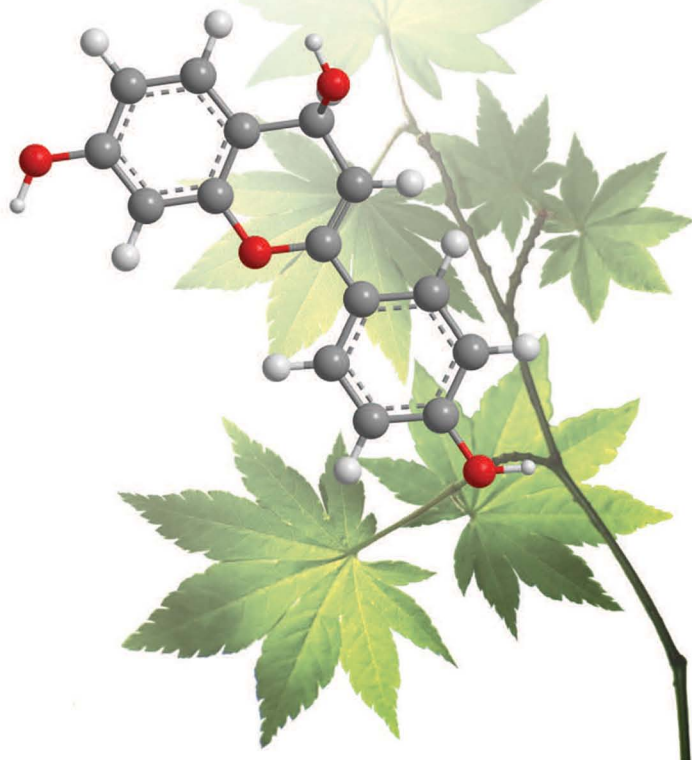




А. П. Волюнец

ФЕНОЛЬНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ

В ЖИЗНЕДЕЯТЕЛЬНОСТИ
РАСТЕНИЙ



НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК БЕЛАРУСИ
Институт экспериментальной ботаники им. В. Ф. Купревича

А. П. Волюнец

ФЕНОЛЬНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ

В ЖИЗНЕДЕЯТЕЛЬНОСТИ РАСТЕНИЙ



Минск
«Беларуская навука»
2013

УДК 581.1

Волынец, А. П. Фенольные соединения в жизнедеятельности растений / А. П. Волынец. – Минск: Беларус. навука, 2013. – 283 с. – ISBN 978-985-08-1515-6.

В монографии излагаются результаты многолетних исследований автора и литературные данные о роли фенольных соединений в жизнедеятельности растений в нормальных условиях и под влиянием химического инфекционного и экологического стрессов. Описывается участие этих веществ в процессах роста, развития, органообразования, фотосинтеза, защиты растений и др. Впервые подробно рассматривается эндогенный механизм росторегулирующей активности фенольных соединений. Много внимания уделяется перспективам использования фенольных соединений, регуляции их содержания в растениях, значении при корнеобразовании и плодообразовании, применений в качестве лекарственных средств и пищевых добавок, в повышении болезнеустойчивости растений к фитопатогенным грибам и в других процессах.

Предназначена для широкого круга специалистов в области физиологии и биохимии растений, медицины и пищевой промышленности, сельского и лесного хозяйства, а также для преподавателей и студентов вузов соответствующего профиля.

Табл. 101. Ил. 32. Библиогр.: – 417 назв.

Научный редактор

академик НАН Беларуси В. Н. Решетников

Рецензенты:

член-корреспондент НАН Беларуси Ж. А. Рупасова

член-корреспондент НАН Беларуси Б. И. Якушев

ISBN 978-985-08-1515-6

© Волынец, А. П., 2013

© Оформление. РУП «Издательский дом
«Беларуская навука», 2013

*Посвящается светлой памяти
моих родителей Прасковьи Адамовны
и Потапа Аверкиевича Волынец*

