

## ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ЗИМОСТОЙКОСТИ СОРТОВ *PRUNUS DOMESTICA L.*

П.С. Прудников , к.с.-х.н.

З.Е. Ожерельева, к.с.-х.н.

Д.А. Кривушина, аспирант

А.А. Гуляева, к.с.-х.н.

---

*ФГБНУ ВНИИ селекции плодовых культур, 302530, Россия, Орловская область, Орловский район, д. Жилина, ВНИИСПК, prudnicov@inbox.ru*

### Аннотация

В результате изменения климата отмечается не только увеличение частоты и напряженности абиотических стрессоров, но и связанное с этим изменение оптимального ритма роста и развития растений. Растения в адаптационном отношении не успевают приспособляться к постоянно и контрастно изменяющимся условиям окружающей среды. В связи с этим возникает задача в поиске доноров и создании на их основе сортов, сочетающих комплекс хозяйственно ценных признаков с высоким адаптационным потенциалом. Перспективным направлением для этого является выявление физиолого-биохимических показателей плодовых культур, определяющих наличие сортовой устойчивости, при ответе на искусственно моделированное стрессовое воздействие. В связи с этим цель исследований состояла в проведении физиолого-биохимической оценки зимостойкости генотипов сливы на основе активности антиоксидантной системы защиты и интенсивности процессов ПОЛ. В результате проведенного мониторинга активности пероксидазы, содержания пролина и уровня конечного продукта ПОЛ – малонового диальдегида, показано, что физиолого-биохимическими признаками устойчивости к условиям I и II компонента зимостойкости обладает сорт Красивая веча. Слабой степенью устойчивости характеризуются сорта Аленушка и Орловская мечта. Полученные выводы о наличии признаков физиолого-биохимической устойчивости подтверждаются результатами визуальной оценки повреждений основных тканей однолетних побегов исследуемых сортов сливы.

**Ключевые слова:** слива, зимостойкость, пероксидаза, пролин, перекисное окисление липидов

## PHYSIOLOGICAL-BIOCHEMICAL ASSESSMENT GRAVITY OF *PRUNUS DOMESTICA L.*

P.S. Prudnikov , cand. agr. sci.

Z.E. Ozherelieva, cand. agr. sci.

D.A., Krivushina, postgraduate student

A.A. Gulyaeva, cand. agr. sci.

---

*Russian Research Institute of Fruit Crop Breeding, 302530, Russia, Orel region, Orel district, Zhilina, VNIISPK, prudnicov@inbox.ru*

### **Abstract**

As a result of climate change, not only the increase in the frequency and intensity of abiotic stressors is noted, but also the related change in the optimal rhythm of plant growth and development. Plants adapt adaptively do not have time to adapt to constantly and contrastively changing environmental conditions. In this connection, a task arises in the search for donors and the creation of their basis varieties combining a complex of economically valuable traits with a high adaptive potential. A promising direction for this is the identification of physiological and biochemical indicators of fruit crops that determine the presence of varietal stability, in response to an artificially modeled stress effect. In this connection, the aim of the research was to conduct a physiological and biochemical evaluation of the winter hardiness of plum genotypes based on the activity of the antioxidant defense system and the intensity of LPO processes. As a result of the monitoring of peroxidase activity, proline content and the level of the final product of LPO-malonic dialdehyde, it was shown that the beautiful Veche variety possesses physiological and biochemical characteristics of resistance to conditions I and II of winter hardiness. A weak degree of stability characterized varieties Alenushka and Orel dream. The obtained conclusions on the presence of signs of physiological and biochemical stability are confirmed by the results of a visual evaluation of the damage to the main tissues of annual shoots of the investigated plum varieties.

**Key words:** plum, winter hardiness, peroxidase, proline, lipid peroxidation

### **Введение**

В результате изменения климата отмечается не только увеличение частоты и напряженности абиотических стрессоров, но и связанное с этим изменение оптимального ритма роста и развития растений, которые не успевают приспосабливаться к постоянно и контрастно изменяющимся условиям окружающей среды. Многие сорта, полученные ранее, в годы относительной стабильности климата, реагируют на новые по срокам наступления и интенсивности абиотические стрессы резким снижением биологической продуктивности [1]. В связи с этим, перед селекцией стоит задача в поиске доноров и создании на их основе сортов, сочетающих комплекс хозяйственно ценных признаков с высоким адаптационным потенциалом. Для осуществления такого селекционного процесса необходимо иметь возможность раннего выявления стресс резистентных форм, путем использования признаков устойчивости по генетическим, физиолого-биохимическим, морфологическим и др. показателям, определяющим адаптационный потенциал. Это особенно актуально для плодовых культур, имеющих многолетний жизненный цикл. Перспективным направлением для этого является выявление физиолого-биохимических показателей плодовых культур, определяющих наличие сортовой устойчивости, при ответе на искусственно моделированное стрессовое воздействие [2]. К одной из таких реакций, следует отнести изменение свойств мембран, что связано с перестройками в их структуре и развитием на клеточном уровне окислительного стресса. При этом наблюдаются сдвиги в соотношении различных групп жирных кислот, изменяется степень их ненасыщенности, возрастает уровень перекисного окисления липидов (ПОЛ) [3, 4], что приводит к увеличению проницаемости мембран, изменению взаимодействия между липидами, комплементарными цепями нуклеиновых кислот, белками, гормонами и рецепторами [5].

