

**ЗАКОНОМЕРНОСТИ ИЗМЕНЕНИЯ ФОСФОЛИПИДОВ В
СВЯЗИ С МОРОЗОУСТОЙЧИВОСТЬЮ ВИНОГРАДА**

Морозоустойчивость виноградного растения является важным производственно-биологическим свойством, определяющим ареал его распространения, агротехнику возделывания (укрывная или открыто зимующая культура) и получения систематически устойчивых и высококачественных урожаев.

Виноградное растение по типу обмена хотя и относится к сахаронакапливающим культурам (вынос сахара с урожаем составляет в среднем 15-25% сырого и 70-80% сухого веса), но в семенах накапливает большое количество высококачественного масла. Такой параллелизм возможен при тонком координировании действия ферментов углеводного и липидного обмена.

По мере изучения метаболизма виноградного растения в годичном цикле его развития все больше подтверждается физиолого-биохимическая природа его морозоустойчивости и, в частности, вырисовывается ведущая роль биополимеров, ответственных за структурную организацию и функционирование живой клетки в неблагоприятных условиях среды.

Расшифровка путей биосинтеза и распада различных компонентов в живой клетке выяснила, что фосфолипиды, главным образом, сосредотачиваясь в ядре, митохондриальных и микросомных мембранах, помимо выполнения скелетной функции участвуют в процессе переноса электронов. Они регулируют проницаемость мембран и поддерживают окислительное фосфорилирование. Последнее весьма важно для зимующих растений, так как энергетические возможности растений сильно ограничены в осенне-зимний период, а от проницаемости мембран и водоудерживающих сил зависит жизнь и гибель клетки при воздействии критических отрицательных температур.

В этом аспекте за последние годы в мировой литературе заслуженно возрос интерес исследователей к фосфолипидам в связи с изучением вопросов устойчивости растений.

Следует отметить, что в литературе имеются немногочисленные исследования в основном по однолетним культурам в связи с их мо-

розо- и зимостойкостью. У древесных растений, и в частности винограда, исследования по фосфолипидам единичны.

В наших исследованиях особое внимание уделялось следующим вопросам: динамика общего и макроэргического фосфора в побегах в период осенне-зимнего покоя; динамика количественных изменений свободных и связанных фосфолипидов в процессе закаливания и зимовки растений; качественные различия фосфолипидов в зависимости от степени морозо-устойчивости растений; активность липазы в различных органах виноградного куста; изменение относительного уровня фосфолипидов в жировом комплексе с развитием морозоустойчивости растений; характерные черты взаимосвязи фосфолипидов и АТФ с процессом биосинтеза белков в условиях низких температур.

В качестве объекта исследования служили побеги в осенне-зимний период у сортов и гибридов винограда различной морозоустойчивости, выращенных на экспериментальном участке Мерцванской базы Арм.НИИ ВВиП в условиях орошаемой, полупустынной, укрывной зоны Араратской котловины.

В процессе исследования апробированы разные способы первичной консервации растительного материала. Проведена серия исследований с разными режимами экстракции, гидролиза. Испытаны различные смеси неполярных органических растворителей. Освоены методы препаративной техники и тонкослойной хроматографии. Разработана методика определения липазы в вегетативных органах растений (листья, побеги, корни).

Как показали исследования, содержания общего фосфора в побегах винограда за осенне-зимний период проявляют резкие скачки и ярко выраженную сортовую специфичность. У морозоустойчивых растений количество фосфора в начале осени резко снижается. Это оценивается нами, как косвенный факт, свидетельствующий о миграции фосфора в почки при первом же снижении температуры с порога биологического нуля ($+10^{\circ}$) до действительного нуля (0°). В дальнейшем количество фосфора в побегах этих растений вновь восполняется за счет поступления из других частей куста, достигающего максимума в наиболее холодный период.

У неморозоустойчивых сортов воздействие температуры -10° вызывает совершенно обратный эффект. Такая диаметрально противоположность приводит к тому, что морозоустойчивые сорта в наибольшую

лее морозный период зимовки по содержанию фосфора превосходят неустойчивые, что положительно отражается на состоянии растений.

