

**Paliy A.E. Changes in the polyphenoloxidase activity in the leaves of *Olea europaea* during the cold period on the Southern Coast of the Crimea** // Bull. of the State Nikita Botan. Gard. – 2020. – № 135. – P. 66-71.

Changes in the polyphenoloxidase activity in the leaves of four cultivars and one subspecies of *Olea europaea* L. were studied during the cold periods of 2016–2019 years on the Southern Coast of the Crimea. Nikitskaya cultivar was used as a model of high frost resistance, while Correggiolo cultivar and the subspecies *O. europaea* subsp. *cuspidata* were models of low frost resistance. It was found out that the polyphenoloxidase activity depends on weather conditions during a particular cold period and it almost independent of the degree of frost resistance of the studied genotypes.

**Keywords:** *Olea europaea* L.; leaves; polyphenoloxidase; activity; cold period on the Southern Coast of the Crimea

УДК 634.37:581.1:58.032.3

DOI: 10.36305/0513-1634-2020-135-71-77

## **ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ ВИДОВ И СОРТОВ *FICUS* В УСЛОВИЯХ ОБЕЗВОЖИВАНИЯ НА ЮЖНОМ БЕРЕГУ КРЫМА**

**Оксана Анатольевна Гребенникова, Татьяна Борисовна Губанова**

Никитский ботанический сад – Национальный научный центр РАН  
298648, Республика Крым, г. Ялта, пгт Никита, Никитский спуск, 52  
E-mail: oksanagrebennikova@yandex.ru

Представлены результаты исследований содержания пролина, активности пероксидазы, каталазы, полифенолоксидазы и параметров индукции флуоресценции хлорофилла (ИФХ) в листьях видов и сортов *Ficus* в условиях контролируемого обезвоживания. Показано, что параметрами ИФХ, наиболее чувствительными к недостатку водообеспеченности являются характеристики быстрой фазы флуоресценции хлорофилла. Содержание пролина, активность пероксидазы и полифенолоксидазы могут использоваться для дополнительной диагностики устойчивости растений рода *Ficus* к воздействию засухи. Относительно засухоустойчивыми являются сорта Сабруция Розовая, Сары Стамбульский и вид *F. palmata*.

**Ключевые слова:** *Ficus* L.; водный дефицит; контролируемое обезвоживание; пролин; активность ферментов; индукция флуоресценции хлорофилла

### **Введение**

Род *Ficus* L., относящийся к семейству Moraceae Link, насчитывает более 1000 видов. В качестве плодовых растений, культивируемых в Никитском ботаническом саду, представляют интерес виды *Ficus carica* L., *Ficus palmata* Forsk., *Ficus virgata* Roxb.. Наиболее популярной культурой является инжир (*Ficus carica* L.), отличающийся регулярным плодоношением, ранним и продолжительным созреванием плодов, обладающих приятным вкусом, высокой калорийностью и диетическими свойствами [7]. Условия Южного берега Крыма благоприятны для возделывания растений рода *Ficus*, однако высокая вероятность наступления засухи в летний период может отрицательно сказаться на жизнедеятельности и урожайности этой культуры [6], поэтому изучение механизмов адаптации к водному дефициту является актуальным. Известно, что действие на растение стрессовых факторов сопровождается интенсификацией процессов окисления и образованием активных форм кислорода (АФК). Для защиты от окислительного повреждения в растениях существует антиоксидантная система, включающая как специфические окислительно-восстановительные ферменты (каталазу, супероксиддисмутазу и различные оксидазы, в том числе пероксидазу и полифенолоксидазу), так и низкомолекулярные небелковые антиоксиданты (фенольные соединения, аскорбиновую кислоту, пролин и др.) [11, 15]. Уровень антиоксидантной

защиты и способность быстро реагировать на экстремальные условия определяют устойчивость растений к стрессу [14]. Поэтому изучение активности окислительно-восстановительных ферментов и содержания низкомолекулярных протекторных соединений важно для выявления механизмов адаптации растения к стрессовым условиям. При этом развитие стресса, вызванного водным дефицитом, достаточно быстро отражается на течении первичных процессов фотосинтеза и проявляется в изменении параметров ИФХ. Исследование характера кривой 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 [10].