ВВЕДЕНИЕ

Фенольные соединения растений и фитопатогенных грибов характеризуются рядом отличительных особенностей. Важнейшие из них: универсальность распространения, чрезвычайная многочисленность по составу (более 8000 соединений) и очень большое разнообразие по структуре. По совокупности этих признаков фенольные соединения являются уникальными компонентами среди эндогенных метаболитов высших растений и грибов, уступая по составу только терпенам и алкалоидам. Несмотря на это физиологическая роль их в жизнедеятельности растений и грибов изучена пока слабо [1–4]. Более продвинутыми оказались исследования медико-биологических, технологических, радиопротекторных, фитозащитных и других аспектов применения этих соединений. В то же время функции их в растениях начали интенсивно изучаться только во второй половине XX века. Это связано с возросшим интересом к этой проблеме не только ученых-практиков, но и физиологов и биохимиков растений. Этому во многом способствовали ежегодные конференции международного объединения «Группа полифенолов» и научные форумы Европейского биохимического общества, а также периодические Международные симпозиумы по фенольным соединениям (последний 7-й такой симпозиум состоялся в 2009 г. в Москве), включающие химические, физиолого-биохимические, медико-биологические и прикладные аспекты применения фенольных соединений.

Начало физиолого-биохимических исследований фенольных соединений относится к первой половине XX века и касается таких процессов, как дыхание [5, 6], фитоиммунитет [7] и про-

нищаемость капилляров [8], в которых использованы многие фенольные соединения (дубильные вещества, флавоны, флавонолы, антоцианы и хлорогеновая кислота).

Приступая в 1966 г. к изучению биологической активности и физиологического действия фенольных соединений, мы использовали богатый опыт, накопленный исследователями в работах с фитогормонами и регуляторными гербицидами 2,4-Д и 2М-4Х, нашедший отражение в работе [9], а также взяли на вооружение сами природные и синтетические регуляторы роста в качестве модельных веществ, по физиологическому действию которых имела уже основательная литература [10–14]. Такой подход позволял выявить не только общие, но и специфические особенности физиологического действия этой группы соединений и самое главное – придавал убедительность новым экспериментальным данным.

При сравнительном анализе свойств фенольных соединений и фитогормонов обращало на себя внимание сходство многих особенностей β -индолилуксусной кислоты (ИУК) и некоторых фенольных соединений. Сказанное нужно отнести, прежде всего, к биосинтезу и структуре индол- и фенолкарбоновых кислот, присутствию многих фенольных соединений и фитогормонов в интенсивно растущих органах и снижению содержания их при старении тканей. К этому можно добавить сходное изменение количества этих веществ в онтогенезе растений и грибов. Эти факты указывали на правильность выбора методического подхода и самих методов при биотестировании активности и изучении физиологического действия эндогенных фенольных соединений.

Как известно, фитогормоны полифункциональны. Однако основная их функция как типичных регуляторов роста сводится к регуляции разнообразных ростовых процессов клеток, отдельных тканей и органов (корней, стеблей, листьев, плодов, семян) и аттракции минеральных веществ и ассимилятов в центры наиболее высокой метаболической активности.

Из сказанного следует, что на первом этапе при изучении физиологического действия фенольных соединений мы обязаны были ориентироваться на определение их биологической ак-

тивности на фитогормональных биотестах и взаимодействие их с фитогормонами в процессах роста. Второй этап исследований сводился к выяснению участия этих веществ в процессах развития интактных растений и фитопатогенных грибов. Особое место занимали испытания фенольных соединений в процессах фотосинтеза и формирования защитных реакций от грибных патогенов. Наконец, сопоставляли изменение содержания фенольных соединений в растениях в условиях воздействия химического, инфекционного и экологического стрессов. В конечном счете накопленные сведения позволяли раскрыть механизм росторегулирующего действия фенольных соединений, выяснить новые функции этих веществ и показать возможность их практического применения.

В разработке научных и прикладных аспектов действия и применения природных фенольных соединений вместе с автором принимали участие бывшие и настоящие сотрудники (Л. А. Пшеничная, Р. А. Прохорчик, Н. Е. Манжелесова) и аспиранты (Н. А. Ламан, В. Н. Корнелюк, Н. Н. Лемешев и Н. П. Башко), которым я выражаю глубокую благодарность. Особую признательность приношу сотрудникам С. Н. Полянской и Л. А. Корытько, оказавшим неоценимую помощь при подготовке книги к печати.

