

УДК 634.63:631.526.3:547.56:58.036.5

ИЗМЕНЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ В ЛИСТЬЯХ СОРТОВ *OLEA EUROPAEA* L. С РАЗЛИЧНОЙ СТЕПЕНЬЮ МОРОЗОСТОЙКОСТИ

Палий А. Е., Палий И. Н., Старцева О. В.

*ФГБУН «Никитский ботанический сад – Национальный научный центр», Ялта,
Республика Крым, Россия
E-mail: onlabor@yandex.ru*

Изучено изменение содержания суммы фенольных соединений, лютеолин-7-О-глюкозида и рутина в листьях двух сортов *Olea europaea* L. в холодный период на Южном берегу Крыма. Содержание суммы фенольных соединений в листьях маслины колебалось в пределах 684–1103 мг/100 г, лютеолин-7-О-глюкозида – 8,1–211,4 мг/100 г, рутина – 0,4–1,5 мг/100 г. Установлено, что устойчивость сортов маслины к воздействию отрицательных температур зависит от степени накопления лютеолин-7-О-глюкозида и рутина, и не зависит от изменения концентрации суммы фенольных соединений.

Ключевые слова: маслина европейская, листья, фенольные соединения, лютеолин-7-О-глюкозид, рутин, низкотемпературный стресс.

ВВЕДЕНИЕ

Маслина европейская (*Olea europaea* L.) – одно из древнейших культурных растений на Земле, относится к семейству маслиновых (Oleaceae Lindl.). Она засухоустойчива, не требовательна к почвам, редко поражается болезнями и вредителями. Однако температуры ниже –15 °С являются критическими для маслины [1]. Плоды и масло маслины – важные компоненты в ежедневном рационе значительной части населения планеты. Помимо пищевой ценности большое значение имеют препараты из листьев, коры и плодов, проявляющие широкий спектр фармакологического действия. Биологически активные вещества, входящие в состав препаратов, проявляют сильное антиоксидантное, противоопухолевое и антимикробное действие, снижают артериальное давление, уровень сахара в крови, помогают при аритмии [2, 3].

Основными биологически активными веществами листьев маслины являются фенольные соединения и тритерпены. Фенольные соединения представлены фенилпропаноидами (гидрокситирозол, тирозол, кофейная кислота и др.), секоиридоидами (олеуропеин и лигустрозид) и флавоноидами (гликозиды лютеолина, кверцетина и апигенина) [4–7].

Фенольные соединения, обладающие высокой биологической активностью, характеризуются широким разнообразием функций, выполняемых ими в растительном организме, в частности, участием в процессах регуляции роста и ферментативной защиты растения от окислительного стресса [8]. Испанскими

учеными показана роль олеуропеина и его предшественников гидрокситирозола и тирозола в формировании устойчивости некоторых сортов маслины к низкотемпературному стрессу [9, 10], однако информация об участии других фенольных веществ, в частности флавоноидов отсутствует.

Южный берег Крыма (ЮБК) является северной границей культурного ареала маслины, здесь она хорошо плодоносит, но в отдельные годы температурные колебания зимнего периода могут вызывать значительные повреждения, особенно у интродукционных сортов. Определение роли фенольных соединений в низкотемпературной устойчивости сортов маслины европейской актуально, так как у этого вида на ЮБК при определенных погодных условиях происходит активизация ростовых процессов в осенний период.

Целью настоящего исследования являлось выявление особенностей накопления фенольных соединений в листьях сортов маслины европейской с различной степенью морозостойкости в холодный период на Южном берегу Крыма.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования служили следующие сорта *Olea europaea* L.: морозостойкий – ‘Никитская’ (селекции Никитского ботанического сада) и слабоморозостойкий – ‘Раццо’ (интродуцент средиземноморского происхождения). Растения произрастали на коллекционных участках Никитского ботанического сада (пгт Никита, г. Ялта, Республика Крым). Для анализа ежемесячно отбирали однолетние листья со средней части побегов в холодный период с октября 2017 г. по март 2018 г.

Для определения фенольных соединений были приготовлены экстракты из свежесобранного растительного сырья. Экстракцию проводили этиловым спиртом (при соотношении сырья и экстрагента – 1 : 10) настаиванием в течение 10 суток при комнатной температуре. Степень измельчения сырья 1 мм.