В связи с этим, цель наших исследований заключалась в выявлении содержания пролина, активности окислительно-восстановительных ферментов и особенностей работы фотосинтетического аппарата в листьях некоторых видов и сортов рода *Ficus* в условиях контролируемого обезвоживания.

### Объекты и методы

В качестве объектов исследований были выбраны листопадные виды рода *Ficus*: *Ficus carica* L., *Ficus palmata* Forsk., *Ficus virgata* Roxb., произрастающие на коллекционных участках Никитского ботанического сада. Вид *F. carica* L. был представлен 4 сортами: Крымский Черный, Сары Стамбульский, Сабруция Розовая и Опылитель Никитский (каприфига).

Физиолого-биохимические параметры в листьях определяли в состоянии полного насыщения (контроль), после 3 часов увядания (потеря воды 20-25%) (опыт), а также после восстановления водообеспеченности тканей листа. Характеристики ИФХ измеряли с помощью портативного хронофлуориметра Floratest (Украина, 2010), анализировали следующие показатели фотоиндукции флуоресценции [13]:  $F_0$  – базовый уровень;  $F_{pl}$  – уровень флуоресценции в момент её временного замедления;  $F_m$  – максимальное значение флуоресценции;  $F_{st}$  – стационарный уровень. Рассчитывали следующие параметры флуоресценции [4]:  $F_v/F_{st}$  – эффективность квантового выхода фотосинтеза (индекс жизнеспособности);  $F_v/F_m$  – эффективность световой фазы фотосинтеза;  $F_m/F_0$  – характеристика стрессового состояния растения (в норме 4-5);  $(F_{pl}-F_0)/F_v$  – соотношение реакционных центров с невозстановленным акцептором в ФС 2 с количеством активного хлорофилла. Определение содержания пролина проводили по модифицированной методике Чинарда с использованием нингидринового реактива [1]. Активность пероксидазы определяли спектрофотометрически по скорости реакции окисления бензидина, полифенолоксидазы – в присутствии пирокатехина и п-фенилендиамина [3], каталазы – титриметрическим методом [2]. Эксперименты проводили в трехкратной повторности. Для статистической обработки использовали программы MS Excel 2007. Достоверность различий между вариантами рассчитывали по t-критерию Стьюдента при 5% уровне значимости. В таблицах представлены средние значения определений и их стандартные ошибки.

### Результаты и обсуждение

В состоянии полного насыщения (контроль) в листьях изучаемых генотипов максимальным содержанием пролина отличался сорт Опылитель Никитский (293 мкг/г), а минимальным – вид *F. virgata* (192 мкг/г) (табл. 1). Изменение концентрации пролина в листьях сортов и видов рода *Ficus* после увядания показало, что ее выраженное возрастание происходило у чувствительного к засухе вида *F. palmata*. У сортов вида *F. carica* и вида *F. virgata* содержание пролина менялось незначительно, за

исключением сорта Сары Стамбульский (возросло на 25 %). В процессе восстановления тургесцентности наблюдалось снижение содержания данной аминокислоты у большинства изучаемых генотипов. Исключение составил вид *F. virgata*, у которого уровень пролина в тканях листа после снятия стрессового воздействия практически не изменился. Поскольку известно, что пролин обладает антиоксидантным действием [5], то снижение его концентрации в процессе восстановления тургора можно объяснить участием данного вещества в регуляции процессов образования АФК, вызванного развитием стрессового состояния. Что же касается отсутствия значительных изменений у вида *F. virgata*, то это, вероятно, свидетельствует о высокой чувствительности данного вида к недостаточному водообеспечению и дальнейшем развитии стресса.

В состоянии полного насыщения в листьях изучаемых генотипов максимальная активность пероксидазы отмечалась у сортов Крымский Черный и Опылитель Никитский (0,219 и 0,215 усл.ед./г·с), а минимальная – у вида *F. virgata* (0,025 усл.ед./г·с). После увядания в листьях большинства генотипов активность пероксидазы увеличилась под действием стресс-фактора, за исключением сорта Опылитель Никитский. Поскольку известно, что устойчивость растения к стрессу определяется скоростью включения защитных механизмов, в частности увеличением активности данного фермента [14], можно предположить низкую адаптационную способность сорта Опылитель Никитский к засухе. При восстановлении тургора тканей, вероятно, в связи с устранением стрессового фактора, активность фермента в листьях всех генотипов упала до минимальных значений.