Часть I

**РОЛЬ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ
В ЖИЗНЕДЕЯТЕЛЬНОСТИ
НОРМАЛЬНЫХ РАСТЕНИЙ**

ФЕНОЛЬНЫЙ КОМПЛЕКС РАСТЕНИЙ И ФИТОПАТОГЕННЫХ ГРИБОВ

1.1. Общая характеристика фенольных соединений

К фенольным соединениям относятся ароматические вещества, содержащие бензольное кольцо и несущие одну или несколько гидроксильных групп или их заместителей. Самое простое фенольное соединение – обычный фенол, имеющий бензольное ядро и одну оксигруппу, т. е. соединение ряда C_6 . К этой же группе относятся и другие простые фенолы: пирокатехин, пирогаллол, гидрохинон, резорцин и флороглюцин, содержащие в молекуле две или три гидроксильные группы. Названные простейшие фенольные соединения и их производные сравнительно редко распространены в растениях [1].

В отличие от простых фенолов соединения рядов $C_6 - C_1$ и $C_6 - C_3$ широко встречаются в разных органах растений. К ним относятся оксibenзойные и оксикоричные кислоты. Среди первых наиболее известны п-оксibenзойная, ванилиновая и протокатеховая кислоты, среди вторых – п-кумаровая, феруловая и кофейная кислоты. Пожалуй, нет вида высших растений, в котором в той или иной комбинации не присутствовали указанные кислоты [1]. Исходными структурами для образования оксibenзойных и оксикоричных кислот являются соответственно бензойная и коричная кислоты, иногда ошибочно причисляемые к фенольным соединениям. К соединениям ряда $C_6 - C_3$ принадлежат также оксикумарины, широко распространенные в растениях некоторых семейств (злаковых, бобовых, зонтичных и др.).

К наиболее многочисленной и повсеместно распространенной группе фенольных соединений относятся флавоноиды (соединения ряда $C_6 - C_3 - C_6$), содержащие в молекуле два бензольных ядра. Среди соединений этой группы различают катехины,

флавоны, флавонолы, изофлавоны, антоцианидины и другие вещества, отличающиеся друг от друга количеством и расположением оксигрупп в молекуле. Среди названных флавоноидов чаще других встречаются в растениях кверцетин и кемпферол (флавонолы), апигенин и лютеолин (флавоны), цианидин, изофлавогенистеин и (+)–катехин. Вместе с каротиноидами окрашенные флавоноиды (антоцианы, флавоны, флавонолы и др.) принимают участие в образовании разнообразной окраски многих ягод, плодов и цветков. Защита нежных растительных тканей от ультрафиолетовых лучей и привлечение насекомых к окрашенным цветкам – издавна считались важнейшими функциями флавоноидных соединений [4]. Они же обуславливают в основном желтый цвет обычного чая и многих лекарственных экстрактов и настоев.

Описанными веществами не ограничивается все многообразие фенольных соединений. Им свойственен целый ряд менее распространенных ароматических структур фенольной природы [1, 4].

Есть ли какая-либо специфика по локализации фенольных соединений по видам и органам растений? Исследованиями Бейт-Смита [15] выявлено существенное различие в распространении важнейших фенольных соединений среди 651-го изученного вида двудольных и 141-го вида однодольных растений. Если антоцианидины и флавонолы вдвое чаще встречаются среди двудольных (максимальный процент распространения соответственно 37 и 62%), то феруловая и синаповая кислоты в большей мере свойственны однодольным (соответственно 67 и 57%). Близкие показатели по распространению среди растений имеют п-кумаровая и кофейная кислоты (около 50% исследованных видов).

Имеются существенные различия в локализации фенольных соединений и по органам растений. Если антоцианы встречаются главным образом в лепестках цветов, флавоны и флавонолы в надземных органах, то фенолкарбоновые кислоты – практически повсеместно.

Хорошо известна светозависимость образования многих фенольных соединений [16]. Этим объясняется преимущественно поверхностная локализация флавоноидных и других фенольных

соединений в разных органах растений, тогда как производные фенолкарбоновых кислот и оксикумарины сосредотачиваются в основном во внутренних тканях [17, 18].