Об интенсивности перекисного окисления липидов мембран можно судить по ряду образующихся при этом веществ: гидроперекиси, малоновый диальдегид, диеновые конъюгаты и др. [6, 7].

Вместе с тем под воздействием стресса индуцируются и защитные адаптивные механизмы, которые связаны с синтезом белков теплового шока, накоплением стрессовых гормонов, антиоксидантов, осмолитов и других защитных соединений. Ограничение процессов окисления и поддержания структурно-функционального состояния мембранных липидов в основном осуществляется за счет работы антиоксидантной системы защиты, состоящей из низко- и высокомолекулярных соединений [8]. Так низкомолекулярный антиоксидант пролин при стрессах защищает ферменты от инактивации, обеспечивает целостность структурных белков, сохраняет функциональную активность клеточных мембран [9]. Высокомолекулярный фермент пероксидаза способствует утилизации активных форм кислорода, в частности – перекиси водорода [10]. Как правило, устойчивости к экологическим стрессам часто коррелирует с эффективностью работы антиоксидантной системы и напряженностью перекисного окисления мембранных липидов.

В связи с этим при моделировании факторов стресса для выявления степени устойчивости сортов плодовых растений можно вести мониторинг уровня активности некоторых компонентов антиоксидантной системы – пероксидазы, содержание пролина, а также количества продуктов перекисного окисления липидов – малонового диальдегида.

Цель работы состояла в проведении физиолого-биохимической оценки зимостойкости генотипов сливы на основе активности антиоксидантной системы защиты и интенсивности процессов ПОЛ.

#### **Материалы и методика исследований**

Исследования проводили на базе лаборатории физиологии устойчивости плодовых растений ФГБНУ ВНИИСПК.

Объектами исследований служили однолетние побеги растений сливы: Аленушка, Скороплодная, Неженка, Краса Орловщины, Красивая веча, Орловская мечта.

В наших исследованиях побеги растений подвергались условиям I и II компонента зимостойкости в климатической камере «Espres» PSL-2KPH по методике М.М. Тюриной и Г.А. Гоголевой [11]. Каждому компоненту предшествовала закалка при  $t = -5^{\circ}\text{C}$  в течение 5 дней с дальнейшим понижением температуры до  $-10^{\circ}\text{C}$ , в течение последующих 5 дней. Для I компонента зимостойкости использовали температуру  $-25^{\circ}\text{C}$ , для II компонента  $-30^{\circ}\text{C}$ . Оценку интенсивности перекисного окисления липидов проводили на основе определения содержания конечного продукта ПОЛ – малонового диальдегида [12]. Активность пероксидазы – фермента антиоксидантной системы – методом Бояркина [13] с использованием субстрата для окисления – бензидина. Для определения содержания низкомолекулярного антиоксиданта и совместимого осмолита аминокислоты пролина применяли качественную реакцию с нингидриновым реактивом [14]. Оценку видимых повреждений проводили по методике М.М. Тюриной и Г.А. Гоголевой [11]. Достоверность результатов оценивали в программе MS Excel по Доспехову [15].

#### **Результаты и их обсуждение**

Проведенные исследования показали, что под воздействием условий I компонента зимостойкости наибольшие повреждения мембран получили сорта Аленушка, Неженка, Орловская мечта. Уровень накопления малонового диальдегида в данных генотипах возрос в 1,52...2,12 раз по сравнению с закалкой. Наряду с этим у сорта Красивая веча уровень липопероксидации увеличился в 1,30 раза, (рисунок 1 а).