Содержание суммы фенольных веществ определяли на спектрофотометре Evolution 220 UV/VIS фирмы Thermo Scientific по методу Фолина-Чиокальтео, в пересчете на галловую кислоту (Sigma-Aldrich) [11], содержание сухих веществ термогравиметрическим методом [12].

Компонентный состав фенольных соединений определяли на хроматографе Ultimate 3000 Dionex Thermo Scientific, укомплектованном 4-канальным градиентным насосом LPG-3400SD, со встроенным дегазатором, автоматическим инжектором WPS-3000SL, термостатом колонок TCC-3000SD, диодноматричным детектором DAD-3000. Для проведения анализа была использована аналитическая хроматографическая колонка Eclipse Plus C18, 4.6 на 250 мм, размер частиц 5 мкм. Применяли градиентный режим элюирования. Подвижная фаза В – ацетонитрил, С – 0,1 % раствор муравьиной кислоты в деионизированной воде: 0–5 мин 5 % В, 5–35 мин – подъем от 5 до 30 % В, 35–40 мин подъем от 30 до 90 % В, 40–41 мин подъем до 100 % В, 41–46 мин – 100% В, 46–51 мин снижение от 100 % В до 5 % В, 51–55 мин 5 % В. Скорость потока 0,7 мл / мин. Температура термостата колонок 400 С. 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-О-глюкозид и рутин (Sigma-Aldrich).

Для обеспечения однородности результатов концентрации суммы фенольных соединений и отдельных компонентов рассчитывали в пересчете на сырой вес. Повторность опытов 3-кратная. Результаты исследований обрабатывали стандартными методами математической статистики [13].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Погодные условия холодного периода с октября 2017 г. по март 2018 г. по данным агрометеостанции «Никитский сад» характеризовались сменами волн тепла и холода, немного превышали среднемноголетнюю норму и за последние десятилетия являлись достаточно типичными для ЮБК. В октябре наблюдалась относительно теплая погода, средняя температура воздуха была выше нормы на 0,5 °С. Сумма осадков на 110 % превышала норму. Погода ноября была переменчивой, с волнами тепла и холода. К концу месяца на поверхности почвы наблюдались первые заморозки до -4 °С. Среднемесячная температура находилась в пределах нормы. Осадки выпадали регулярно в течение месяца. В декабре погода была теплой, на 3,0 °С превышала многолетнюю среднемесячную температуру. Во второй декаде декабря минимальная температура воздуха опускалась до 0,1 °С (на поверхности почвы до -3,9 °С). Осадков выпало на 7 % ниже нормы. Январь и февраль характеризовались относительно теплой с обильными осадками погодой. Среднемесячные температуры превышали норму на 1,5 °С в январе и на 1,6 °С в феврале. До минимальных значений (-3,0 °С) температура воздуха опускалась в конце каждого месяца. Погода марта была неустойчивой, умеренно-теплой и дождливой. Средняя температура воздуха была выше нормы на 1,6 °С, сумма осадков составляла 156 % от нормы. В первой декаде месяца минимальная температура воздуха опускалась до -3,4 °С, на поверхности почвы до -7 °С.

В результате проведенных исследований установлено, что в листьях изучаемых сортов маслины в холодный период 2017–2018 гг. содержание суммы фенольных соединений колебалось в пределах 684–1103 мг/100 г (табл. 1). До первого понижения температуры воздуха до отрицательных значений (конец ноября) более высокий уровень суммы фенольных соединений наблюдался у сорта Никитская. В декабре происходило снижение содержания у сорта Никитская на 13,6 %, у сорта Раццо – на 7,7 %. С января месяца и до конца холодного периода концентрация фенольных соединений все время возрастала, причем более равномерно у сорта Никитская. Таким образом, наступление первых заморозков сопровождается снижением содержания фенольных соединений в листьях маслины. Последующее постепенное понижение температуры окружающей среды приводит к увеличению концентрации фенольных веществ независимо от степени их устойчивости к отрицательным температурам. Подобную картину мы наблюдали в исследованиях предыдущих лет [14].

