ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ, 2020, том 67, № 4, с. 428–437

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

УДК 581.1.634.63:577.15:58.036.5

ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ МОРОЗОСТОЙКОСТИ *Olea europaea* L.

© 2020 г. Т. Б. Губанова[a], *, А. Е. Палий[a]

[a]*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Никитский ботанический сад – Национальный научный центр Российской академии наук, Ялта, Россия*

**e-mail: gubanova-65@list.ru*

Поступила в редакцию 02.09.2019 г.
После доработки 15.10.2019 г.
Принята к публикации 23.10.2019 г.

Представлены результаты исследований морозостойкости сортов *Olea europaea* L. и ее подвида *O. europaea* subsp. *cuspidata* (Wall. and G. Don) Cif. в условиях Южного берега Крыма (ЮБК), а также влияния температуры, близкой к значению абсолютного минимума (–15°C) на состояние фотосинтетического аппарата, активность каталазы, полифенолоксидазы, содержание пролина и фенольных соединений. Установлено, что в условиях ЮБК относительно высокая морозостойкость характерна для сорта Никитская. Слабоморозостойкими оказались сорта Асколяно, Кореджиоло, Раццо. Минимальная устойчивость выявлена у подвида *O. europaea* subsp. *cuspidata*. У слабостойких сортов Раццо, Кореджиоло и *O. europaea* subsp. *cuspidata* действие температуры –15°C привело к необратимым нарушениям в работе фотосинтетического аппарата, что проявилось в значительном снижении фотосинтетической активности сразу после окончания низкотемпературного воздействия (на 80.19, 50.0 и 89.78%, соответственно), а также коэффициента спада флуоресценции ниже витальной нормы. Спустя 24 ч у сортов Асколяно и Никитская отмечено замедление снижения параметров индукции флуоресценции хлорофилла (ИФХ). Выявлено, что отрицательные температуры способствуют снижению активности каталазы у слабоустойчивых генотипов *O. europaea* (в среднем на 40–60%), в отличие от морозостойкого сорта Никитская, у которого активность этого фермента практически не изменилась. Изменение активности полифенолоксидазы было разнонаправленным. У сортов Раццо и Кореджиоло отмечено возрастание полифенолоксидазной активности (19 и 24%, соответственно), а у подвида *O. europaea* subsp. *cuspidata* и сорта Никитская – снижение (на 8 и 37%, соответственно). Показано, что при действии отрицательных температур у представителей *O. europaea* происходит снижение концентрации пролина в тканях листьев (на 17–55%). Наиболее значительные изменения выявлены у сорта Кореджиоло (на 45.09%). Суммарное содержание фенольных соединений снижалось у всех слабоморозостойких сортов и *O. europaea* subsp. *cuspidata* на 7–42%, а у морозостойкого сорта Никитская – оставалось неизменным. Установлено, что отрицательные температуры вызывают необратимые изменения в работе фотосинтетического аппарата у слабоустойчивых представителей *O. europaea*. Выявлена связь степени морозостойкости изучаемых генотипов с активностью каталазы, а также с содержанием пролина и фенольных соединений в тканях листьев.

Ключевые слова: *Olea europaea*, морозостойкость, фотосинтез, активность ферментов, пролин, фенольные соединения

DOI: 10.31857/S0015330320030100

ВВЕДЕНИЕ

Вопросы морозостойкости растений и функционирования механизмов, обеспечивающих это жизненно важное свойство, несмотря на огромный объем накопленного экспериментального материала, не утратили актуальности в наши дни. Исследования механизмов адаптации растительных организмов к действию гидротермического стресса в большей части проводятся на примере травянистых модельных объектов, что позволяет за относительно короткий срок детально изучить отдельные звенья сложных адаптивных процессов. Информация о реакциях на действие отрицательных температур древесных вечнозеленых лиственных растений немногочисленна. Реализация механизмов морозостойкости у этой группы растительных организмов вызывают особый интерес в связи с тем, что у них даже в зимнее время метаболические процессы весьма интенсивны.

Сокращения: ИФХ – индукция флуоресценции хлорофилла; ЮБК – Южный берег Крыма.

Исследование работы фотосинтетического аппарата в условиях отрицательных температур является ключевым моментом в изучении физиологии устойчивости вечнозеленых растений, которые в зимнее время часто подвержены одновременному действию стимулирующего (высокая инсоляция) и ингибирующего (низкие и отрицательные температуры) фактора. В настоящее время известно, что в условиях интенсивной освещенности и отрицательной температуры избыток энергии, который не может быть использован в фотохимических реакциях, является одной из причин деструктивных изменений фотосинтетического аппарата [1]. К защитным реакциям относится увеличение доли тепловой диссипации с участием каротиноидов виолоксантинового цикла [2].

Ряд авторов отмечает высокую чувствительность процессов флуоресценции хлорофилла к температурному фактору. В частности, известно, что при действии разнообразных факторов характер кривой индукции флуоресценции хлорофилла (ИФХ) позволяет получить объективную информацию об изменениях фотосинтетических процессов, как связанных с развитием адаптационного синдрома, так и с необратимыми нарушениями в работе фотосинтетического аппарата, что в свою очередь позволяет получить объективную характеристику устойчивости изучаемого вида растения [3, с. 148–155].

Низкотемпературный стресс проявляется на всех уровнях организации растительного организма. На клеточном уровне морозные повреждения затрагивают прежде всего мембраны [6], при этом происходит увеличение уровня АФК, которое впоследствии может привести к перекисному окислению липидов, разрушению мембран, деградации белков и нарушению метаболической функции [7]. Для смягчения или защиты от индуцированного отрицательными температурами окислительного повреждения в растениях выработаны механизмы удаления АФК с помощью ферментативной и неферментативной антиоксидантных систем, в состав которых входят окислительно-восстановительные ферменты (супероксиддисмутаза, каталаза, пероксидаза и др.) и протекторные соединения (фенольные вещества, аскорбиновая кислота, пролин и др.) [8]. Немаловажную роль в ликвидации последствий действия отрицательных температур играет полифенолоксидаза, поскольку она помогает избежать серьезного окислительного повреждения, вызванного замораживанием [9]. При возникновении стрессовых условий изменение активности полифенолоксидазы связано с образованием химических барьеров, препятствующих дальнейшему распространению АФК. Таким образом, ферменты антиоксидантной системы и полифенолоксидаза, принимая участие в регуляции метаболизма, способствуют быстрой адаптации растения к изменяющимся условиям окружающей среды.