Считается, что основным местом локализации фенольных соединений внутри клетки является вакуоль [16, 19–21]. Однако в молодых клетках вакуоль не выражена и, по-видимому, фенольные соединения почти целиком концентрируются в пластидах. Во всяком случае, хлоропласты являются не только определяющим центром биосинтеза фенольных соединений, но и важным местом накопления не столько свободных, сколько конъюгированных фенольных соединений [16].

Как это показывают специальные исследования [16], сказанное справедливо не только для отдельных групп фенольных соединений, но и для многих индивидуальных веществ.

Фенольные соединения встречаются в растениях в трех формах: свободной (агликоны), конъюгированной и связанной, однако многие из этих веществ имеют свои особенности поведения. Так, антоцианидины не обнаружены в растениях в свободной форме, а встречаются исключительно в форме гликозидов антоцианов. Наоборот, лейкоантоцианидины не связываются с сахарами с образованием гликозидов.

Все три формы связи характерны оксикоричным и оксibenзойным кислотам. Они встречаются в свободной форме во всех растительных тканях, в том числе в молодых, интенсивно растущих. Однако содержание их в таких тканях невысокое, практически сохраняется на уровне фитогормонов. Оксикоричные и оксibenзойные кислоты образуют многочисленные и разнообразные лабильные конъюгаты с сахарами, органическими кислотами, а также входят в состав ацилированных флавоноидов и других соединений. В виде химически связанных компонентов фенолкарбоновые кислоты включаются в состав полимерных продуктов: лигнина, кутина, суберина и меланина [4, 22], откуда могут быть высвобождены только с помощью кислотного или щелочного гидролиза. Если связанные оксикоричные кислоты свойственны в основном твердым структурным образованиям растений, то связанные оксibenзойные кислоты больше харак-

терны мягким тканям и органоидам. Во всяком случае, только оксибензойные кислоты выявлены в гидролизате хлоропластов [16]. Не является исключением образование прочных комплексов оксикоричных кислот и их производных с белками [23, 24].

Основной формой распространения флавоноидных соединений в растениях (исключая лейкоантоцианидины) следует считать гликозиды. Как показывают многочисленные исследования [1, 16, 25, 26], они составляют основу флавоноидного комплекса живых тканей всех растений, включая хлоропласты. Свободные флавоноидные соединения (агликоны) в заметных количествах выявлены в мертвых тканях и органах накопления, в цветках [1] и хлоропластах [16].

Вопрос распространения флавоноидных агликонов в зеленых органах растений заслуживает специального рассмотрения. Дело в том, что присутствие их в живых листьях и стеблях оспаривалось [4]. Требовались принципиальные доказательства с соблюдением необходимых мер предосторожности. С этой целью была проведена серия опытов с использованием различных методов фиксации растительного материала, содержащего О- и С-флавоноидные гликозиды, а также с гомогенатами тканей [27] разной выдержки во времени. Оказалось, что органы с эндогенными О-гликозидами всегда содержат и флавоноидные агликоны, однако для обнаружения последних приходится нередко пользоваться приемами препаративной хроматографии. Следовательно, уровень их весьма невысокий, что может остаться вне поля зрения исследователя при обычных приемах анализа. В то же время органы растений с эндогенными С-гликозидами, как правило, не содержат флавоноидных агликонов, так как предполагается, что образование С-гликозидов происходит еще до окончательного формирования молекулы флавоноида [28].

Наряду с фенолкарбоновыми кислотами и флавоноидами образовывать лабильные конъюгаты в виде гликозидов и эфиров способны и другие фенольные соединения: простые фенолы, оксикумарины и др. [1, 4].

Фенольный комплекс любого растения многочисленный по составу и весьма разнообразный по структуре компонентов. В каж-

дом изученном виде растений обычно обнаруживается не один десяток отдельных веществ. Наиболее многочисленны по составу фракции свободных и конъюгированных фенольных соединений. Среди фенольных структур выделяются по составу группы флавоновых, флавоноловых и антоциановых гликозидов. Первые две группы чаще всего встречаются в листьях растений, последняя – в лепестках цветов. Содержание фенольных соединений в отдельных органах растений варьирует в очень широких пределах: от десятых–сотых долей до многих процентов. Самое высокое количество их содержится в генеративных органах и листьях растений.