Таблица 1

**Биохимические параметры листьев листопадных видов рода *Ficus* в различных условиях водообеспеченности**

	Опылитель Никитский	Крымский Черный	Сары Стам- бульский	Сабруция Розовая	<i>F. virgata</i>	<i>F. palmata</i>
Содержание пролина, мкг/г						
Н	293±9	218±7	250±8	219±7	192±6	216±6
У	269±8	258±8	312±9	235±7	216±6	316±9
В	208±6	142±4	146±4	139±4	204±6	154±5
Активность пероксидазы, усл.ед./г·с						
Н	0,215±0,006	0,219±0,007	0,050±0,001	0,052±0,002	0,025±0,001	0,084±0,003
У	0,161±0,005	0,291±0,009	0,150±0,004	0,144±0,004	0,122±0,004	0,209±0,006
В	0,038±0,002	0,104±0,004	0,017±0,001	0,018±0,001	0,010±0,001	0,031±0,002
Активность каталазы, мл O <sub>2</sub> /г·мин						
Н	84,4±2,5	85,5±2,6	85,2±2,5	84,6±2,5	86,1±2,6	86,0±2,6
У	86,6±2,6	68,6±2,1	82,6±2,5	81,5±2,4	85,4±2,6	81,0±2,4
В	108,2±3,2	77,9±2,3	82,0±2,4	75,1±2,2	102,8±3,1	94,9±2,8
Активность полифенолоксидазы, усл.ед./г·с						
Н	0,224±0,007	0,158±0,005	0,115±0,003	0,112±0,003	0,149±0,004	0,195±0,006
У	0,298±0,009	0,201±0,006	0,124±0,004	0,121±0,004	0,152±0,005	0,216±0,007
В	0,199±0,006	0,162±0,005	0,169±0,005	0,136±0,004	0,132±0,003	0,183±0,005

Примечание: Н – полное насыщение, У – увядание, В – восстановление водообеспеченности

При полном насыщении активность каталазы в листьях изучаемых генотипов составляла 84,4-86,1 мл O<sub>2</sub>/г·мин, что констатирует отсутствие видовых и сортовых отличий по этому показателю. В результате обезвоживания в листьях большинства генотипов активность каталазы достоверно не изменилась, за исключением сорта

Крымский Черный, где деятельность фермента уменьшилась на 20 %. При восстановлении тургора тканей активность каталазы незначительно увеличивалась в листьях большинства генотипов, не изменяясь у сорта Сары Стамбульский и уменьшаясь у сорта Сабруция Розовая. Отсутствие связи между активностью данного фермента и водообеспеченностью тканей листа можно объяснить реализацией защитных механизмов данной культуры к засухе с помощью других компонентов антиоксидантной системы, в частности активностью пероксидазы.

В состоянии полного насыщения в листьях изучаемых генотипов максимальной активностью полифенолоксидазы выделялся сорт Опылитель Никитский (0,224 усл.ед./г·с), а минимальной – сорта Сабруция Розовая и Сары Стамбульский (0,112 и 0,115 усл.ед./г·с). После увядания в листьях сортов и видов рода *Ficus* активность данного фермента увеличилась. В листьях вида *F. virgata* увеличение активности фермента было минимальным – в пределах ошибки определения. В листьях сортов Сабруция Розовая и Сары Стамбульский и вида *F. palmata* активность полифенолоксидазы увеличилась незначительно (на 8-11 %), тогда как у сортов Крымский Черный и Опылитель Никитский – более существенно (на 27 и 33 %). При восстановлении тургора полифенолоксидазная активность снижалась у большинства генотипов, за исключением сортов Сабруция Розовая и Сары Стамбульский.