Привлекает внимание сравнительно низкая оводненность почек морозоустойчивых сортов и соответственно высокой уровень сухих веществ. Последнее достигается благодаря более высокому содержанию сахаров, крахмала, нуклеиновых кислот, белков.

Полученные данные подтверждают гипотезу Курсанова (1973) о том, что фосфор является переносчиком сахаров. Действительно, при оптимальном физиологическом состоянии растений у морозоустойчивых сортов ритм миграции фосфора из побегов в почки наступает заблаговременно, тем самым способствуя биосинтезу ряда высокополимерных соединений.

Обнаруженный нами факт меньшей оводненности и большого содержания сухих веществ в почках морозоустойчивых сортов согласуется с тем положением, что сухие почки винограда выдерживают более низкие температуры, чем влажные.

Согласно исследованиям Чебана (1968) в почках зимующих глазков винограда, с августа по декабрь, абсолютное количество нуклеиновых кислот и белка при пересчете на один глазок удваивается.

Кириллов и Левит (1971) приводят сведения относительно увеличения кислоторастворимых фосфорорганических соединений и нуклеопротеидов в побегах винограда во время второй фазы закаливания.

Полученные нами данные экспериментально подтверждают правоту высказываний Макаревной (1966) и Кондо (1970) относительно синтетического направления процессов в фазу глубокого покоя почек у винограда.

В настоящее время развивается представление о том, что под влиянием неблагоприятных условий среды в том числе и воздействия низких температур, прежде всего нарушается сопряженность процессов окисления и фосфорилирования, что ведет к прекращению энергообеспечения клетки (Сергеева, 1971; Сычева, Василькова, 1972 и др.).

Предполагается (Проценко, Коваль, 1968), что в северные широты продвигаются те древесные породы, которые наряду с другими показателями характеризуются накоплением веществ, содержащих макроэргический фосфор — АТФ и АДФ.

Результаты наших исследований по динамике АТФ в побегах винограда за осенне-зимний период отражают основные закономерности,

выявленные на других культурах, что видимо, объясняется четкой физиологической функцией АТФ.

Максимум в образовании АТФ в побегах винограда приходится на осень, когда температурные условия благоприятствуют накоплению пластических и макроэргических соединений. За время закалывания (до конца декабря) происходит использование АТФ, и сорта по потенции и образованию АТФ почти выравниваются.

У неморозоустойчивых сортов разобщения дыхания с окислительным фосфорилированием видимо наступает уже при температуре -10° , тогда как у морозоустойчивых сортов в этих условиях отмечается как использование, так и неоднократное образование АТФ в период осенне-зимнего покоя на фоне высокого уровня содержания нуклеотидов - АТФ, АДФ, АМФ (табл. I).

Таблица I

Содержание макроэргического фосфора в побегах винограда при воздействии температуры минус 18°C
(мкг/г, на сухой вес)

Сорта	АТФ	АДФ	АМФ	Сумма
Морозо- устойчивые	7,60 $\pm$ 0,42	4,03 $\pm$ 0,19	1,80 $\pm$ 0,07	13,43 $\pm$ 0,61
	7,41 $\pm$ 0,38	3,96 $\pm$ 0,15	1,87 $\pm$ 0,06	13,24 $\pm$ 0,75
Неморозо- устойчивые	5,16 $\pm$ 0,23	3,22 $\pm$ 0,14	1,40 $\pm$ 0,04	9,78 $\pm$ 0,44
	5,10 $\pm$ 0,19	3,56 $\pm$ 0,10	1,50 $\pm$ 0,08	10,16 $\pm$ 0,51

Морозоустойчивые сорта проявляют по сравнению с неморозоустойчивыми большую способность к аккумуляции химической энергии путем образования АТФ при низких температурах. В суровые зимы в поврежденных морозом тканях неустойчивых растений нарушение энергетического баланса сопровождается отсутствием весеннего биосинтеза белков.

