn, G. Jones, B. Serraj, Brian R., C. Loveys, Lizhong Xiong, Ashley E. Wheaton, H. Adam // Functional Plant Biology. – № 36. – P. 978–989.
12. Жолкевич, В.Н. Водный обмен растений / В. Н. Жолкевич, Н. А. Гусев, В.А. Капля и [др.]. – М.: Наука, 1989. – 114 с.
13. Гончарова, Э. А. Водный статус культурных растений и его диагностика: монография / Э.А. Гончарова. – СПб: ГНЦ РФ ВИР, 2005. – 125 с.
14. Кошкин, Е.И. Физиология устойчивости сельскохозяйственных культур / Е.И.Кошкин. – М.: Дрофа, 2010. – 638 с.
15. Skriver, K. Gene expression in response to abscisic acid and osmotic stress / Skriver K, Mundy J. // Plant Cell.- 1990. - № 2.- P. 503–512.
16. Hossain, M. Proline protects plants against abiotic oxidative stress: biochemical and molecular mechanisms / Mohammad Anwar Hossain, Md. Anamul Hoque, David J. Burritt, Masayuki Fujita // Oxidative Damage to Plants. – 2014. – № 5. – P. 477-522.
17. Khan, P.S. Abiotic stress tolerance in plants: insights from proteomics / P.S. Sha Valli Khan, G.V. Nagamallaiyah, M. Dhanunjay Rao, K. Sergeant, J.F. Hausman // Emerging Technologies and Management of Crop Stress Tolerance. – 2014. – V. 2. – P. 23-68.