Маслина является одной из субтропических культур, которая часто выращивается в климатических условиях, граничащих с пределами их зимостойкости [10]. Исследования, проведенные ранее, показали, что существует корреляция между некоторыми физиолого-биохимическими характеристиками (размер и плотность устьиц, содержание фенольных соединений, общих растворимых белков, водорастворимых сахаров, экзосмос электролитов и др.) и морозостойкостью генотипов маслины [11, 12].

Поскольку действие отрицательных температур на древесные вечнозеленые растения затрагивает все звенья их жизнедеятельности, то цель наших исследований заключалась в выявлении связи степени морозостойкости у представителей *Olea europaea* с изменениями параметров ИФХ, активности окислительно-восстановительных ферментов и содержания некоторых криопротекторных соединений.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве материалов исследований были выбраны сорта *Olea europaea* L.: Никитская (селекция Никитского ботанического сада), Асколяно, Раццо, Кореджиоло (средиземноморского происхождения) и подвид *O. europaea* subsp. *cuspidata* (Wall. and G. Don) Cif. Все растения достигли состояния полного плодоношения. С 2015 по 2018 гг. проводили визуальную оценку состояния растений после понижения температуры воздуха до отрицательных значений и в конце холодного периода, с учетом рекомендаций В.М. Бурдасова [13].

Для определения влияния отрицательных температур на состояние фотосинтетического аппарата генотипов *O. europaea* с различной степенью морозостойкости была проведена серия экспериментов по искусственному промораживанию однолетних побегов в течение 6 часов при температуре, близкой к значению абсолютного минимума на ЮБК –15°С. Опыты осуществляли в климатической камере Votsch VT 4004 (“Vötsch Industrietechnik GmbH”, Германия) в период максимальной вероятности наступления морозов на ЮБК (третья декада января), с предварительной закалкой при 0°С не менее 6 часов. Градиент изменения температуры в камере составил 2°С в час [14, с. 4–6].

Интенсивность флуоресценции хлорофилла (ИФХ) измеряли с помощью портативного хронофлуориметра Флоратест (Институт кибернетики НАН Украины) [15]. Для интегральной оценки состояния фотосинтетического аппарата анализировали следующие показатели фотоиндукции флуоресценции [16, 17]: F_0 – базовый уровень флуоресценции, зависящий от потерь энергии

возбуждения во время миграции по пигментной матрице, а также от содержания молекул хлорофилла, не имеющих функциональной связи с реакционными центрами; F_{pl} – уровень флуоресценции в момент достижения ее временного замедления; F_m – максимальное значение флуоресценции; F_{st} – стационарный уровень флуоресценции, отмечаемый через три минуты после момента освещения – показатель количества хлорофиллов, не принимающих участия в передаче энергии на реакционные центры. В качестве расчетных параметров флюоресценции использовали: вариабельную флуоресценцию $F_v = F_m - F_0$ (индикатор фотохимических окислительно-восстановительных процессов); характеристику тепловой диссипации энергии возбужденных молекул хлорофилла $(F_m - F_{st})/F_{st}$; относительную фотосинтетическую активность $(F_m - F_{st})/F_m$; коэффициент спада флуоресценции, эффективность квантового выхода фотосинтеза F_v/F_{st} (индекс жизнеспособности); эффективность световой фазы фотосинтеза F_v/F_m; количество невосстановленных Q_a в реакционных центрах ФС II $(F_{pl} - F_0)/F_v$.

Биохимические показатели определяли по общепринятым методикам: содержание пролина – по модифицированной методике Чинарда с использованием нингидринового реактива [18], суммы фенольных веществ – спектрофотометрическим методом с использованием реактива Фолина-Чокальтеу [19, с. 35–40]. Активность каталазы (КФ 1.11.1.6) определяли титриметрическим методом [20, с. 72], полифенолоксидазы (КФ 1.14.18.1) – колориметрически в присутствии пирокатехина и *n*-фенилендиамина [20, с. 43–46], с использованием спектрофотометра Evolution 220 UV/VIS (“Thermo Scientific”, США).

Компонентный состав фенольных соединений определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии [21] на хроматографе Dionex UltiMate 3000 (“Thermo Scientific”, США) с диодноматричным детектором DAD-3000. Для проведения анализа была использована аналитическая хроматографическая колонка ZORBAX Eclipse Plus C18, 4.6 м × 250 мм × 5 мкм. Применяли градиентный режим элюирования. Подвижная фаза B – ацетонитрил, C – 0.1% раствор муравьиной кислоты в деионизированной воде: 0–5 мин 5% B, 5–35 мин – подъем от 5 до 30% B, 35–40 мин подъем от 30 до 90% B, 40–41 мин подъем до 100% B, 41–46 мин – 100% B, 46–51 мин снижение от 100% B до 5% B, 51–55 мин 5% B. Скорость потока 0.7 мл/мин. Температура термостата колонок 400°C. Объем пробы 7 мкл. Идентификацию пиков производили на основании совпадения времени удерживания аналита и стандартного образца, а также совпадения УФ-спектров. Расчет количественного содержания индивидуальных компонентов производили по калибровочным графикам зависимости площади пика от концентрации вещества, построенным по растворам индивидуальных веществ. В качестве стандартов использовали лютеолин-7-O-глюкозид, апигенин-7-O-глюкозид, олеуропеин и рутин (“Sigma-Aldrich”, США). Для обеспечения однородности результатов концентрации суммы фенольных соединений и отдельных компонентов рассчитывали в пересчете на сырой вес.