Общие закономерности распространения, состава и содержания фенольных соединений в фитопатогенных грибах не изучены. Исходя из собственных данных [29–31] можно сказать, что эти особенности мало отличаются от таковых высших растений. Как и в растениях они многочисленны по составу, встречаются в разных формах и содержание их колеблется в широком диапазоне.

1.2. Фенольные соединения растений

Фенольные соединения изучены нами в 20 видах высших растений, включая представителей сем. *Fabaceae* (люпин желтый, люпин узколистный, люпин многолетний, люцерна, клевер красный, горох посевной), сем. *Gramineae* (рожь, ячмень, овес, пшеница, тритикале, рожь Державина, пырей ползучий), сем. *Linaceae* (лен-долгунец), сем. *Solanaceae* (картофель), сем. *Liliaceae* (тюльпан) и другие. Не останавливаясь на всех полученных результатах, рассмотрим фенольный комплекс широко изученных представителей высших растений, включая как общие, так и специфические особенности этой группы веществ.

Люпин желтый (*Lupinus luteus* L.). К началу наших исследований (1966 г.) фенольные соединения люпина были изучены слабо. Имелись только некоторые сведения о составе фенольных соединений этого вида, в частности, об обнаружении в растениях флавоноидного гликозида ройфолина [32]. Нами изучены свободные и конъюгированные фенольные соединения люпина

желтого (сортов Белорусский кормовой и Боровлянский кормовой) как наиболее распространенные и многочисленные формы этих веществ. Анализу подвергались растения и отдельные органы в возрасте от четырех листьев до фазы полной спелости, имеющие в основном один и тот же состав компонентов, но разное их содержание. В свободной форме обнаружено 18 индивидуальных соединений (рис. 1.), хроматографическая и спектральная характеристика которых приведена в табл. 1.

Вместе со свободными фенольными соединениями корней люпина исследованы фенольные конъюгаты надземных органов этого вида в фазе бутонизации. В водно-спиртовом экстракте люпина обнаружено 16 индивидуальных веществ (рис. 2.), не считая цис-формы производных оксикоричных кислот. Их характеристики приведены в табл. 2. Следует отметить, что состав фенольных конъюгатов может увеличиваться за счет минорных компонентов при нанесении на хроматограмму большого объема экстракта.

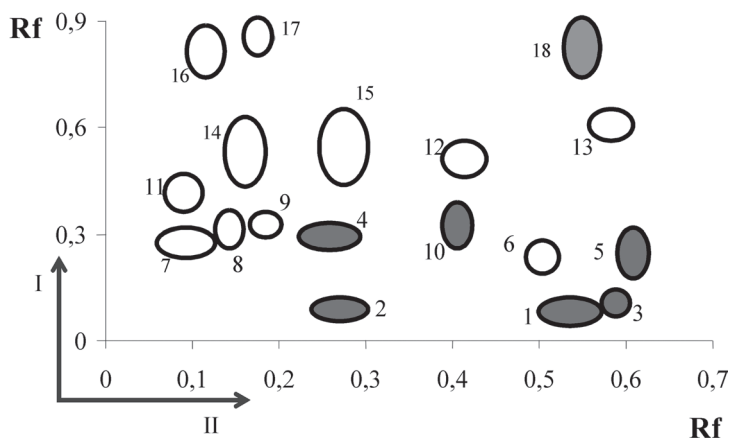


Рис. 1. Схема двумерной хроматограммы свободных фенольных соединений корней люпина в возрасте 12 листьев: *I* — растворитель изопропанол — аммиак — вода (12:1:1), *II* — растворитель 5%-ная уксусная кислота; 1 — протокатеховая кислота, 2 — кофейная кислота, 3 — ванилиновая кислота, 4 — феруловая кислота, 5 — п-оксibenзойная кислота, 10 — п-кумаровая кислота, 18 — салициловая кислота, 6–9 и 11–17 — неидентифицированные фенолкарбоновые кислоты