Таким образом, установлено, что потеря воды листьями листопадных видов рода *Ficus* приводит к увеличению содержания пролина и повышению пероксидазной и полифенолоксидазной активности. После восстановления тургесцентности происходит снижение содержания пролина и активности оксидаз, что свидетельствует об участии данных ферментов и аминокислоты в ответных реакциях растений рода *Ficus* на водный дефицит. Отличия в динамике изменения содержания пролина и активности ферментов под влиянием обезвоживания для разных генотипов связаны как с погодными условиями летнего сезона 2019 г, так и с различной степенью засухоустойчивости.

Анализ параметров флуоресценции листьев некоторых листопадных видов рода *Ficus* в состоянии полного насыщения (контроль), показал, что вид *F. virgata* наиболее значительно отличался по основным характеристикам ИФХ (табл. 2). У этого вида наблюдалось максимальное значение базовой флуоресценции, что свидетельствует о менее эффективной передаче энергии возбуждения от ССКП к реакционным центрам ФС 2, по сравнению с генотипами других видов. Кроме того, у вида *F. virgata* выявлены пониженные значения вариабельной флуоресценции, а также параметров Fv/Fst и Fv/Fm, определяющих квантовый выход фотосинтеза и потенциальную квантовую эффективность ФС 2.

Наличие стрессового состояния у данного вида, даже в условиях отсутствия водного дефицита в тканях листа подтверждается низким значением соотношения максимальной и базовой флуоресценции [8, 9]. Причины такого явления могут заключаться как в неблагоприятных погодных условиях текущего вегетационного периода, так и в длительном несоответствии климатических условий зоны интродукции биологическим потребностям вида. В результате экспериментов по контролируемому обезвоживанию, до уровня водного дефицита близкого к сублетальному, установлено, что развитие водного стресса сопровождается изменением параметров быстрой фазы флуоресценции. В частности, у сортов Сабруция Розовая, Опылитель Никитский, Крымский Черный и вида *F. palmata* наблюдалось снижение базовой флуоресценции на 12-20%, что может свидетельствовать об уменьшении количества хлорофилла в реакционных центрах ФС 2. В тоже время у сорта Сары Стамбульский и вида *F. virgata* было отмечено слабое возрастания F<sub>0</sub>, связанное со снижением эффективности передачи энергии между молекулами в ССКП. Уровень максимальной и вариабельной

флуоресценции снизился практически у всех сортов *F. carica*, что наиболее выражено у неустойчивого к обезвоживанию сорта Опылитель Никитский. Такое значительное изменение этих параметров говорит о высокой чувствительности фотосинтетического аппарата данного сорта к недостатку воды. Необходимо отметить, что эффективность квантового выхода фотосинтеза существенно снизилась у листьев сортов *F. carica* в состоянии водного стресса.

В условиях восстановления водоснабжения нарушения в работе фотосинтетического аппарата, вызванные обезвоживанием, проявились наиболее ярко. В частности, отмечено возрастание уровня базовой флуоресценции у всех изучаемых генотипов (у чувствительного к засухе сорта Опылитель Никитский  $F_0$  увеличилось на 127 %).