Физиолого-биохимические эксперименты проводили в 3-кратной биологической и в 3-кратной аналитической повторностях. Каждый эксперимент был повторен 2 раза. Для статистической обработки и факторного анализа (ANOVA) использовали программы MS Excel 2007 и Statistica 6.0. Достоверность различий между вариантами рассчитывали по *t*-критерию Стьюдента при 5% уровне значимости. В таблицах и на графиках представлены средние значения определений и их стандартные ошибки.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате многолетнего изучения устойчивости *O. europaea* к действию отрицательных температур определена степень морозостойкости и ее изменение в течение холодного периода на ЮБК. Установлено, что изучаемые генотипы различаются по степени устойчивости: относительно устойчивым оказался сорт Никитская, сорта Асколяно, Кореджиоло, Раццо проявляли более низкую морозостойкость, а подвид *O. europaea* subsp. *cuspidata* – минимальную. Резистентность к действию отрицательных температур у *O. europaea* в течение холодного периода на ЮБК динамична. Ее максимум приходится на вторую половину декабря – начало января. Негативное влияние на реализацию потенциальной морозостойкости оказывают теплые погодные условия в осенне-зимний период (среднесуточная температура +7...+10°C), поскольку они способствуют позднему завершению ростовых процессов. Анализ повреждений, вызванных температурой –15°C (в контролируемых условиях), которая соответствует значению абсолютного минимума на ЮБК, показал, что у сортов маслины их интенсивность различна. В большей степени чувствительными к такому температурному воздействию оказались сорта Кореджиоло, Асколяно, Раццо и подвид *O. europaea* subsp. *cuspidata*. У морозостойкого сорта Никитская наблюдались повреждения листьев (в пределах 10–15% от их количества), расположенных в базальной части однолетнего побега и единичные случаи обмерзания апикальной части побегов. У сортов Кореджиоло, Асколяно, Раццо обмерзание составило 90, 60 и 80% листьев, соответственно. Наиболее значительные морозные повреждения, вызванные действием указанной температуры, были у подвида *O. europaea*

subsp. *cuspidata*: практически полное обмерзание листвы, нарушение целостности камбия и проводящей системы, распространившееся в базипетальном направлении по побегу до 10–12 см. Анализ научной литературы показал, что исследования влияния температурного стресса на фотосинтетическую активность и кинетику флуоресценции многочисленны. В настоящее время установлено, что низкотемпературный стресс связан с уменьшением рециклирования фосфатов и фотофосфорилирования, замедлением фотосинтетического транспорта электронов и возрастанием вероятности фотоингибирования [22–24]. В связи с выше сказанным, нами была проведена серия экспериментов по оценке состояния фотосинтетического аппарата генотипов *O. europaea* с различной степенью морозостойкости после действия температуры –15°C (табл. 1, рис. 1).Параметры кривых ИФХ в контрольном варианте (до воздействия отрицательной температуры) у слабоустойчивых сортов *O. europaea* – Кореджиоло и Асколяно, а также подвида *O. europaea* subsp. *cuspidata* по уровню базовой флуоресценции имели близкие значения. Максимальное значение F_0 отмечено у сорта Раццо, что свидетельствует о существенных затратах энергии возбуждения и сравнительно большем количестве молекул хлорофилла, не связанных с реакционными центрами. Морозостойкий сорт Никитская по этому параметру занимает промежуточное положение. Существенные различия у генотипов *O. europaea* выявлены в уровне максимальной флуоресценции (F_m). Самым низким значением параметра F_m характеризовался подвид *O. europaea* subsp. *cuspidata,* а высоким – сорта Никитская и Раццо. Коэффициент спада флуоресценции у всех изучаемых сортов в контрольном варианте не выходил за пределы нормы витальности. Аналогичная картина отмечена при анализе стационарного уровня флуоресценции: максимальные значения этого параметра наблюдались у сортов Никитская и Раццо, а минимальные – у Асколяно и подвида *O. europaea* subsp. *cuspidata*. Сравнение параметров F_m и F_{st} до воздействия низкотемпературного фактора позволяет сделать обоснованное предположение о том, что в фотосинтетическом аппарате неустойчивых к отрицательным температурам генотипов (например, подвида *O. europaea* subsp. *cuspidata*) большая часть хлорофилла в пределах фотосистемы входит в реакционные центры. У морозостойкого сорта Никитская соотношение этих параметров значительно выше, что, вероятно, связано с наличием некоторого “пула” хлорофиллов, обеспечивающих стабильность фотосинтетических процессов в стрессовых условиях. Максимальные значения относительной фотосинтетической активности ($(F_m - F_{st})/F_{st}$) наблюдались у сортов Раццо и Никитская.

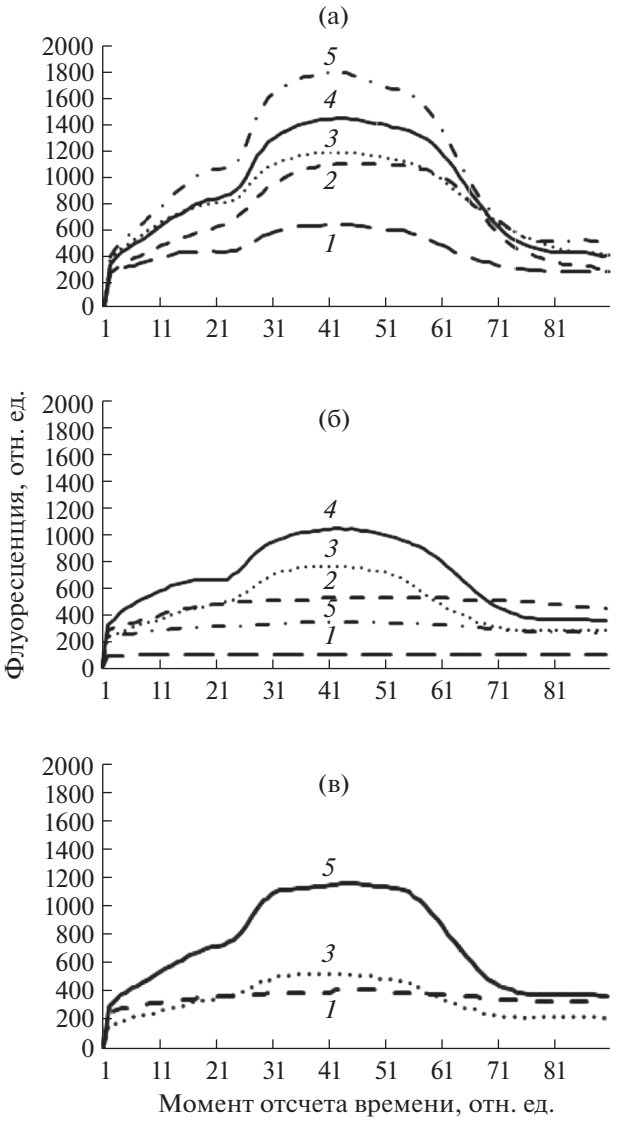

Рис. 1. Индукционные кривые флуоресценции хлорофилла листьев представителей *Olea europaea*. *1* – *O. europaea* spp. *cuspidata*, *2* – Кореджиоло, *3* – Асколяно, *4* – Никитская, *5* – Раццо.