Таблица 1. Хроматографическая и спектральная характеристика свободных фенолкарбоновых кислот корней люпина (бумага ватман 3)

Вещество	Окраска пятен на хроматограмме		λ макс.	λ мин.
	в УФ свете 254 нм	в УФ свете + NH ₃	в 96%-ном этаноле	
Протокатеховая кислота	сине-фиолетовая	сине-фиолетовая	258, 288	240, 281
Кофейная кислота	голубая	усиление голубой	290 (плечо)	262
Ванилиновая кислота	темно-фиолетовая	темно-фиолетовая	258, 285	238, 278
Феруловая кислота	сине-голубая	голубая	288	248
п-Оксибензойная кислота	темно-фиолетовая	темно-фиолетовая	254	223
Неизвестная кислота	ярко-синяя	ярко-синяя	248, 290	241, 271
Неизвестная кислота	темно-синяя	ярко-голубая	256	229
Неизвестная кислота	темно-фиолетовая	темно-фиолетовая	262	238
Неизвестная кислота	сине-фиолетовая	темная зелено-голубая	257	240
п-Кумаровая кислота	темно-синяя	синяя	286	246
Неизвестная кислота	темно-фиолетовая	темно-фиолетовая	262	238
Неизвестная кислота	яркая сине-фиолетовая	сине-фиолетовая	260	248
Неизвестная кислота	ярко-синяя	ярко-синяя	254	238
Неизвестная кислота	желто-оранжевая	желто-оранжевая	280	245
Неизвестная кислота	светло-зеленая	светло-зеленая	275	258
Неизвестная кислота	голубая	голубая	275	248
Неизвестная кислота	темно-фиолетовая	темно-фиолетовая	267	245
Салициловая кислота	сине-голубая	сине-голубая	274	245

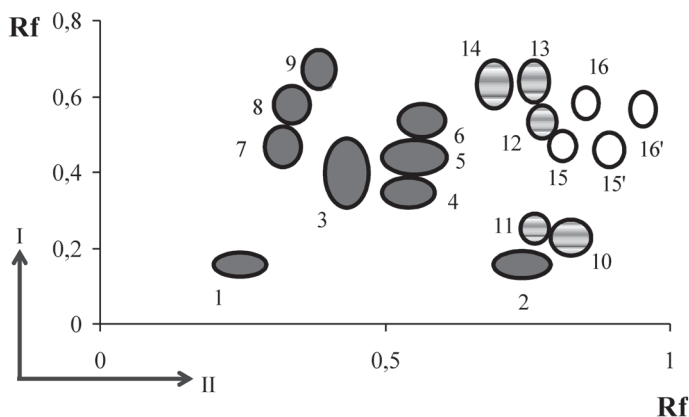


Рис. 2. Фенольные конъюгаты надземных органов люпина: *I* – растворитель изобутанол – уксусная кислота – вода (4:1:5), *II* – растворитель 5%-ная уксусная кислота; 1 и 2 – апигенин-6,8-ди-С-гликозиды (вицинины), 3 – ройфолин, 4 – рутин, 5 – изорамненин-3-О-рутинозид, 6 – кемпферол-3-О-рамноглокозид, 7 – изокверцитрин, 8 – изорамнетин-3-О-глоукозид, 9 – астрагалин, 10 – 3',4'-метилендиоксиборбол-7-О-глоукозилглоукозид, 11 – генистеин-7-О-глоукозилглоукозид, 12 – 3',4'-метилендиоксиборбол-7-О-глоукозид, 13 – генистеин-8-С-глоукозид, 14 – генистеин-7-С-глоукозид (генистин), 15 и 15' – транс- и цис-производные феруловой кислоты, 16 и 16' – транс- и цис-производные п-кумаровой кислоты

Таблица 2. Хроматографическая и спектральная характеристика фенольных конъюгатов люпина (бумага FN 3).