Таблица 1
Содержание суммы фенольных соединений и отдельных компонентов в
листьях маслины европейской

Сорт	Месяц	Сухое вещество, %	Сумма фенольных соединений	Лютеолин-7-О-гликозид	Рутин
‘Никитская’	октябрь	48,0	932±23	12,5±1,2	0,40±0,04
	ноябрь	50,8	815±25	15,8±1,5	1,30±0,13
	декабрь	52,5	710±17	65,2±6,5	1,10±0,11
	январь	46,6	854±20	47,9±4,8	0,70±0,07
	февраль	47,6	955±23	8,1±0,8	0,40±0,04
	март	43,6	1012±30	18,7±1,8	0,50±0,05
‘Раццо’	октябрь	48,7	1008±26	55,8±5,5	0,30±0,03
	ноябрь	50,3	751±18	50,9±5,0	1,40±0,14
	декабрь	53,0	702±17	135,0±13,5	1,00±0,10
	январь	46,2	795±15	211,4±21,0	1,50±0,14
	февраль	49,0	798±21	87,9±8,7	1,10±0,11
	март	47,4	1103±28	39,5±3,9	0,80±0,08

При помощи метода высокоэффективной жидкостной хроматографии проведено исследование компонентного состава фенольных соединений этанольных экстрактов листьев двух сортов маслины. В экстрактах идентифицированы флавоноиды: лютеолин-7-О-гликозид и рутин (рис. 1). Лютеолин-7-О-гликозид являлся одним из основных фенольных компонентов листьев изучаемых сортов маслины. За весь период исследований концентрация лютеолин-7-О-гликозида колебалась в пределах 8,1–211,4 мг/100 г. Содержание лютеолин-7-О-гликозида в листьях сорта Раццо было значительно выше, чем у сорта Никитская. Самые низкие концентрации этого соединения наблюдались в осенние месяцы, затем в декабре, после снижения температуры воздуха до отрицательных значений, происходило резкое увеличение содержания лютеолин-7-О-гликозида у обоих сортов: в 2,5 раза у сорта Раццо и в 4 раза у сорта Никитская. В январе у морозостойкого сорта концентрация падала, а у слабоморозостойкого сорта продолжала расти более чем на 50 %. В феврале на фоне длительного воздействия низкотемпературного стресса концентрация лютеолин-7-О-гликозида в несколько раз снижалась у обоих сортов. В марте, по окончании холодного периода, у слабоморозостойкого сорта происходило дальнейшее снижение концентрации данного флавоноида, а у морозостойкого, наоборот – повышение.

Содержание рутина в листьях двух сортов маслины колебалось в пределах 0,4–1,5 мг/100 г. Значительное возрастание концентрации происходило в ноябре месяце, затем ее уровень снижался, как у сорта Никитская, так и у сорта Раццо. В январе у морозостойкого сорта содержание рутина продолжало снижаться, а у слабоморозостойкого возрастало. В феврале концентрация падала уже у обоих сортов, а в марте – росла у сорта Никитская и снижалась еще больше у сорта Раццо.

Известно, что флавоноиды, выполняя роль антиоксидантов, участвуют в адаптации растений к неблагоприятным условиям окружающей среды [8]. Неоднородность динамики накопления отдельных флавоноидных гликозидов в листьях двух сортов маслины с различной морозостойкостью в холодный период на Южном берегу Крыма свидетельствует о связи концентрации данных веществ с формированием устойчивости растений маслины к воздействию низких и отрицательных температур.