Параметр $(F_{pl} - F_0)/F_v$, соответствующий количеству невосстановленных Q_a в реакционных центрах ФС II, у всех изучаемых генотипов *O. europaea* в контрольном варианте имел близкие значения. Параметр F_v/F_m, определяющий эффективность световой фазы фотосинтеза, у сортов *O. europaea* не имел существенных различий до воздействия отрицательной температуры. В то же время, по сравнению с сортами, у подвида *O. europaea* subsp. *cuspidata* этот показатель был ниже в среднем на 30%.

Анализ параметров ИФХ у генотипов *O. europaea* показал, что их фотосинтетическая активность имеет сортовые особенности. Наиболее значительные отличия по форме кривой ИФХ и

Таблица 1. Изменение параметров ИФХ (в отн. ед.) листьев представителей *O. europaea* под влиянием отрицательной температуры (–15°C; 6 ч)

Генотип	F_0	F_{pl}	F_m	F_{st}	F_v	$(F_m - F_{st})/F_{st}$	$(F_m - F_{st})/F_m$	F_v/F_{st}	F_v/F_m	$(F_{pl} - F_0)/F_v$
Контроль										
O. europaea ssp. *cuspidata*	229 ± 6[ж]	320 ± 5[к]	501 ± 9[и]	250 ± 6[к]	272 ± 7[и]	1.01 ± 0.20[в]	0.50 ± 0.02[г]	1.08 ± 0.02[з]	0.54 ± 0.02[в]	0.33 ± 0.01[г]
Асколяно	272 ± 8[г]	501 ± 9[д]	938 ± 11[д]	357 ± 9[е]	666 ± 8[е]	1.62 ± 0.31[б, в]	0.62 ± 0.03[б]	1.86 ± 0.04[д]	0.75 ± 0.03[а]	0.34 ± 0.01[г]
Раццо	400 ± 5[а]	997 ± 10[а]	1872 ± 21[а]	576 ± 9[а]	1472 ± 12[а]	2.25 ± 0.20[а]	0.69 ± 0.01[а]	2.56 ± 0.05[а]	0.79 ± 0.01[а]	0.41 ± 0.04[в]
Кореджиоло	264 ± 9[г]	576 ± 8[г]	1080 ± 25[г]	392 ± 7[г]	816 ± 10[г]	1.76 ± 0.12[б]	0.64 ± 0.02[б]	2.08 ± 0.10[в]	0.76 ± 0.02[а]	0.38 ± 0.01[в]
Никитская	325 ± 4[б]	736 ± 6[б]	1530 ± 21[б]	496 ± 8[б]	1205 ± 13[б]	2.08 ± 0.31[а, б]	0.68 ± 0.02[а, б]	2.43 ± 0.20[б]	0.77 ± 0.03[а]	0.34 ± 0.01[г]
Сразу после действия температуры –15°C										
O. europaea ssp. *cuspidata*	95 ± 2.4[и]	102 ± 5[л]	113 ± 3[м]	111 ± 6[м]	18 ± 2[м]	0.20 ± 0.10[д]	0.02 ± 0.01[в]	0.1 ± 0.016[м]	0,16 ± 0.01[ж]	0,39 ± 0.02[в]
Асколяно	240 ± 4[е]	432 ± 4[ж]	768 ± 5[е]	304 ± 8[з]	528 ± 9[ж]	1.52 ± 0.22[б, в]	0.60 ± 0.03[б, в]	1.74 ± 0.04[е]	0.69 ± 0.02[б]	0.36 ± 0.02[в, г]
Раццо	250 ± 6[е]	309 ± 9[к]	346 ± 7[л]	282 ± 9[и]	96 ± 4[л]	0.23 ± 0.01[д]	0.18 ± 0.01[е]	0.34 ± 0.02[л]	0.28 ± 0.01[е]	0.61 ± 0.03[а]
Кореджиоло	300 ± 5[в]	456 ± 5[е]	560 ± 9[ж]	376 ± 6[д]	260 ± 8[и]	0.49 ± 0.01[г]	0.32 ± 0.02[д]	0.69 ± 0.01[и]	0.46 ± 0.02[г]	0.60 ± 0.01[а]
Никитская	324 ± 8[б]	650 ± 8[в]	1046 ± 12[г]	373 ± 8[д]	722 ± 9[д]	1.80 ± 0.22[б]	0.64 ± 0.03[б]	1.93 ± 0.21[г]	0.69 ± 0.03[б]	0.45 ± 0.01[б]
Через 24 часа										
O. europaea ssp. *cuspidata*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Раццо	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Асколяно	17 6 ± 10[з]	336 ± 6[и]	528 ± 10[з]	224 ± 4[л]	352 ± 6[з]	1.36 ± 0.21[в]	0.57 ± 0.01[в]	1.57 ± 0.21[ж]	0.67±0.03[б]	0.45 ± 0.01[б]
Кореджиоло	256 ± 7[г, е]	352 ± 9[з]	416 ± 8[к]	336 ± 7[ж]	160 ± 5[к]	0.24 ± 0.02[д]	0.19 ± 0.01[е]	0.48 ± 0.01[к]	0.38 ± 0.01[д]	0.60 ± 0.02[а]
Никитская	304 ± 5[в]	656 ± 10[в]	1168 ± 13[в]	416 ± 8[в]	864 ± 8[в]	1.81 ± 0.11[б]	0.64 ± 0.01[б]	2.08 ± 0.21[в]	0.74 ± 0.06[б]	0.41 ± 0.01[в]

Примечание. Приведены средние арифметические значения полученных величин и их стандартные ошибки. Достоверные различия на уровне $P < 0.05$ отмечены разными буквами. * – Исследования не проводились в связи с гибелью листа.