Таблица 2

**Параметры ИФХ листьев генотипов рода *Ficus* в условия развития водного стресса**

Генотип	$F_0$	$F_{pl}$	$F_m$	$F_{st}$	$F_v$	$F_v/F_{st}$	$F_v/F_m$	$F_m/F_0$	$(F_{pl}-F_0)/F_v$
<i>F. carica</i>	контроль								
Сабруция Розовая	496±18	1040±37	1880±41	584±14	1384	2,34	0,73	3,79	0,39
Опылитель Никитский	344±14	720±23	1784±34	568±21	1440	2,53	0,81	5,19	0,26
Крымский Черный	520±21	984±31	1784±42	680±23	1264	1,86	0,71	3,43	0,37
Сары Стамбульский	400±15	648±21	1552±44	488±17	1152	2,36	0,74	3,88	0,21
<i>F. virgata</i>	624±23	912±28	1600±39	816±15	976	1,20	0,61	2,56	0,29
<i>F. palmata</i>	496±19	984±26	1760±47	608±18	1264	2,07	0,71	3,54	0,39
<i>F. carica</i>	Опыт 3 часа								
Сабруция Розовая	440±16	896±22	1488 ±47	688±14	1048	1,52	0,70	3,38	0,43
Опылитель Никитский	280±12	448±21	1128 ±34	464±16	848	1,83	0,75	4,03	0,20
Крымский Черный	416±17	784±35	1496 ±29	656±17	1080	1,64	0,73	3,60	0,33
Сары Стамбульский	448±15	960±33	1760 ±46	816±21	1312	1,61	0,76	3,93	0,39
<i>F. virgata</i>	712±23	927±38	1424 ±47	616±16	712	1,16	0,50	2,00	0,30
<i>F. palmata</i>	424±18	872±29	1672 ±49	728±17	1248	1,71	0,75	3,94	0,35
<i>F. carica</i>	Восстановление тургесцентности								
Сабруция Розовая	592±21	768±31	1184±21	424±11	592	1,40	0,50	2,0	0,23
Опылитель Никитский	784±23	944±25	1024±24	784±12	240	0,31	0,23	1,31	0,67
Крымский Черный	976±16	1288±17	1424±31	440±14	448	1,02	0,31	1,45	0,69
Сары Стамбульский	808±19	1000±23	1352±32	448±16	544	1,21	0,40	1,67	0,35
<i>F. virgata</i>	926±18	1112±41	1312±26	472±16	386	0,82	0,29	1,42	0,48
<i>F. palmata</i>	592±15	704±18	952±19	448±11	360	0,80	0,32	1,61	0,31

Особое внимание необходимо обратить на изменения уровня флуоресценции в момент ее временного замедления, поскольку он связан функционированием акцепторов и доноров электронного транспорта в ФС 2 и эффективностью взаимодействия между фотосинтетическими единицами, определяющими возможность переноса энергии возбуждения между соседними реакционными центрами [12]. Причем такая реакция оказалась характерной для всех изучаемых видов рода *Ficus*. Также, в процессе восстановления водоснабжения наблюдалось дальнейшее снижение параметров  $F_v/F_m$  и  $(F_{p1}-F_0)/F_v$  характеризующих количество хлорофилла, не принимающего участие в фотосинтезе и соотношения доли реакционных центров с невозстановленным акцептором с количеством активного хлорофилла. Такая картина свидетельствует о начале необратимых нарушений в работе ФС 2, вероятно, связанных с разрушением структуры тилакоидов. Необходимо отметить, что в указанных условиях эксперимента индекс жизнеспособности на границе витальной нормы был отмечен у сортов Сабруция Розовая и Сары Стамбульский и вида *F. palmata*, что свидетельствует о засухоустойчивости данных генотипов.

### Выводы

Установлено, что потеря воды листьями листопадных видов рода *Ficus* приводит к увеличению содержания пролина, повышению пероксидазной и полифенолоксидазной активности и вызывает нарушения различной интенсивности в протекании первичных процессов фотосинтеза.

Полученные результаты указывают на вовлечение пролина, пероксидазы и полифенолоксидазы в ответные реакции видов рода *Ficus* на водный дефицит, что позволяет использовать данные показатели для дополнительной диагностики их устойчивости к воздействию засухи.

Показано, что параметрами ИФХ, наиболее чувствительными к недостатку водообеспеченности являются характеристики быстрой фазы флуоресценции хлорофилла: нарушались процессы реокисления  $Q_A^-$  от  $Q_B$  и возрастали энергетические потери при передаче энергии от антенн к реакционным центрам.

Выявлено, что нарушения в протекании первичных процессов фотосинтеза, вызванные обезвоживанием, у листопадных видов рода *Ficus*, наиболее ярко проявляются после восстановления тургесцентности тканей листа.

После восстановления тургесцентности тканей листа индекс жизнеспособности в пределах витальной нормы отмечен у двух сортов *F. carica* – Сабруция Розовая, Сары Стамбульский и вида *F. palmata*, что свидетельствует об их относительной засухоустойчивости.

### Благодарности

Исследования выполнены на оборудовании ЦКП «Физиолого-биохимические исследования растительных объектов» (ФБИ РО) ФГБУН "НБС-ННЦ" (Ялта, Россия).