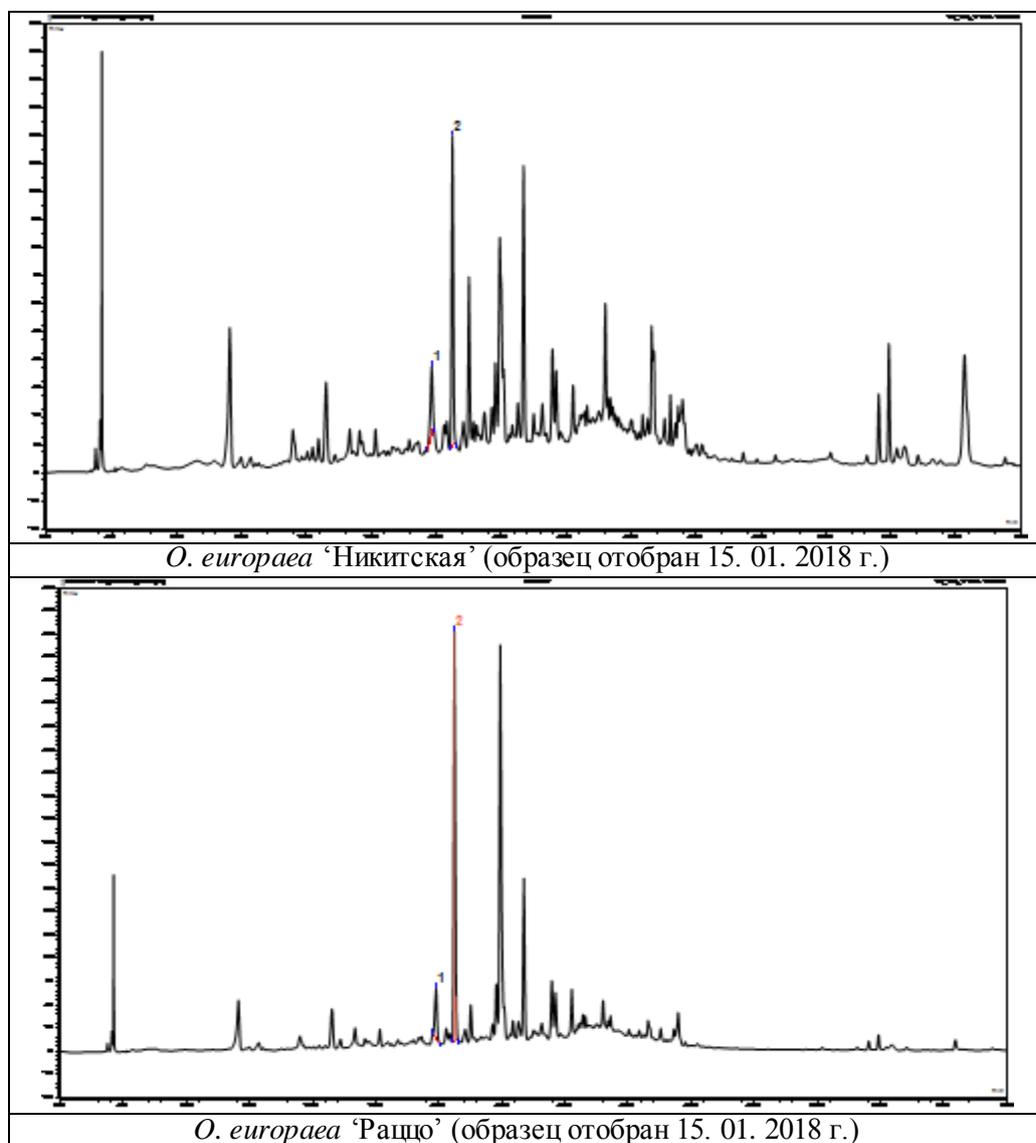


Рис.1 Хроматограммы этанольных экстрактов из листьев *O. europaea* при 280 нм. 1 – рутин, 2 – лютеолин-7-О-гликозид

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При исследовании изменений содержания суммы фенольных соединений, лютеолин-7-О-гликозида и рутина в листьях двух сортов маслины европейской в холодный период на Южном берегу Крыма установлено, что устойчивость сортов маслины к воздействию низких и отрицательных температур зависит от степени накопления лютеолин-7-О-гликозида и рутина, и не зависит от изменения содержания суммы фенольных соединений.