ее характеристикам выявлены у подвида *O. europaea* subsp. *cuspidata*.

Действие температуры –15°С в течение 6 ч привело к изменению параметров ИФХ у всех изучаемых объектов. У подвида *O. europaea* subsp. *cuspidata* и сорта Раццо отмечено чрезвычайное снижение базового уровня флуоресценции – на 58.52 и 37.57%, соответственно, что свидетельствует о необратимых процессах, вероятно, связанных с деструкцией хлорофилла. У этих же генотипов выявлено резкое падение относительной фотосинтетической активности в результате развития низкотемпературного стресса на 80.19 и 89.78%, соответственно. Наличие необратимых нарушений в фотосинтетическом аппарате у подвида *O. europaea* subsp. *cuspidata* и сорта Раццо подтверждается значениями коэффициента спада флуоресценции (индекса жизнеспособности) и отсутствием выраженных пиков на кривой ИФХ. У сорта Кореджиоло действие отрицательной температуры также привело к снижению максимального уровня флуоресценции (на 48.14%), что может быть связано с разрушением светособирающих комплексов. При этом практически не изменилось количество молекул хлорофилла, не принимающих участия в передаче энергии к реакционным центрам (F_{st}). Однако наблюдалось снижение более чем на 50% таких параметров, как относительная фотосинтетическая активность, эффективность световой фазы и коэффициента спада флуоресценции, ниже витальной нормы, что свидетельствует об инактивации фотосинтеза у этого сорта. Подтверждением развития стрессового состояния сразу после окончания низкотемпературного воздействия у сортов Асколяно и Никитская является снижение максимума и коэффициента спада флуоресценции, характеризующего квантовый выход фотосинтеза. Однако эти изменения не являлись критическими: $F_v/F_{st} \geq 1.50–2.50$ [16]. Также у этих сортов отмечено незначительное снижение эффективности световой фазы фотосинтеза (на 8% у сорта Асколяно и на 10.39% у сорта Никитская). Действие отрицательной температуры также оказало влияние на уровень относительной фотосинтетической активности, причем эти изменения у сорта Никитская составили 13.46%, что почти в два раза больше, чем у сорта Асколяно. Выявленные изменения, с нашей точки зрения, характеризуют наличие обратимых нарушений в течение световой фазы фотосинтеза, более выраженных у сорта Асколяно. У морозостойкого сорта Никитская более чувствительными к действию отрицательных температур оказались процессы восстановления реакционных центров с окисленным Q_a – их количество увеличилось на 32.35%, в то время как у более чувствительного к отрицательным температурам сорта Асколяно оно практически не изменилось.

Анализ характера изменений параметров и формы кривой ИФХ через 24 часа, после окончания низкотемпературного воздействия, показал, что у сорта Кореджиоло они были необратимыми. У сорта Асколяно большая часть параметров продолжала снижаться; в частности, наблюдалось замедление фотохимических окислительно-восстановительных процессов, при этом происходило увеличение количества невосстановленных реакционных центров. Тем не менее, изменения ключевых параметров, таких как относительная фотосинтетическая активность, коэффициент спада флуоресценции, а также индекс жизнеспособности, были незначительными. Это, с нашей точки зрения, связано с наличием у сорта Асколяно физиолого-биохимических механизмов, замедляющих скорость нарастания стрессового состояния. В отличие от сорта Асколяно, у морозостойкого сорта Никитская изменения параметров ИФХ носили другой характер. В данном случае наблюдалось возрастание уровня максимальной, стабилизирующей и вариабельной флуоресценции, а также параметров F_v/F_{st} и F_v/F_m, определяющих эффективность световой фазы фотосинтеза. С нашей точки зрения, полученные результаты говорят не только о снижении уровня стресса у этого сорта *O. europaea*, но и об активации репарационных механизмов, нормализующих работу фотосинтетического аппарата после окончания действия стрессора. Подтверждением этому является тот факт, что у морозостойкого сорта Никитская через 24 часа после окончания действия температуры некоторые параметры ИФХ (F_0, F_v/F_m, $(F_{pl} - F_0)/F_v$) практически не отличались от их значений в контроле.

Анализ активности каталазы и полифенолоксидазы в листьях маслины до воздействия отрицательных температур показал, что изучаемые сортообразцы имеют существенные различия в данных характеристиках. Так, листья сорта Асколяно обладают максимальной активностью каталазы и минимальной – полифенолоксидазы. Самая низкая каталазная и высокая полифенолоксидазная активность отмечена у неустойчивого подвида *O. europaea* subsp. *cuspidata*. Остальные сорта *O. europaea* характеризовались близкими значениями активности этих ферментов, за исключением сорта Раццо, у которого полифенолоксидазная активность в некоторой степени снижена (табл. 2).

В результате действия температуры –15°С наблюдалось снижение активности каталазы у всех генотипов, за исключением морозостойкого сорта Никитская. Самое значительное падение активности этого фермента выявлено у чувствительных к действию отрицательных температур сорта Кореджиоло и подвида *O. europaea* subsp. *cuspidata,* более чем на 60%. Изменение активно-

Таблица 2. Активность ферментов в листьях *Olea europaea* до и после действия температуры –15°С

Генотип	Вариант опыта	Активность каталазы, мл O_2/(г мин)	Активность полифенолоксидазы, усл. ед./(г с)
Асколяно	Контроль	6.80 ± 0.17[а]	0.050 ± 0.002[е]
	Опыт	5.53 ± 0.14[б]	0.050 ± 0.002[е]
O. europaea ssp. *cuspidata*	Контроль	3.83 ± 0.10[д]	0.200 ± 0.006[б]
	Опыт	1.28 ± 0.03[ж]	0.184 ± 0.005[в]
Кореджиоло	Контроль	4.68 ± 0.11[в]	0.202 ± 0.006[б]
	Опыт	1.26 ± 0.04[ж]	0.251 ± 0.008[а]
Раццо	Контроль	4.67 ± 0.12[в]	0.084 ± 0.003[в]
	Опыт	3.40 ± 0.10[е]	0.100 ± 0.004[д]
Никитская	Контроль	4.55 ± 0.13[г]	0.184 ± 0.005[в]
	опыт	4.68 ± 0.11[в]	0.117 ± 0.004[г]

Примечание. Приведены средние арифметические значения полученных величин и их стандартные ошибки. Достоверные различия на уровне $P < 0.05$ отмечены разными буквами.