### Список литературы

1. Андриющенко В.К., Саянова В.В., Жученко А.А. Модификация метода определения пролина для выявления засухоустойчивых форм *Lycopersicon Tourn* // Изв. АН МССР. – 1981. – № 4. – С. 55-60.
2. Воскресенская О.Л., Алябьева Е.А., Половникова М.Г. Большой практикум по биоэкологии. Ч. 1: учеб. пособие. – Йошкар-Ола, 2006. – 107 с.
3. Ермаков А.И. Методы биохимического исследования растений. – Л.: Агропромиздат, 1987. – С. 43-44.

4. Гольцев В.Н., Каладжи М.Х., Кузманова М.А., Аллавердиев С.И. Переменная и замедленная флуоресценция хлорофилла а – теоретические основы и практическое приложение в исследовании растений. – М.: Ижевск: Институт компьютерных исследований, 2014. – 220 с.
5. Колупаев Ю.Е., Вайнер А.А., Ястреб Т.О. Проллин: физиологические функции и регуляция содержания в растениях в стрессовых условиях // Вісн. Харків. нац. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія. – 2014. – Вип. 2 (32). – С. 6-22.
6. Плугатарь Ю.В., Корсакова С.П., Ильницкий О.А. Экологический мониторинг Южного берега Крыма. – Симферополь: ИТ Ариал, 2015. – 161 с.
7. Чернобай И.Г., Шишкина Е.Л., Литвинова Т.В. Формирование сортимента субтропических культур (*Ficus carica* L., *Zizyphus jujuba* Mill.) для южных регионов России // Сборник научных трудов Государственного Никитского ботанического сада. – 2017. – Т 144. – С. 243-247.
8. Hansatech An introduction to fluorescence measurements with the plant efficiency analyser (PEA). Hansatech Instruments Ltd. (1996) <http://www.hansatech-instruments.co.uk>.
9. Hansatech Chlorophyll Fluorescence Training Manual. Hansatech Instruments Ltd. (2000) <http://www.hansatech-instruments.co.uk>.
10. Lazar D. Chlorophyll a fluorescence induction // Biochim. Biophys. Acta. – 1999. – Vol. 1412. – P. 1-28.
11. Mittler R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance // Trends Plant Sci. – 2002. – Vol. 7. – P. 405-410.
12. Murkowski A. Oddziaływanie czynników stresowych na luminescencję chlorofilów aparacie fotosyntetycznym roślin uprawnych // Monografia – Instytut Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego PAN, Lublin, 2002. – 61 p.
13. Romanov V.A., Galelyuka I.B., Sarakhan Ie.V. Portable fluorometer Floratest and specifics of its application // Sensor Electronics and Microsystem Technol, 2010. – Vol. 1 (7), № 3. – P. 39-44.
14. Suzuki N, Mittler R. Reactive oxygen species and temperature stresses: A delicate balance between signaling and destruction // Physiol. Plant. – 2006. – Vol. 126. – P. 45-51.
15. Yadav N., Sharma S. Reactive oxygen species, oxidative stress and ROS scavenging system in plants // J. Chem. Pharm. Res. – 2016. – Vol. 8(5). – P. 595-604.

Статья поступила в редакцию 14.02.2020 г.

**Grebennikova O.A., Gubanova T.B. Physiological and biochemical parameters of *Ficus* species and cultivars under dehydration conditions on the Southern coast of the Crimea** // Bull. of the State Nikita Botan. Gard. – 2020. – № 135. – P. 71-77.

The results of the studies of proline content, peroxidase, catalase, polyphenol oxidase activity and chlorophyll fluorescence induction (ChFI) parameters in leaves of *Ficus* species and cultivars under controlled dehydration conditions are presented. It was shown that the ChFI parameters, the most sensitive to the lack of water availability, are the characteristics of the chlorophyll fluorescence fast phase. Proline content, peroxidase and polyphenol oxidase activity can be used to addition diagnose of drought resistance of the plants of the genus *Ficus*. The cultivars Sabrutsiya Rozovaya, Sary Stambulskij and the species *F. palmata* are relatively drought tolerant.

**Keywords:** *Ficus* L.; water deficiency; controlled dehydration; proline; enzyme activity; chlorophyll fluorescence induction