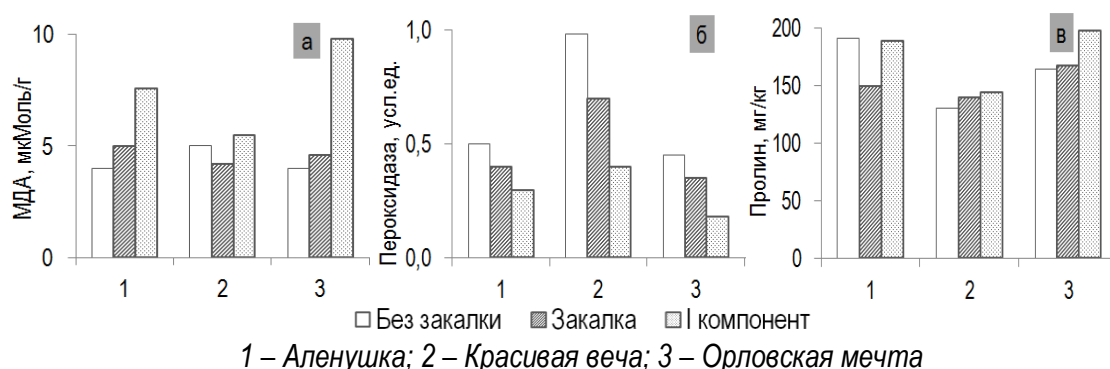


Рисунок 1 – Анализ содержания МДА (а), пероксидазы (б), пролина (в) в коре однолетних побегов сливы до закалки, после закалки и в условиях действия I компонента зимостойкости

Интересно отметить, что у Красивой веча имеющей наименьшее повреждение мембранных липидов после воздействия условий I компонента зимостойкости, уровень активности пероксидазы снизился в 1,75 раза, тогда как у Аленушки и Орловской мечте в 1,33...1,94 раза по сравнению с закалкой (рисунок 1 б). Снижение активности пероксидазы связано с периодом покоя, т.к. после закалки активность фермента у всех сортов снижалась. Определение свободного пролина показало, что значительное его накопление наблюдалось в сортах, получивших большее повреждение мембранных липидов: Орловская мечта и Аленушка на 17,8...26,0%, тогда как у Красивой веча на 3,6 % по сравнению с закалкой (рисунок 1 в). Большее накопление пролина свидетельствует о более сильном окислительном стрессе, вызванном компонентом зимостойкости.

Под воздействием условий II компонента зимостойкости показано наличие повреждений мембранных липидов у генотипа Аленушка и Орловская мечта. После действия II компонента Содержание МДА в данных сортах увеличилось на 28,0 и 32,0% по сравнению с вариантом закалка (рисунок 2 а).

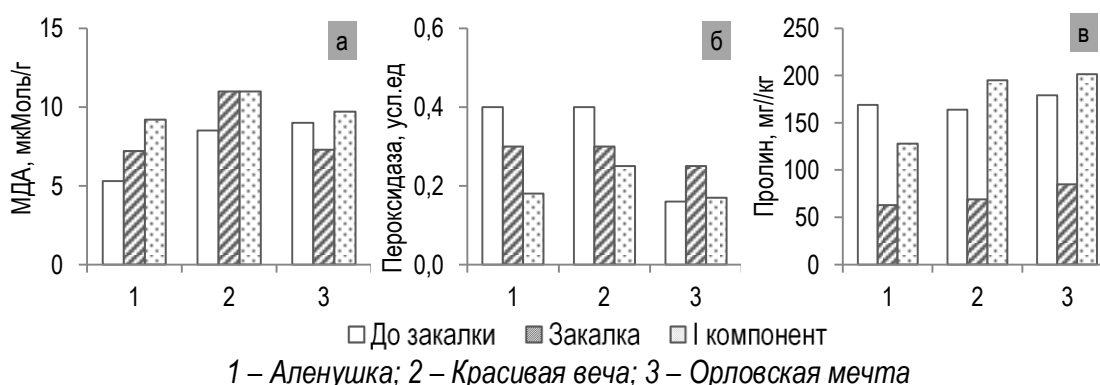


Рисунок 2 – Анализ содержания МДА (а), пролина (в) и активности пероксидазы (б) в коре однолетних побегов сливы до закалки, после закалки и в условиях действия II компонента зимостойкости

У сорта Красивая веча величина липопероксидации была на уровне закалки. Вместе с тем после действия II компонента больший пик накопления пролина, в 2,8 раза по сравнению с закалкой, отмечался у Красивой веча, тогда как у Аленушки и Орловской мечте количество аминокислоты увеличилось в 2 и 2,4 раза (рисунок 2 в). Отсутствие увеличения содержания малонового диальдегида у Красивой веча могло произойти как за счет нейтрализации АФК пролином, так и более интенсивной работой пероксидазы. Активность данного фермента у Красивой веча после действия условий II компонента зимостойкости составляла 0,25 усл. ед., тогда как у Аленушки – 0,18 и Орловской мечте – 0,17 (рисунок 2 б). Высокая активность фермента после II компонента у Красивой веча по сравнению с другими сортами, по-видимому связано, с меньшей ее деактивацией. Так после действия II компонента активность фермента у Красивой веча снизилась на 20%, а у Аленушки и Орловской мечте – на 67,0 и 47,0% по сравнению с закалкой.