сти полифенолоксидазы в опытных вариантах происходило разнонаправленно. В листьях сортов Раццо и Кореджиоло она возрастала на 19 и 24% соответственно, у подвида *O. europaea* subsp. *cuspidata* и сорта Никитская – падала на 8% и 37% соответственно, а у Асколяно оставалась неизменной.

По литературным данным, развитие адаптационного синдрома у *O. europaea* при нарастающем действии отрицательных температур сопровождается увеличением активности антиоксидантных ферментов (каталазы, пероксидазы, аскорбатпероксидазы) и полифенолоксидазы [9, 12, 25]. В то же время имеется информация о снижении активности каталазы в листьях маслины при температуре ниже –10°С [26], что согласуется с полученными нами данными. В нашем эксперименте активность полифенолоксидазы возрастала не у всех исследуемых генотипов. Выявленные противоречия, вероятно, связаны с произрастанием конкретных генотипов на северной границе культигенного ареала маслины, а также со скоростью понижения температуры и длительностью температурного воздействия в условиях лабораторного опыта. Также существенное значение имеет факт, что начальные повреждающие температуры для многих сортов находятся в пределах –8...–10°С, а температуры –12°С и ниже являются критическими [27].

При исследовании содержания протекторных соединений установлено, что в контрольном варианте содержание пролина колебалось в пределах 43–72 мкг/г, суммы фенольных соединений – 1036–1332 мг/100 г, лютеолин-7-О-глюкозида – 235–345 мг/100 г, рутина – 79–114 мг/100 г, олеуропеина – 450–1850 мг/100 г (табл. 3). Максимальное содержание пролина выявлено у сорта Никитская, суммы фенольных соединений – у подвида *O. europaea* subsp. *cuspidata*, лютеолин-7-О-глюкозида, рутина и олеуропеина – у сорта Кореджиоло.

Воздействие отрицательных температур приводило к снижению уровня пролина на 17–55% в листьях всех исследуемых генотипов. Наиболее значительно концентрация пролина падала у сорта Кореджиоло. Такая картина является типичной реакцией маслины на низкотемпературный стресс. Поскольку пролин в качестве криопротектора участвует в неферментативной регуляции ПОЛ, то и снижение его концентрации может быть обусловлено реализацией защитных реакций [26].

Неоднократно отмечалась, что роль фенольных соединений в устойчивости растений к отрицательным температурам связана с их высокой биологической активностью и широким разнообразием функций в растительном организме, в частности – с участием в процессах регуляции роста и неферментативной защиты растения от АФК [28]. В настоящее время известно о высоких концентрациях фенольных соединений в листьях и плодах маслины, которые представлены фенольными кислотами и спиртами, флавоноидами и секо-иридоидами [29]. При этом одним из важнейших метаболитов маслины является олеуропеин [30]. Однако большая часть исследований этого соединения посвящена его фармакологическим свойствам. Информация о роли олеуропеина непосредственно в организме растений *O. europaea* отрывочна и противоречива. В частности, испанскими учеными констатируется связь содержания олеуропеина и его предшественников гидрокситирозола и тирозола со степенью устой-

Таблица 3. Содержание протекторных соединений в листьях маслины *Olea europaea* до и после действия температуры −15°C

Генотип		Пролин, мкг/г	Сумма ФС, мг/100 г	Лютеолин-7-О-глюкозид, мг/100 г	Рутин, мг/100 г	Олеуропеин, мг/100 г
Асколяно	Контроль	51.6 ± 1.52[г]	1249 ± 38[б]	235 ± 24[б]	86.8 ± 8.7[в]	611 ± 61[в]
	Опыт	43.0 ± 1.08[д]	1166 ± 35[в]	293 ± 29[а,б]	81.0 ± 8.0[в]	882 ± 80[б]
O. europaea ssp. *cuspidata*	Контроль	64.2 ± 1.96[б]	1332 ± 33[а]	241 ± 24[б]	81.5 ± 8.1[в]	674 ± 68[в]
	Опыт	34.2 ± 1.03[е]	766 ± 21[е]	187 ± 19[в]	135.0 ± 13.5[а,б]	307 ± 31[д]
Кореджиоло	Контроль	42.8 ± 1.07[д]	1036 ± 28[г]	345 ± 35[а]	114.0 ± 11.0 [б]	1850 ± 185[а]
	Опыт	19.3 ± 0.48[ж]	800 ± 25[е]	247 ± 25[б]	151.0 ± 15.1[а]	702 ± 70[в]
Раццо	Контроль	55.6 ± 1.67[в]	1232 ± 36[б]	330 ± 33[а]	112.5 ± 1.3[б]	1840 ± 184[а]
	Опыт	32.1 ± 0.96[е]	916 ± 23[д]	241 ± 24[б]	143.0 ± 14.3[а]	680 ± 68[в]
Никитская	Контроль	72.8 ± 1.82[а]	1216 ± 30[б]	257 ± 26[б]	79.0 ± 7.9[в]	450 ± 45[г]
	Опыт	42.8 ± 1.05[д]	1248 ± 31[б]	71.0 ± 7.1[г]	54.9 ± 5.5[г]	202 ± 20[е]

Примечание. Приведены средние арифметические значения полученных величин и их стандартные ошибки. Достоверные различия на уровне $P < 0.05$ отмечены разными буквами.

чивости некоторых сортов маслины к низкотемпературному стрессу [9, 25].