Нуклеотиды образуют реакционно способный комплекс с ионами двухвалентных металлов - магнием и кальцием. Эти элементы нужны как кофакторы. С этих позиций интересно сопоставить по динамике указанных элементов сорта с разной морозоустойчивостью.

Исследования показали, что у морозоустойчивых сортов в процессе осенней закалки происходит явное снижение в содержании этих элементов в побегах, с последующим восстановлением их количества.

Несмотря на это величина отношения между кальцием и магнием изменяется не так сильно, что на наш взгляд имеет важное значение для регуляции и поддержания уровня ферментативных реакций и водоудерживающих сил клетки при воздействии экстремальных температур.

У неморозоустойчивых сортов динамика этих элементов в процессе закалывания иная и не столь закономерна. Например: основной отток магния из побегов в почки начинается только после воздействия температуры минус 10°C , как это наблюдается и с фосфором. Видимо, у морозоустойчивых сортов (в отличие от неморозоустойчивых) происходит заблаговременная миграция этих элементов из побегов в почки.

Имеется основание полагать, что качественные и количественные изменения фосфора в первую очередь связаны с АТФ и фосфолипидами, как одной из внутренних регулирующих систем, причастных к повышенной морозоустойчивости растений.

Нами исследовались количественные изменения свободных и связанных фракций фосфолипидов в побегах винограда в период осенне-зимнего покоя в связи с температурными режимами и природы морозоустойчивости сорта. При этом изучался также качественный состав фосфолипидов и изменчивость компонентов методом тонкослойной хроматографии на кремневой кислоте.

Данные таб.2 показывают явное количественное преобладание связанных фосфолипидов над свободной фракцией. Поэтому характер количественных изменений общего количества фосфолипидов в основном воспроизводит характер связанной фракции. К тому же отмечаются ритмические изменения обеих фракций в зависимости от этапов температурного режима. При резком снижении температуры от 0° до минус 10° общее количество фосфолипидов сильно уменьшается. Длительное и более сильное воздействие отрицательных температур сопровождается возрастанием количества фосфолипидов. Интересно, что характер изменчивости свободной фракции у разных сортов однотипен, тогда как в поведении связанной фракции проявляется сортовая специфичность.

Таблица 2

Пределы колебания в содержании фосфолипидов за осенне-зимний период в побегах винограда у сортов с разным уровнем морозостойкости (мг/%, на сухой вес)

С о р т а	Общее количество		Связанные		Свободные		Число компонентов на хроматограммах			
							Связанные		Свободные	
	от	до	от	до	от	до	от	до	от	до
Морозо-устойчивые	127	309	100	240	27	69	9	12	8	14
Неморозо-устойчивые	125	304	102	229	23	75	7	10	8	10

Так, при воздействии нулевых температур, способствующих закаливанию растений, количество связанных фосфолипидов у морозостойких сортов снижается. Вероятно, это уменьшение во фракции связанных фосфолипидов происходит за счет их активного метаболического использования в закалочных процессах. У неморозостойких сортов в период длительного нулевого температурного воздействия количество фосфолипидов вовсе не изменяется. Резкое снижение температуры от 0° до -10° вызывает значительное падение количества связанных фосфолипидов, возможно за счет усиления процесса распада липопротеидов, составной частью которых являются фосфолипиды. У морозостойких сортов такое падение температуры не вызывает столь сильной реакции.

В дальнейшем, при более длительном и сильном воздействии отрицательных температур (но не ниже порога выносливости) растения пытаются восстановить первоначальный уровень связанных фосфолипидов, количество которых весьма быстро возрастает. Характерное отличие морозостойких сортов от неморозостойких проявляется к концу зимы, когда накопленные фосфолипиды именно связанной фракции у морозостойких сортов вновь включаются в активный метаболизм и используются растениями (как это отмечается в начале покоя при закалочных режимах 0°).

Повышенная морозостойкость побегов винограда хотя и сопровождается использованием фосфолипидов в процессе закалывания, однако уровень их относительного содержания в липидном комплексе возрастает.

В таблице 3 представлены результаты тонкослойной хроматографии фосфолипидов на кремневой кислоте в побегах (в конце вегетации, после закалывания и при воздействии -18°C).