На фоне разной степени устойчивости физиолого-биохимических процессов, при оценке видимых повреждений, вызванных условиями II компонента зимостойкости, показано, что сорта Аленушка и Орловская мечта по сравнению с Красивой веча имели большие повреждения, как коры, так и древесины (таблица 1).

Таблица 1 – Результаты искусственного промораживания однолетних побегов сливы (II компонент зимостойкости)

Сорт	Средний балл повреждения	
	кора	древесина
Аленушка	0,8	0,9
Красивая веча	0,2	0,6
Орловская мечта	1,3	1,6
НСР <sub>05</sub>	0,5	0,8

### Выводы

В ходе проведенного мониторинга активности пероксидазы, содержания пролина и уровня конечного продукта ПОЛ – малонового диальдегида, показано, что физиолого-биохимическими признаками устойчивости к условиям I и II компонента зимостойкости обладает сорт Красивая веча. Слабой степенью устойчивости характеризовались сорта Аленушка и Орловская мечта.

### Литература

1. Прудников П.С., Кривушина Д.А., Ожерельева З.Е., Гуляева А.А. Действие отрицательной температуры на активность компонентов антиоксидантной системы и интенсивность ПОЛ *Prunus avium* L. // Научно-методический электронный журнал «Концепт». 2017. Т. 31. С. 1256–1260. URL: <http://e-koncept.ru/2017/970266.htm>.
2. Прудников П.С., Кривушина Д.А., Гуляева А.А. Реакция антиоксидантной системы и интенсивность перекисного окисления липидов *Prunus cerasus* L. в ответ на действие гипертермии // Вестник аграрной науки. 2018. № 1 (70). С. 30–35. doi: 10.15217/48484
3. Барабой В.А., Брехман И.И., Голотин В.Г., Кудряшов Ю.Б. Перекисное окисление и стресс // СПб.: Наука. 1992. 148 с.
4. Прудников П.С., Гуляева А.А. Влияние гипертермии на гормональную систему и антиоксидантный статус *Prunus cerasus* L. // Современное садоводство – Contemporary horticulture. 2015. № 3 (15). С. 37–44. URL: <http://journal.vniispk.ru/pdf/2015/3/46.pdf>

5. Мерзляк М.Н. Активированный кислород и окислительные процессы в мембранах растительной клетки // Итоги науки и техники. Сер. Физиология растений. М.: ВИНТИ. 1989. Т. 6. 168 с.
6. Холявка М.Г., Карпова С.С., Калаев В.Н., Лепешкина Л.А., Агапов Б.Л., Артюхов В.Г. Оценка оксидативного статуса растений, произрастающих в различных условиях // Фундаментальные исследования. 2014. № 8-4. С. 891–897. URL: <http://www.fundamental-research.ru/ru/article/view?id=34690>.
7. Прудников П.С., Седов Е.Н. Оценка устойчивости яблони к гипертермии на основе перекисного окисления липидов и антиоксидантной системы защиты // Вестник Орловского государственного аграрного университета. 2015. № 6. С. 79–83. doi: 10.15217/issn1990-3618.2015.6.79.
8. Верхотуров В.В. Взаимное влияние пероксидазы и низкомолекулярных антиоксидантов при прорастании семян пшеницы: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Иркутск.: СИФИБР СО РАН. 1999. 20 с.
9. Колупаев Ю.Е., Вайнер А.А., Ястреб Т.О. Проллин: физиологические функции и регуляция содержания в растениях в стрессовых условиях // Вісник Харківського національного аграрного університету. Серія біологія. 2014. Вып.2. С. 6–22.
10. Андреева В.А. Фермент пероксидаза Участие в защитном механизме растений. М.: Наука, 1988. 128 с.
11. Тюрина М.М., Гоголева Г.А. Ускоренная оценка зимостойкости плодовых и ягодных культур. М.: НИИС. 1978. 48 с.
12. Стальная И.Д., Гаришвили Т.Г. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты // Современные методы в биохимии / Под ред. В.Н. Ореховича. М.: Медицина. 1977. С. 66–68.
13. Ермаков А.И., Арасимович В.В., Ярош Н.П., Перуанский Ю.В., Луковникова М.И., Иконникова М.И. Методы биохимического исследования растений. Л.: Агропромиздат, 1987. 430 с.
14. Bates L.S., Waldren R.P., Teare I.D. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil*. 1973. Vol. 39. 205–207. DOI: 10.1007/BF00018060
15. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов исследований). М.: Агропромиздат, 1985. 351 с.