Список литературы

1. Larcher W. Temperature stress and survival ability of Mediterranean sclerophyllous plants / W. Larcher // Plant Biosystems. – 2000. – Vol. 134. – P. 279–295.
2. El S. N. Olive tree (*Olea europaea*) leaves: potential beneficial effects on human health / S. N. El, S. Karakaya // Nutrition Reviews. – 2009. – Vol. 67, No 11. – P. 632–638.
3. Lockyer S. Olive leaf phenolics and cardiovascular risk reduction: Physiological effects and mechanisms of action / S. Lockyer, P. Yaqoob, J. P. E. Spencer, I. Rowland // Nutrition and Aging. – 2012. – Vol. 1. – P. 125–140.
4. Moudache M. Phenolic content and antioxidant activity of olive by-products and antioxidant film containing olive leaf extract / M. Moudache, M. Colon, C. Nerin, F. Zaidia // Food Chemistry. – 2016. – Vol. 212. – P. 521–527.
5. Pu-Jun X. Phenolic compositions, and antioxidant performance of olive leaf and fruit (*Olea europaea* L.) extracts and their structure–activity relationships / X. Pu-Jun, H. Li-Xin, Zh. Cai-Hong, Zh. Yao-Lei // Journal of Functional Foods. – 2015. – Vol. 16. – 460–471.
6. Saibandith B. Olive Polyphenols and the Metabolic Syndrome / B. Saibandith, J. P. Spencer, I. R. Rowland, D. M. Commane // Molecules. – 2017. – Vol. 22, No 7. – P. 1082.
7. Talhaoui N., Taamalli A., Gómez-Caravaca A. M., Fernández-Gutiérrez A., Segura-Carretero A. Phenolic compounds in olive leaves: Analytical determination, biotic and abiotic influence, and health benefits // Food Research International. – 2015. – Vol. 77, No 2. – P. 92–108.
8. Запрометов М. Н. Фенольные соединения: распространение, метаболизм и функции в растениях / М. Н. Запрометов, – М.: Наука, 1993. – 272 с.
9. Ortega-Garcia F. The response of phenylalanine ammonia-lyase, polyphenol oxidase and phenols to cold stress in the olive tree (*Olea europaea* L. cv. Picual). / F. Ortega-Garcia, J. Peragon // Journal Agricultural and Food Chemistry. – 2009. – Vol. 89. – 1565–1573.
10. Ortega-Garcia F. Phenol metabolism in the leaves of the olive tree (*Olea europaea* L.) cv. Picual, Verdial, Arbequina, and Frantoio during ripening / F. Ortega-Garcia, J. Peragon // Journal Agricultural and Food Chemistry. – 2010. – Vol. 58. – 12440–12448.
11. Гержикова В. Г. Методы теххимического контроля в виноделии / В. Г. Гержикова. – Симферополь: Таврида, 2002. – 259 с.
12. ГОСТ 24027.2-80 Сырье лекарственное растительное. Методы определения влажности, содержания золы, экстрактивных и дубильных веществ, эфирного масла. Введ. 1981–01–01. – М.: ИПК Изд-во стандартов, 1999. – 10 с.
13. Лакин Г. Ф. Биометрия: учебное пособие для биологических специальностей вузов / Г. Ф. Лакин. – М.: Высшая школа, 1990. – 352 с.
14. Палий А. Е. Изменение физиолого-биохимических параметров у некоторых сортов *Olea europaea* L. с различной морозоустойчивостью / А. Е. Палий, О. А. Гребенникова, Т. Б. Губанова, И. Н. Палий // Бюллетень Государственного Никитского ботанического сада. – 2016. – Вып. 121. – С. 32–39.

CHANGE IN THE CONTENT OF PHENOLIC COMPOUNDS IN THE LEAVES OF *OLEA EUROPAEA* L. CULTIVARS WITH VARYING DEGREES OF FROST TOLERANCE

Paliy A. E., Paliy I. N., Startseva O. V.

*Federal State-Funded Institution of Science "The Order of the Red Banner Nikita Botanical Gardens – National Scientific Center of RAS", Yalta, Crimea, Russian Federation
E-mail: onlabor@yandex.ru*

The change of total phenolics, luteolin-7-O-glucoside and rutin in the leaves of two cultivars of *Olea europaea* L. during the cold period on the Southern coast of Crimea has been studied. The frost-tolerant cultivar Nikitskaya and the slightly frost-tolerant cultivar Razzo were the target of research.

Total phenolics of olive leaves ranged from 684 to 1103 mg / 100 g. The onset of the first frosts was accompanied by a decrease in the concentration of total phenolics. The subsequent gradual lowering of the ambient temperature led to its increase.