Исследования показали, что в побегах винограда фосфолипиды представлены весьма широким спектром. В состав фосфолипидов входят: фосфатидилинозит, фосфатидилсерин, фосфатидилглицерин, фосфатидилэтаноламин, диглицерофосфат, моноглицертофосфат, кардиолипин. У морозостойких сортов и гибридов присутствуют еще два дополнительных неидентифицированных компонента (X_1 и X_2). Наличие фосфатидилхолина, фосфатидилсерина и фосфатидилэтанолamina само по себе весьма важный факт, так как показывает, что в побегах винограда при отрицательных температурах на фоне усиления процессов распада постоянно происходит синтез сложных липидов. Этот факт интересен также тем, что по современным представлениям основной путь биосинтеза фосфатидилхолина, одного из наиболее богатых макроэнергией компонентов фосфолипидов, следует через фосфатидилинозит и фосфатидилсерин.

Сравнение качественного состава и количества компонентов фосфолипидов в побегах исследуемых растений показывает, что в зависимости от сорта, превосходство при всех температурных режимах отмечается у наиболее морозоустойчивых сортов.

Наблюдаемые изменения в содержании свободных и связанных фосфолипидов, а также их качественного состава целиком можем отнести за счет влияния температурного фактора и степени морозоустойчивости винограда.

Известно, что фосфолипиды, принципиально отличаясь от нейтральных липидов своей полярной группой, способны образовать структурную сеть.

Известно (Грин, Флейшер, 1964; Кейтс, 1975) также, что мицеллы, образованные смесью различных фосфолипидов, сильно отличаются по свойствам от мицелл, образованных каким-либо одним фосфолипидом. Совершенно нерастворимые в воде вещества с помощью фосфолипидных мицелл могут легко переходить в водную фазу.

Таблица 3

Качественная характеристика фосфолипидов в побегах винограда и их изменения в процессе закаливания растений у сортов и гибридов различной морозостойчивости

Сорта и гибриды	Ф о с ф о л и п и д ы х)						
	Физиологическое состояние растений	X _I	X ₂	Фосфатидилэрин	Фосфатидилмицерин	Фосфатидилэтиламин	Диглицерофосфат
Русский Конкорд	1	0	0	+	+	+	+
	2	+	+	+	сл.	+	+
	3	+	+	сл.	0	+	+
Гибрид-С-1224	1	0	0	+	+	+	+
	2	+	+	+	сл.	+	+
	3	+	+	сл.	0	+	+
Гибрид-1507/15	1	0	0	+	+	+	+
	2	+	+	+	сл.	+	+
	3	+	+	сл.	0	+	+
Гибрид-842/9	1	0	0	+	+	+	+
	2	+	+	+	сл.	+	+
	3	+	+	сл.	0	+	+
Лернату	1	0	0	сл.	+	+	+
	2	+	+	+	+	+	+
	3	+	+	0	+	+	+
Воскрат	1	0	0	сл.	+	+	+
	2	0	0	0	+	+	+
	3	0	0	0	+	+	сл.
Спитак Араксани	1	0	0	сл.	+	+	+
	2	0	0	0	+	+	+
	3	0	0	0	+	+	сл.

Условные обозначения:

- 1- в конце вегетации
2- после закаливания
3- при воздействии температуры минус 18°С

- +- наличие
0 - отсутствие
сл. - следы

х) Фосфатидилинозит, фосфатидилхолин, моноглицерофосфат, кардиолипин обнаружены во всех сроках исследований.

Принимая во внимание эти замечательные качества молекул фосфолипидов, вряд ли можно отнести за счет случайного эволюционного развития то обстоятельство, что основную массу липидов митохондрий составляют фосфолипиды (около 90%) и что остатки жирных кислот этих фосфолипидов характеризуются высокой степенью ненасыщенности. Фактически на все структурообразовательные свойства фосфолипидов сильное влияние оказывает степень ненасыщенности жирных кислот.