## References

1. Prudnikov, P.S., Krivushina, D.A., Ozherelyeva, Z.E., & Gulyaeva, A.A. (2017). The effect of negative temperature on the activity of the components of the antioxidant system and the intensity of the *Prunus Avium* L. *Periodic scientific and methodological e-journal "Koncept"*, 31, 1256–1260. Retrieved from <http://e-koncept.ru/2017/970266.htm>. (In Russian, English abstract).
2. Prudnikov, P.S., Krivushina, D.A., & Gulyaeva, A.A. (2018) Reaction of antioxidant system and intensity of oversour lipids oxidation of *Prunus Cerasus* L. in response to the hyperthermia effect. *Bulletin of Agrarian Science*, 1, 30–35. <http://dx.doi.org/10.15217/48484> (In Russian, English abstract).
3. Baraboy, V.A., Brekhman, I.I., Golotin, V.G., & Kudryashov, Yu.B. (1992). *Lipid peroxidation and stress*. Saint Petersburg: Nauka. (In Russian).
4. Prudnikov, P.S., & Gulyaeva, A.A. (2015). Features of hyperthermia effect on hormonal system and antioxidant status of *Prunus Cerasus* L. *Sovremennoe sadovodstvo – Contemporary horticulture*, 3, 37-44. Retrieved from <http://journal.vniispk.ru/pdf/2015/3/46.pdf>. (In Russian, English abstract).



5. Merzlyak, M.N. (1989). Activated oxygen and oxidative processes in plant cell membranes. *Account of Science and Technology, ser. Plant Physiology* (vol. 6). Moscow: VINITI (IN Russian).
6. Holyavka, M.G., Karpova, S.S., Kalaev, V.N., Lepeshkina, L.A., Agapov, B.L., & Artyukhov, V.G. (2014). Assessment of the oxidative status of the plants growing in various conditions. *Fundamental Research*, 8(4), 891–897. Retrieved from <http://www.fundamental-research.ru/pdf/2014/8-4/34690.pdf>. (In Russian, English abstract).
7. Prudnikov, P.S., & Sedov, E.N. (2015). Evaluation of apple resistance to hyperthermia based on lipid peroxidation and antioxidant defense system. *Bulletin of Orel State Agrarian University*, 6, 79–83. <http://dx.doi.org/10.15217/issn1990-3618.2015.6.79>. (In Russian, English abstract).
8. Verkhoturov, V.V. (1999). *Mutual influence of peroxidase and low-molecular antioxidants during the germination of wheat seeds (Biol. sci. cand. thesis)*. Siberian Institute of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Irkutsk, Russia. (In Russian).
9. Kolupaev, Yu.E., Weiner, A.A., & Yastreb, T.O. (2014). Proline: physiological functions and regulation of its content in plants under stress conditions. *The bulletin of Kharkiv National Agrarian University. Series biology*, 2, 6–22. (In Russian, English abstract).
10. Andreeva, V.A. (1988). *Peroxidase enzyme. Participation in the plant protective mechanism*. Moscow: Nauka.
11. Tyurina, M. M., & Gogoleva, G. A. (1978). *Accelerated assessment of frost resistance of fruit and berry plants. Methodological recommendations*. Moscow: Zonal Research Institute of Horticulture of Non-chernozem zone. (In Russian).
12. Stalnaya, I.D., & Garishvili, T.G. (1977). A Method of Malonodialdehyde Determining with the Help of Thiobarbituric Acid. In V.I. Orekhovich (ed.) *Contemporary methods in biochemistry* (pp 66-67). Moscow: Medizina (In Russian).
13. Ermakov, A.I., Arasimovich, V.V., Yarosh, N.P., Peruanskiy, Yu.V., Lukovnikova, G.A. & Ikonnikova, M.I. (1987). *Methods of biochemical research of plants*. A.I. Ermakov (Ed.). Leningrad: Agropromizdat. (In Russian).
14. Bates, L.S., Waldren, R.P., & Teare, I.D. (1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil*, 39, 205–207. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00018060>
15. Dosphehov, B.A. (1985). *Field experiment method (with statistic processing of investigation results)*. Moscow: Agropromizdat. (In Russian).