Luteolin-7-O-glucoside content in olive leaves ranged from 8.1 to 211.4 mg / 100 g, rutin content ranged from 0.4 to 1.5 mg / 100 g. The lowest concentrations of luteolin-7-O-glycoside were observed during fall season. In December, there was a sharp increase in its content. In January, in the Nikitskaya cultivar, the concentration of luteolin-7-O-glycoside fell, while in the Razzo cultivar it continued to grow by more than 50 %. In February, against the background of long low temperatures exposure, the concentration of luteolin-7-O-glycoside decreased several times in both cultivars. In March, further decrease in the concentration of luteolin-7-O-glycoside in the Razzo cultivar took place, while in the Nikitskaya cultivar its concentration increased. A similar process was also observed during the study of changes in the rutin content.

The revealed differences in the dynamics of accumulation of luteolin-7-O-glucoside and rutin in olive leaves testify to the participation of these substances in the resistance of this culture to the effect of low-temperature stress.

As a result of the performed studies, it has been found that the resistance of olive cultivars to the effect of negative temperatures depends on the accumulation of luteolin-7-O-glycoside and rutin, and does not depend on the change in the concentration of total phenolics.

Keywords: *Olea europaea* L., leaf, total phenols, luteolin-7-O-glucoside, rutin, frost resistance.

References

1. Larcher W. Temperature stress and survival ability of Mediterranean sclerophyllous plants, *Plant Biosystems*, **134**, 279 (2000).
2. El S. N., Karakaya S. Olive tree (*Olea europaea*) leaves: potential beneficial effects on human health, *Nutrition Reviews*, **67**, **11**, 632 (2009).
3. Lockyer S., Yaqoob P., Spencer J. P. E., Rowland I. Olive leaf phenolics and cardiovascular risk reduction: Physiological effects and mechanisms of action, *Nutrition and Aging*, **1**, 125 (2012).
4. Moudache M., Colon M., Nerin C., Zaidia F. Phenolic content and antioxidant activity of olive by-products and antioxidant film containing olive leaf extract, *Food Chemistry*, **212**, 521 (2016).

5. Pu-Jun X., Li-Xin H., Cai-Hong Zh., Yao-Lei Zh. Phenolic compositions, and antioxidant performance of olive leaf and fruit (*Olea europaea* L.) extracts and their structure–activity relationships, *Journal of Functional Foods*, **16**, 460 (2015).
6. Saibandith B., Spencer J. P., Rowland I. R., Commane D. M. Olive polyphenols and the metabolic syndrome, *Molecules*, **22**, **7**, 1082 (2017).
7. Talhaoui N., Taamalli A., Gómez-Caravaca A. M., Fernández-Gutiérrez A., Segura-Carretero A. Phenolic compounds in olive leaves: Analytical determination, biotic and abiotic influence, and health benefits, *Food Research International*, **77**, **2**, 92 (2015).
8. Zaprometov M. N. *Phenolic compounds: distribution, metabolism and function in plants*, 272 p. (Moscow: Nauka, 1993).
9. Ortega-Garcia F., Peragon J. The response of phenylalanine ammonia-lyase, polyphenol oxidase and phenols to cold stress in the olive tree (*Olea europaea* L. cv. Picual), *Journal Agricultural and Food Chemistry*, **89**, 1565 (2009).
10. Ortega-Garcia F., Peragon J. Phenol Metabolism in the Leaves of the Olive Tree (*Olea europaea* L.) cv. Picual, Verdial, Arbequina, and Frantoio during Ripening, *Journal Agricultural and Food Chemistry*, **58**, 12440 (2010).
11. Gerzhikova V. G. *Techno-chemical control methods in winemaking*, 259 p. (Simferopol: Tavrida, 2002).
12. GOST 24027.2-80 Methods for determination of moisture, ash content, extractive and tannin materials, essential oil. Available at: <http://meganorm.ru/Data2/1/4294830/4294830157.pdf>
13. Lakin G. F. *Biometrics: a textbook for the biological specialties of universities*, 352 p. (Moscow: Higher School, 1990).
14. Paliy A. E., Grebennikova O. A., Gubanova T. B., Paliy I. N. Change of physiological and biochemical parameters of some *Olea europaea* L. cultivars with different frost resistance, *Proceedings of the State Nikita Botanical Garden*, **121**, 32 (2016).