Вещество	Окраска пятен на хроматограмме		λ макс. в 70%-ном этаноле
	в УФ свете, 254 нм	в УФ свете + NH_3	
Вицинин (?)	коричневая	желтая	268, 336
Вицинин (?)	коричневая	желтая	268, 336
Ройфолин	коричневая	желто-зеленая	265, 340
Рутин	коричневая	желтая	258, 358
Изорамненин-3-О-рутинозид	коричневая	желтая	256, 360
Кемпферол-3-О-рамноглокозид	коричневая	темно-зеленая	267, 354
Изокверцитрин	коричневая	желтая	258, 360

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение.....	3
----------------------	----------

ЧАСТЬ I

Роль фенольных соединений в жизнедеятельности нормальных растений

Глава 1. Фенольный комплекс растений и фитопатогенных грибов....	7
1.1. Общая характеристика фенольных соединений	7
1.2. Фенольные соединения растений	11
1.3. Фенольные соединения фитопатогенных грибов.....	26
Глава 2. Фенольные соединения в процессах роста растений	36
2.1. Биологическая активность фенольных соединений.....	36
2.2. Фенольные соединения при прорастании семян и росте про- ростков	44
2.3. Изменение фенольного комплекса семян при прорастании	55
Глава 3. Фенольные соединения и генеративное развитие растений ...	64
3.1. Фенольные соединения генеративных органов растений	64
3.2. Формирование мужского гаметофита.....	67
3.3. Рост и развитие зародыша	70
3.4. Аттрагирующая способность фенольных соединений.....	73
3.5. Фенольные соединения и плодообразование растений	77
3.6. Фенольные соединения пшеницы при созревании	79
Глава 4. Механизм росторегулирующей активности фенольных соединений	82
Глава 5. Фенольные соединения и фотосинтез.....	93
5.1. Свет и фенольные соединения	94
5.2. Активирование светом ферментов биосинтеза фенольных со- единений	102

5.3. Фотосинтетическое образование фенольных соединений.....	107
5.4. Фенольные соединения хлоропластов	113
5.5. Сравнительная активность эндогенных фенольных соединений в процессах фотосинтеза.....	122
Глава 6. Фенольные соединения и аллелопатическое почвоутомление....	128

ЧАСТЬ II

Роль фенольных соединений в жизнедеятельности растений, подвергшихся стрессу

Глава 7. Фенольные соединения и химический стресс	139
7.1. Влияние гербицидов на состав фенольных соединений.....	139
7.2. Действие гербицидов на содержание фенольных соединений...	144
7.3. Биологическая активность фенольных соединений в присутствии гербицидов.....	165
Глава 8. Фенольные соединения и инфекционный стресс.....	171
8.1. Фенольный комплекс культурных и диких видов злаков	172
8.2. Взаимодействие ржи и ржавчинных грибов на начальном этапе формирования фитопатосистемы.....	175
8.3. Индуцированное изменение конституциональных фенольных соединений инфицированных растений	180
8.4. Новообразование специфических фенольных соединений (фитоалексинов)	187
8.5. Реализация защитного потенциала фенольных соединений.....	194
Глава 9. Фенольные соединения и экологический стресс.....	200
9.1. Фенольный комплекс люцерны (<i>Medicago sativa</i> L.) в период генеративного развития в условиях Беларуси.....	202
9.2. Фенольные соединения и качество пыльцы люцерны в условиях Беларуси.....	208

ЧАСТЬ III

Перспективы использования фенольных соединений

Глава 10. Основные направления применения фенольных соединений...	215
10.1. Важнейшие свойства фенольных соединений как основа их применения.....	215
10.2. Регуляция содержания фенольных соединений в растениях ...	218
10.3. Оптимизация корнеобразования при вегетативном размножении растений	224

10.4. Стимуляция плодообразования растений	229
10.5. Направленная регуляция болезнеустойчивости растений.....	231
10.6. Фенольные соединения лепестков суданской мальвы (<i>Hibiscus sudanensis</i> L.)	235
10.7. Фенольные соединения как лекарственные препараты и пище- вые добавки	237
10.8. Фенольные соединения в кормлении животных	240
10.9. Тестирование устойчивости растений к гербицидам	243
Заключение	248
Литература	257
Справочные сведения	275
Описанные регуляторы роста и ферменты	275
Растения и грибы	279