Для выявления значения фенольных соединений в морозостойкости маслины изучено изменение концентрации данной группы веществ в контролируемых условиях. Установлено, что суммарное содержание фенольных соединений снижалось у всех слабоморозостойких сортов и *O. europaea* subsp. *cuspidata* на 7–42%, а у морозостойкого сорта Никитская оставалось неизменным. Также происходили значительные изменения концентраций индивидуальных фенольных соединений. Так, содержание лютеолин-7-О-глюкозида и олеуропеина падало у всех генотипов, за исключением сорта Асколяно. Содержание рутина росло у сорта Раццо и подвида *O. europaea* subsp. *cuspidata*, у сортов Кореджиоло и Никитская падало, а у сорта Асколяно оставалось неизменным.

На основе полученных данных можно предположить участие как суммы фенольных соединений, так и их индивидуальный вклад в механизмы устойчивости маслины к отрицательным температурам. Снижение концентрации этих веществ отмечено практически у всех сортов сразу после воздействия стрессового фактора. Вероятно, что действие критических температур приводит к активному расходованию данной группы соединений растительным организмом в качестве антиоксидантов.

Результаты проведенных исследований позволяют заключить, что действие температуры, близкой к значению абсолютного минимума на ЮБК, на слабоморозостойкие генотипы *O. europaea* приводит к инактивации фотосинтетических процессов сразу после окончания действия стресса. Наиболее чувствительным к низкотемпературному воздействию у устойчивого сорта Никитская и слабоустойчивого Асколяно оказались параметры, характеризующие эффективность световой фазы фотосинтеза и относительную фотосинтетическую активность. Однако у этих сортов изменения параметров ИФХ носили обратимый характер, о чем свидетельствуют значения индекса жизнеспособности. Необходимо отметить, что в характеристиках флуоресценции до стрессового воздействия у изучаемых представителей *O. europaea* также выявлены различия. В частности, сорта с низкой морозостойкостью и подвид *O. europaea* subsp. *cuspidata* значительно отличались от морозостойкого сорта Никитская как по уровню начальной флуоресценции, так и по ее максимальному значению. Эти отличия могут быть связаны с сортовыми особенностями и позволяют предположить, что высокая чувствительность фотосинтетического аппарата к действию отрицательных температур у сортов Раццо, Кореджиоло и подвида *O. europaea* subsp. *cuspidata* связана с большей потерей энергии возбуждения во время ее транспортировки от светособирающих комплексов, по сравнению с морозостойким сортом Никитская. Отдельно следует отметить, что сорт Никитская значительно отличается по соотношению параметров F_m и F_{st}, что показывает наличие некоторого “пула” хлорофилла, обеспечивающего относительную стабильность фотосинтетических процессов в стрессовых условиях. Установлено, что у спустя 24 часа после окончания стрессового воздействия у слабоустойчивого сорта Асколяно и морозостойкого сорта Никитская интенсивность изменений параметров ИФХ уменьшилась, что, вероятно, связано со стабилизацией фото-

синтетических процессов. При этом у резистентного сорта Никитская через сутки после действия отрицательной температуры базовый уровень флуоресценции и эффективность световой фазы фотосинтеза практически не отличались от контрольных.

Исследования изменений в активности окислительно-восстановительных ферментов и содержания некоторых биологически активных веществ показали, что развитие низкотемпературного стресса сопровождается специфическими изменениями как в работе ферментов, так и в концентрации фенольных соединений и пролина. Выявлено, что у чувствительных к действию отрицательных температур генотипов *O. europaea* активность каталазы существенно снизилась, а у морозостойкого сорта Никитская практически не изменилась. Поскольку отрицательные температуры способствуют активации процессов образования АФК, а в нейтрализации их токсичных продуктов принимает участие каталаза, то сохранение ее нормальной активности имеет существенное значение для поддержания гомеостаза в растительном организме в целом и, в частности, для сохранения фотосинтетической функции. Изменения полифенолоксидазной активности в условиях действия критических температур происходили разнонаправленно, что, возможно, связано как с индивидуальными сортовыми особенностями, так и со степенью криорезистентности.

Результаты исследования влияния отрицательных температур на концентрацию фенольных соединений и пролина в тканях листьев представителей *O. europaea* позволили сделать вывод о связи изменения их содержания с реализацией защитных механизмов. Установлено, что у всех изучаемых генотипов происходит снижение содержания пролина, суммы фенольных соединений и одного из ключевых веществ в метаболизме маслины европейской – олеуропеина, сразу после окончания действия температуры –15°C. Полученные данные свидетельствуют об участии этих веществ в первичных неспецифических реакциях на действие стрессора.

Таким образом, в результате проведенных исследований получена характеристика морозостойкости генотипов маслины в условиях Южного берега Крыма и выявлены особенности работы фотосинтетического аппарата, изменения ферментативной активности и содержания протекторных веществ в листьях данной культуры в связи со степенью устойчивости к действию отрицательных температур.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Adams W.W.I., Demmig-Adams B., Rosenstiel T.N., Ebbert V.* Dependence of photosynthesis and energy dissipation activity upon growth form and light environment during the winter // Photosynth. Res. 2001. V. 67. P. 51. https://doi.org/10.1023/A:1010688528773
2. *Demming-Adams B.* Carotenoides and photoprottction in plants. A role for xanthophyll zeaxanthin // Biochim. Biophys. Acta. 1990. V. 10. P. 2401. https://doi.org/10.1016/0005-2728(90)90088-L
3. *Гаевский Н.А., Моргун В.Н.* Использование переменной и замедленной флуоресценции хлорофилла для изучения фотосинтеза растений // Физиология растений. 1993. Т. 40. С. 119.
4. *Бородин И.Ф., Будаговский А.В., Будаговская О.Н., Будаговский И.А., Судник Ю.А.* Применение эффекта фотоиндуцированной изменчивости оптических свойств хлорофиллсодержащих тканей для диагностики функционального состояния растений // Доклады РАСХН. 2008. № 5. С. 62.
5. *Гольцев В.Н., Кузманова М.А., Каладжи Х.М., Аллахвердиев С.И.* Переменная и замедленная флуоресценция хлорофилла *a* – теоретические основы и практическое приложение в исследовании растений. Ижевск–Москва: Институт компьютерных исследований, 2014. 220 с.
6. *Levitt J.* Responses of Plants to Environmental Stresses. New York: Academic Press, 1980. 497 p.
7. *Lin S.Z., Zhang Z.Y., Liu W.F., Lin Y.Z., Zhang Q., Zhu B.Q.* Role of glucose-6-phosphate dehydrogenase in freezing-induced freezing resistance of *Populus suaveolens* // J. Plant Physiol. Mol. Biol. 2005. V. 31. P. 34.
8. *Mittler R.* Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance // Trends Plant Sci. 2002. V. 7. P. 405. https://doi.org/10.1016/s1360-1385(02)02312-9
9. *Ortega-García F., Peragón J.* The response of phenylalanine ammonia-lyase, polyphenol oxidase and phenols to cold stress in the olive tree (*Olea europaea* L. cv. Picual) // J. Sci. Food Agric. 2009. V. 89. P. 1565. https://doi.org/10.1002/jsfa.3625
10. *Bartolozzi F., Rocchi P., Camerini F., Fontanazza G.* Changes of biochemical parameters in olive (*Olea europaea* L.) leaves during an entire vegetative season, and their correlation with frost resistance // Acta Hortic. 1999. V. 474. P. 435. https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1999.474.89
11. *Roselli G., Venora G.* Relationship between stomatal size and winter hardiness in the olive // Acta Hortic. 1990. V. 286. P. 89. https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1990.286.15
12. *Cansev A., Gulen H., Eris A.* Cold-hardiness of olive (*Olea europaea* L.) cultivars in cold-acclimated and non-acclimated stages: seasonal alteration of antioxidative enzymes and dehydrin-like proteins // J. Agric. Sci. 2009. V. 147. P. 51. https://doi.org/10.1017/S0021859608008058
13. *Бурдасов В.М.* Методические указания по определению элементов зимостойкости садовых растений. Москва: ВАСХНИЛ, 1984. 20 с.