Как показали исследования (табл. 4) в побегах винограда с августа по сентябрь сильно возрастает йодное число, особенно в связанной фракции липидов. Так, например, в свободной фракции липидов оно изменяется в среднем от 23 до 35 единиц, а в связанной фракции — от 30 до 110 единиц. В октябре величина йодного числа в связанной фракции несколько снижается. Там не менее в зимний период степень ненасыщенности жирных кислот вдвое больше по сравнению с их августовским уровнем.

Что же касается ферментов, то нами преследовалась цель с помощью модифицированного метода вскрыть основные закономерности действия ферментов липазного комплекса в листьях, побегах и корнях винограда с точки зрения их участия в мобилизации липидов на уровне целого растения. С этой целью проведена лиофилизация изучаемого материала по мере роста и развития растений. В качестве ферментного препарата использован обработанный ацетоном тонко измельченный материал. Инкубация ферментов с субстратом (эмульсия подсолнечного масла) проводилась в течение 20 часов в сконструированной специально для этой цели термокамере, помещенной на встряхивателе.

Исследование активности липазы в вегетативных органах винограда проводится впервые. Результаты определения показали, что в различных частях куста оптимальные условия для деятельности липаз различны. В корнях и побегах липазы с одинаковым успехом действуют как в кислой, так и в слабо щелочной среде, т.е. диапазон их действия весьма широк. А в листьях действие липаз четко лимитируется величиной активной кислотности среды. Как правило, в среде, близкой к нейтральной реакции, липаза не проявляет активности.

Таблица 4

Динамика фосфолипидов и Лодного числа в побегах винограда

Месяц	Фосфолипиды, мг/%			Лодное число	
	Свободные	Связанные	Сумма	в свободной фракции	в связанной фракции
Август	42	102	144	23,6	30,5
Сентябрь	65	231	296	35,5	111,8
Октябрь	75	202	277	44,7	96,6
Ноябрь	63	206	269	57,2	61,3
Декабрь	23	131	154	46,9	77,6
Январь	55	214	269	28,3	76,7
Февраль	42	226	268	35,9	75,2
Март	47	215	262	27,0	80,4

Рассматривая активность липазы в зависимости от фаз вегетации и анализируемых органов куста, следует отметить, что в листьях она подвержена более сильной изменчивости, чем в побегах и корнях. К концу вегетации активность липазы у последних — относительно низкая, что косвенным образом способствует откладыванию зимних запасов липидов.

Таким образом, замеченные изменения в содержании общих фосфолипидов и их основных компонентов могут быть отнесены за счет внутренних регулирующих систем, причастных к повышению морозостойчивости винограда. При этом проявляется биологическая особенность сорта и физиологическое состояние растений.

Наличие широкого набора фосфолипидов в побегах винограда в зимний период сопряжено с использованием непредельных жирных кислот, что указывает на высокие метаболические возможности растения в условиях закаливания и воздействия отрицательных температур.

В виду того, что фосфолипиды в основном входят в состав мембран, небезинтересно в дальнейшем продолжить исследования фосфолипидов на мембранном уровне с использованием методов газо-жидкостной хроматографии и инфракрасной спектрофотометрии.

Выводы

1) У виноградного растения изучены и охарактеризованы компоненты свободных и связанных фосфолипидов. Впервые изучаются также нуклеотиды и липазы виноградной лозы.

2) В побегах винограда фосфолипиды представлены широким спектром. Обнаружены фосфатидилинозит, фосфатидилсерин, фосфатидилглицерин, фосфатидилэтаноламин, диглицерофосфат, фосфатидилхолин, моноглицерофосфат, кардиолипин. У морозоустойчивых сортов присутствует еще два дополнительных неидентифицированных компонента. Наличие фосфатидилхолина, фосфатидилсерина, фосфатидилэтаноламина само по себе весьма важный факт, так как полностью показывает, что в побегах винограда при отрицательных температурах на фоне усиления процессов распада постоянно происходит синтез этих сложных липидов. Этот факт интересен также тем, что по современным представлениям основной путь биосинтеза фосфатидилхолина, одного из наиболее богатых энергией компонента фосфолипидов, следует через фосфатидилинозит и фосфатидилсерин.