14. *Лищук А.И.* Физиологические и биофизические методы в селекции плодовых культур: методические рекомендации. Москва: ВАСХНИЛ, 1991. 58 с.

15. *Romanov V.A., Galelyuka I.B., Sarakhan Ie.V.* Portable fluorometer Floratest and specifics of its application // Sensor Electronics and Microsystem Technology. 2010. V. 1(7). № 3. P. 39.

16. *Будаговская О.Н., Будаговский А.В., Будаговский И.А.* Лазерная диагностика растений: методические рекомендации. Мичуринск: "Мичуринск", 2010. 54 с.

17. *Stirbet A., Govindjee J.* On the relation between the Kautsky effect (chlorophyll *a* fluorescence induction) and Photosystem II: Basics and applications of the OJIP fluorescence transient // J. Photochem. Photobiol. B. 2011. V. 104. P. 236. https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2010.12.010

18. *Андрющенко В.К., Саянова В.В., Жученко А.А.* Модификация метода определения пролина для выявления засухоустойчивых форм *Lycopersicon* Tourn // Изв. АН Молд. ССР. Сер. биол. и хим. наук. 1981. № 4. С. 55.

19. Методы технохимического контроля в виноделии / Под ред. В.Г. Гержиковой. Симферополь: Таврида, 2002. 259 с.

20. *Ермаков А.И.* Методы биохимического исследования растений. Ленинград: Колос, 1987. 456 с.

21. *Plazonic A., Bucar F., Males Z., Mornar A., Nigovi B., Kujundzij N.* Identification and quantification of flavonoids and phenolic acids in burr parsley (*Caucalis platycarpos* L.), using high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ionization mass spectrometry // Molecules. 2009. V. 14. № 7. P. 2466. https://doi.org/10.3390/molecules14072466

22. *Kalaji H., Govindjee, Goltsev V., Bosa K., Allakhverdiev S.I., Strasser R.* Experimental in vivo measurements of light emission in plants: A perspective dedicated to David Walker // Photosynth. Res. 2012. V. 114. P. 69. https://doi.org/10.1007/s11120-012-9780-3

23. *Goltsev V., Zaharieva I., Chernev P., Kouzmanova M., Kalaji H.M., Yordanov I., Krasteva V., Alexandrov V., Stefanov D., Allakhverdiev S.I., Strasser R.J.* Drought-induced modifications of photosynthetic electron transport in intact leaves: Analysis and use of neural networks as a tool for a rapid non-invasive estimation // Biochim. Biophys. Acta. 2012. V. 1817. № 8. P. 1490. https://doi.org/10.1016/j.bbabio.2012.04.018

24. *Yordanov I., Stefanov D., Krasteva V., Gourmanova M., Goltsev V.* Drought stress responses in plants – molecular biology, physiology and agronomical aspects // J. Agric. Sci. 2012. V. 4. P. 7.

25. *Ortega-Garcıa F., Peragon, J.* Phenol metabolism in the leaves of the olive tree (*Olea europaea* L.) cv. Picual, Verdial, Arbequina, and Frantoio during Ripening // J. Agric. Food Chem. 2010. V. 58. P. 12440. https://doi.org/10.1021/jf102827m

26. *Hashempour A., Ghasemnezhad M., Fottohi Ghazvini R., Sohani M.M.* The physiological and biochemical responses to freezing stress of olive plants treated with salicylic acid // Physiol. Plant. 2014. V. 61. P .476. https://doi.org/10.1134/S1021443714040098

27. *Губанова Т.Б., Браилко В.А., Палий А.Е.* Морозостойкость некоторых вечнозеленых видов семейств Oleaceae и Caprifoliaceae на Южном берегу Крыма // Бюллетень Никитского ботанического сада. 2017. Вып. 125. С. 103.

28. *Saibandith B., Spencer J.P., Rowland I.R., Commane D.M.* Olive polyphenols and the metabolic syndrome // Molecules. 2017. V. 22. P. 1082. https://doi.org/10.3390/molecules22071082

29. *Silva S., Gomes L., Leitao F., Coelho A.V., Boas L.V.* Phenolic compounds and antioxidant activity of *Olea europaea* L. fruits and leaves // Food Sci. Technol. Int. 2006. V. 12 P. 385. https://doi.org/10.1177/1082013206070166

30. *Karakaya S.N.* Olive tree (*Olea europaea*) leaves: potential beneficial effects on human health // Nutr. Rev. 2009. V. 67. P. 632. https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2009.00248.x