3) В период осенне-зимнего покоя установлена тесная зависимость между поведением фосфолипидов, степенью их ненасыщенности, динамичностью макроэргического фосфора и морозоустойчивостью растений.

4) Становление высокой морозоустойчивости с одной стороны сопровождается использованием фосфолипидов, а с другой — возрастанием уровня их относительного содержания в жировом комплексе.

5) Сравнительно легкая повреждаемость тканей неморозоустойчивых и незакаленных растений связана с угнетением обменных и энергетических (АТФ) процессов в условиях низких температур с нарушением координации действия оксидоредуктаз с биосинтетическими процессами.

6) Предполагается наличие у морозоустойчивых сортов более усовершенствованных и эффективных путей трансформации и использования химической энергии в зимний период, особенно во время экстремальных температур.

7) Разработан метод экстракции, разделения и количественного определения фосфолипидов в одревесневших тканях винограда и плодовых культур.

- Грин Д., Флейшер С. Молекулярная организация биологических преобразующих систем - в кн. "Горизонты биохимии" изд. "Мир", Москва, стр. 293-325 1964.
- Кейтс М. Техника липидологии, Изд. "Мир", Москва 1975.
- Кириллов А.Ф. Лавин Т.Х. Изменения в содержании фосфорсодержащих веществ при закаливании винограда к низким температурам - в кн. "Физиология зимостойкости винограда и плодовых" Киев, стр. 18-39. 1971.
- Кондо И.Н. Устойчивость виноградного растения к морозам, засухе и почвенному засолению, Изд. "Картамадованьска", Кистинев. 1970.
- Курсанов А.Л. Транспорт метаболитов и физиология целого растения Изд. АН СССР, сер.биол. № 4, стр. 461-480. 1973.
- Макаревская Е.А. Физиология регенерационных процессов у виноградной лозы. Изд. "Мейнерба", Тбилиси 1966.
- Проценко Д.Ф. Коваль А.И. Биохимические особенности плодовых и древесных культур-конф. Физиология устойчивости растений. Тезисы докл., Киев. 1968.
- Сергеева К.А. Физиологические и биохимические основы зимостойкости древесных растений. - Изд. "Наука", Москва. 1971.
- Сычева З.Ф. Васюкова В.А. Влияние заморозков и закаливания холодом на дыхательный метаболизм активновегетирующих растений. - в к. "Физиология растений", т.19, в.4, стр. 824-830. 1972.
- Чебан А.И. Содержание и накопление нуклеиновых кислот в почках зимующих глазков винограда на разных этапах их годовичного развития. В к. "Физиология растений", т.15, в.2, стр. 329-335. 1968.

Ս.Ա. Մարության

ՖԻՆԱՆՍԱԿԻՄԵՐԻ ՓԻՓՈԽՈՒԹՅԱՆ ՕՐԻՆԱԿԱՓՈՒԹՅՈՒՆ-
ՆԵՐԸ ԿԱԿՎԱԾ ԽԱՂՈՂԻ ՅՐՏԱԴԻՄԱՅՆՈՒՄՈՒԹՅԱՆ ՀԵՏ

/ Ամփոփում /

Որոշումն աստիճանով են խաղողի շիվերում ընդհանուր և մակրոէրզիկ
Ֆոսֆորի, ազատ ու կապված Ֆոսֆորիդների քանակական և որակական փո-
փոխությունները ժման հասնգստի շրջանում՝ կապված նվազագույն շեր-
մաստիմանների ազդեցության և բույսի ցրտադիմացկունության բնույթի
հետ:

Միկրոքիմիական և քրոմոսոգրաֆիկ մեթոդներով ուսումնասիրելիս
վեր է հանվել Ֆոսֆորիդների և նուկլեոտիդների, ինչպես նաև կալ-
ցիում և մագնեզիում էլեմենտների յուրահատուկ վարքագիծը՝ տարբեր
ցրտադիմացկունությամբ օժտված սորտերում ու հիբրիդներում: