



УДК 547.972+582.632

ВТОРИЧНЫЕ МЕТАБОЛИТЫ КЛЕВЕРА

III. ИЗМЕНЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ИНГИБИТОРОВ РОСТА В КОРНЯХ КЛЕВЕРА КРАСНОГО В ОСЕННИЙ ПЕРИОД *

Поправко С. А., Соколова С. А., Фрайштат И. Д.

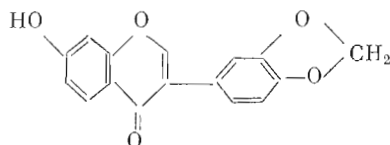
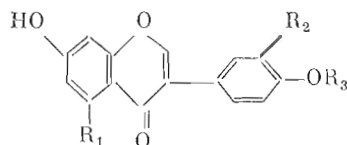
*Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва*

Кононенко Г. П.

*Всесоюзный научно-исследовательский институт кормов
им. В. Р. Вильямса, Московская область*

В опытах *in vitro* установлено, что содержащиеся в корнях клевера красного изофлавоны псевдобаптигенин, каликозин и ирилон, птерокарпан инермин, изохавибетол и его этиловый эфир в концентрациях от $3 \cdot 10^{-4}$ до 10^{-5} М подавляют растяжение отрезков coleoptилей пшеницы, индуцированное β -индолилуксусной кислотой. Методом ГЖХ Me_3Si -эфиров изучено содержание этой группы веществ в корнях клевера сорта Конищевский в осенний период. Установлено, что содержание формонетина, а также псевдобаптигенина, каликозина и инермина резко падает после прохождения фаз естественного закалывания и яровизации.

В корнях клевера красного к настоящему времени идентифицирована большая группа веществ вторичного обмена, в том числе изофлавоны формонетин (I), псевдобаптигенин (II) [2], генистеин (III), биоханин А (IV), каликозин (V), ирилон (VI) [3], производные 5-(пропен-1'-ил)пирокатехина изохавибетол (VII) и его этиловый эфир (VIII) [4], птерокарпаны инермин (IX) [2] и его β -D-гликозид трифолиризин (X) [5, 6].



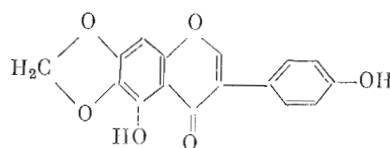
(II)

(I) $R_1=R_2=H$, $R_3=CH_3$

(III) $R_2=R_3=H$, $R_1=OH$

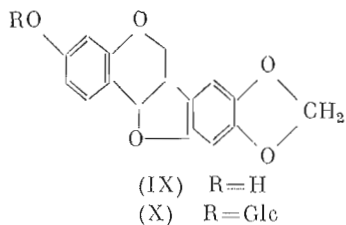
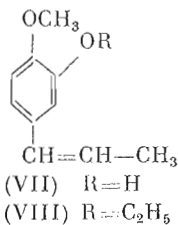
(IV) $R_2=H$, $R_1=OH$, $R_3=CH_3$

(V) $R_1=H$, $R_2=OH$, $R_3=CH_3$



(VI)

* Сообщение II см. [1].



Для ряда этих веществ была выявлена значительная ростингибирующая активность. Так, в тесте на растяжение отрезков coleoptилей злаков, индуцированное β -индолилуксусной кислотой, соединения (I), (III)—(IV) и (X) подавляли рост на 20—80% по отношению к контролю в концентрациях 10^{-3} — 10^{-5} М [7].

Поскольку ингибиторы роста играют, по-видимому, важную роль в приспособлении растений к неблагоприятным факторам среды, в частности к воздействию пониженных температур, мы подвергли биоиспытаниям и другие выделенные нами компоненты корней. Результаты испытаний (см. табл. 1) показали, что соединения (II), (V)—(VIII) и (IX) также в той или иной степени являются ингибиторами растяжения coleoptилей. Так, у инермина (IX), изохавибетол (VII) и его этилового эфира (VIII) 50% подавление растяжения coleoptилей по отношению к контролю наблюдается уже при концентрации $3 \cdot 10^{-4}$ М, причем ингибирующий эффект у инермина сохраняется до концентрации 10^{-5} М, а у изохавибетол и его этилового эфира — до концентрации $5 \cdot 10^{-5}$ М. Изофлавоны (II), (V) и (VI) оказалось возможным испытать только в концентрациях ниже 10^{-4} М из-за их слабой растворимости в спирте. Наиболее активным в интервале концентраций от 10^{-5} до 10^{-4} оказался 5,4'-диокси-6,7-метилendioксиизофлавоны (VI), а наименьшую активность проявил псевдобаптигенин (II).

Нами было установлено, что у растений клевера второго года жизни, в частности сорта Коницевский, основными компонентами экстрактов корней, обладающих ростингибирующей активностью, являются инермин (IX), формонопетин (I), псевдобаптигенин (II) и каликозин (V). Ирилон (VI) и биоханин А (IV) находятся в следовых количествах, а генистеин (III) и производные пирокатехина (VII) и (VIII) практически отсутствуют.

В связи со значительной ростингибирующей активностью соединений (I), (II), (V) и (IX) интересно было сопоставить их содержание с наблюдаемой ростовой активностью экстрактов корней, собранных до и после прохождения растениями естественного закалывания. С этой целью

Таблица 1

Действие изофлавонов, производных 5-(пропен-1'-ил)пирокатехина и инермина на растяжение отрезков coleoptилей пшеницы, индуцированное β -индолилуксусной кислотой
В % подавления по отношению к контролю

Вещество	Концентрация, М			
	$3 \cdot 10^{-3}$	$1 \cdot 10^{-4}$	$5 \cdot 10^{-5}$	$1 \cdot 10^{-5}$
Псевдобаптигенин (II)	*	*	40	8
Каликозин (V)	*	18	16	9
Ирилон (VI)	*	32	20	12
Изохавибетол (VII)	53	14	6	0
Этиловый эфир изохавибетол (VIII)	58	33	12	0
Инермин (IX)	52	45	24	10

* Наблюдается частичное выпадение испытуемого вещества в осадок.

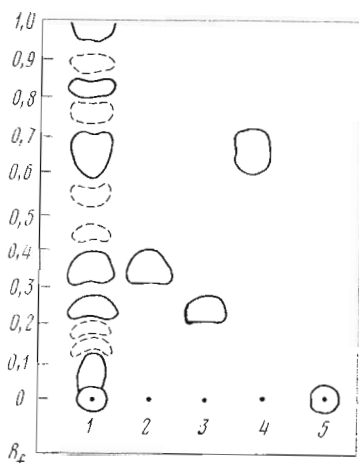


Рис. 1. ТСХ ростингибирующих веществ из корней клевера красного: 1 — суммарная фракция изофлавонов и птерокарпанов, 2 — смесь формононетина (I) и псевдобаптигенина (II), 3 — каликозин (V), 4 — инермин (IX), 5 — трифолиризин (X) на силуфоле в системе хлороформ — метанол, 95 : 5; обнаружение парами пода. Пунктиром показаны пятна слабой интенсивности

пробы экстрактов корней были разделены на пластинках силуфола (рис. 1) и элюаты соответствующих зон испытаны в биотесте на растяжение отрезков колосотилей пшеницы, индуцированное β -индолилуксусной кислотой [8]. Результаты проведенных биоиспытаний представлены на рис. 2.

Как и следовало ожидать, в экстрактах растений, отобранных в сентябре (рис. 2а), наибольшей ингибирующей активностью обладали элюаты зон с R_f 0—0,1; 0,2—0,3 и 0,6—0,7, в которых содержатся соответственно каликозин (V), трифолиризин (X) и инермин (IX) (рис. 1). Значительная ингибирующая активность стартовой зоны могла быть, очевидно, связана с присутствием в ней не только трифолиризина, но и других компонентов экстракта, обладающих способностью подавлять рост и имеющих низкое значение R_f в выбранной системе растворителей. Зона с R_f 0,3—0,4 содержала, судя по значениям хроматографической подвижности, формононетин (I) и псевдобаптигенин (II), способные ингибировать рост, однако сравнительно невысокий уровень наблюдаемой активности для элюатов этих зон объясняется, очевидно, крайне низкой растворимостью указанных веществ в водных растворах.

В экстрактах корней, отобранных через месяц после прохождения растениями естественного закалывания и яровизации, ингибирующая активность в зонах с R_f 0,2—0,3 и 0,6—0,7 значительно снизилась (рис. 2б). Поскольку ингибирующее действие индивидуальных изофлавонов и птерокарпанов в этом биотесте сильно падает с уменьшением концентрации (табл. 1 и данные работы [7]), можно было предположить, что наблюдаемое снижение ингибирования исследуемых фракций в осенний период обусловлено уменьшением содержания в них именно этой группы веществ. Судя по результатам тестирования индивидуального инермина (IX) (табл. 1), 50% подавление элюата зоны с R_f 0,6—0,7, наблюдавшееся для экстрактов корней клевера, отобранных в начале осеннего периода (рис. 2а), могло быть обусловлено его наличием в тестируемом элюате в концентрации $1 \cdot 10^{-4}$ — $3 \cdot 10^{-4}$ М. Последующее снижение ингибирующего эффекта этой зоны до 33% у изучаемого сорта (рис. 2б) соответствовало, следовательно, снижению его концентрации до $5 \cdot 10^{-5}$ М, т. е. уменьшению его содержания в экстракте примерно в 2 раза. Характер изменения ингибирования элюата зоны с R_f 0,2—0,3 подчинялся той же закономерности.

Для проверки предположения о том, что именно снижение содержания инермина (IX) и исследуемой группы изофлавонов в корнях клевера в осенний период является причиной соответствующего снижения ростингибирующей активности, мы оценили их содержание в экстрактах методом ГЖХ. Анализ этих соединений проводился в виде Me_3Si -производных, полученных действием N,O-бис(триметилсилил)ацетамида. Результаты ана-

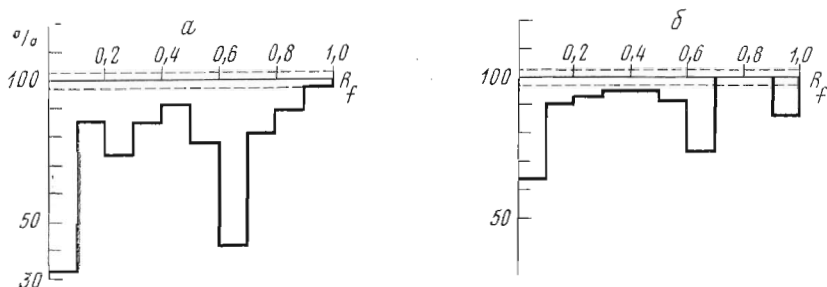


Рис. 2. Ростовая активность экстрактов корней клевера красного [8] в начале (а) и конце (б) осеннего периода: по оси абсцисс отложены по движности соответствующих исследуемых фракций (рис. 1), по оси ординат — прирост колеоптилей по отношению к контролю, %

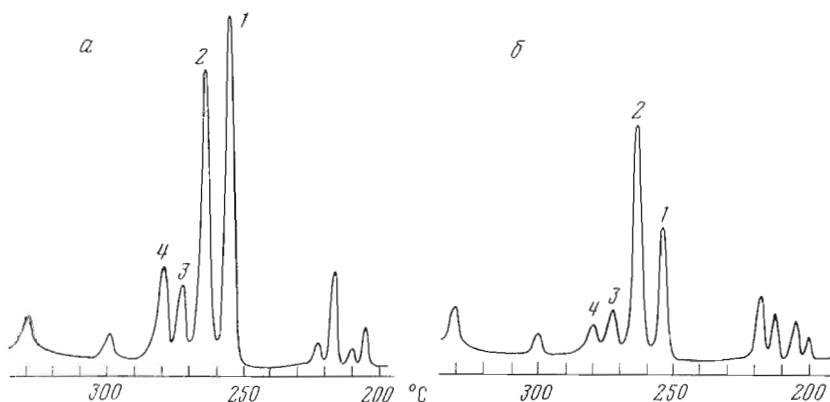


Рис. 3. ГЖХ Me_3Si -эфиров суммарной фракции изофлавонов и птерокарпанов, полученной из корней клевера красного в начале (а) и конце (б) осеннего периода на колонке с 5% SE-30 на хроматоне N-AW-HMDS при повышении температуры $4^\circ \text{C}/\text{мин}$

лизов суммарной фракции изофлавонов и птерокарпанов корней клевера, отобранных до и после прохождения фазы естественного закалывания, приведены на рис. 3. Сравнение времени удерживания и масс-спектров заведомых образцов Me_3Si -эфиров анализируемых веществ показало, что пик 1 на хроматограммах соответствует Me_3Si -эфире инермина ($M^+ 356$), пик 2 — Me_3Si -эфире формонетина ($M^+ 340$), пик 3 — Me_3Si -эфире псевдобаптингенина ($M^+ 354$) и пик 4 — Me_3Si -эфире каликозина ($M^+ 428$) (рис. 4). Количественное содержание этих соединений в смесях определялось методом абсолютной калибровки.

Как показывают данные рис. 4 и табл. 2, качественный состав суммарной фракции изофлавонов и птерокарпанов в ходе осеннего периода

Таблица 2

Содержание изофлавонов и птерокарпанов в корнях клевера красного в осенний период

В % от веса сухого остатка экстракта *

Месяц	Суммарная фракция	Инермин	Каликозин	Псевдобаптингенин	Формонетин
Сентябрь	17,3	$4,04 \pm 0,4$	$1,42 \pm 0,1$	$1,16 \pm 0,07$	$3,39 \pm 0,5$
Октябрь	12,1	$1,34 \pm 0,1$	$0,49 \pm 0,04$	$0,71 \pm 0,05$	$2,58 \pm 0,4$

* Среднее значение из трех определений.

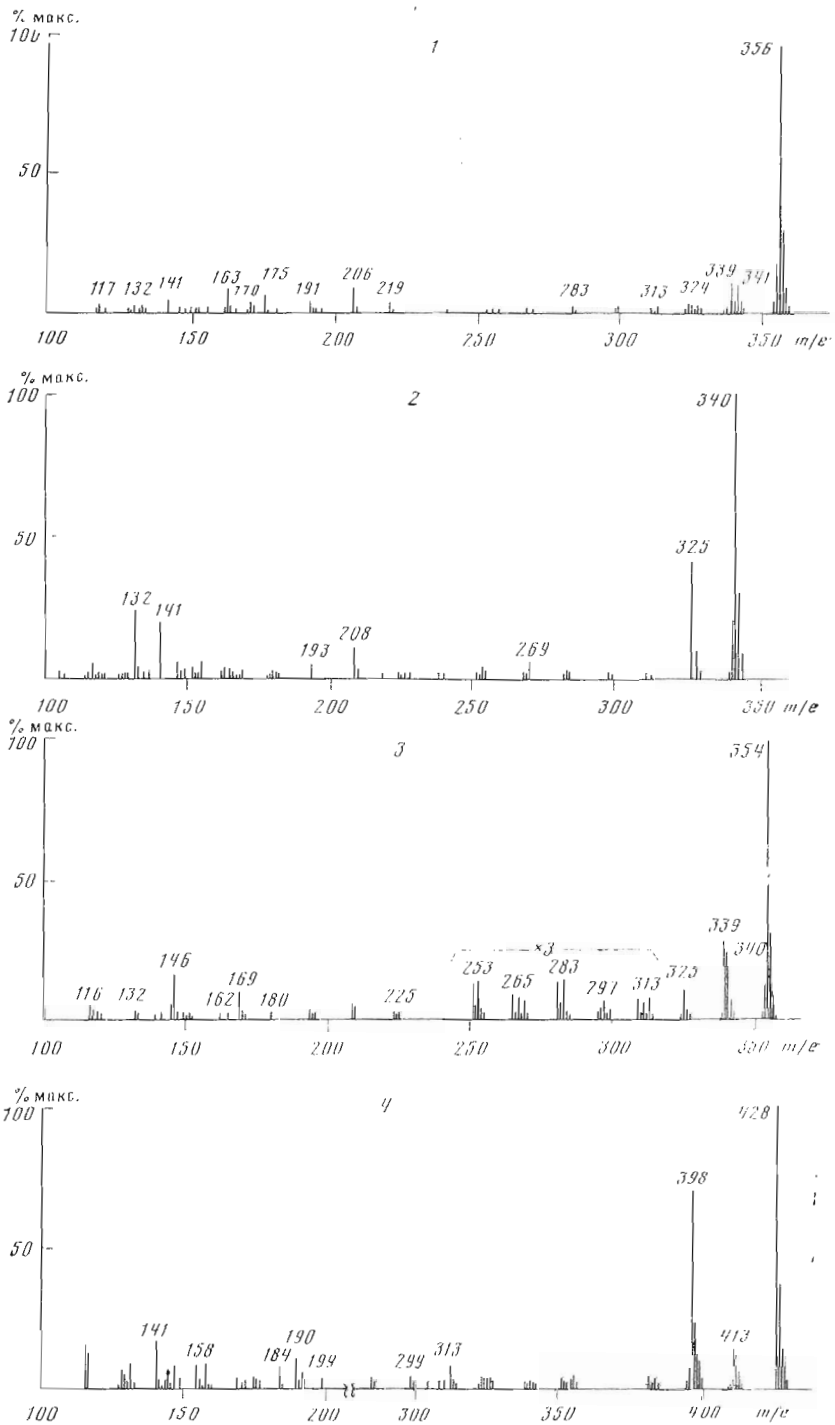


Рис. 4. Масс-спектры ГЖХ-фракций Me₃Si-эфиров суммарной фракции изофлавонов и птерокарпаинов (пики 1-4 - хроматограммы рис. 3)

практически не изменялся, однако в то же время происходили значительные изменения в их содержании. У исследованного нами сорта Коницевский содержание инермина в осенний период снизилось в 3 раза, каликозина — в 2,9 раза, а псевдобаптигенина и формонетина — в 1,6 и 1,3 раза соответственно. Эти изменения, как показывает сопоставление данных рис. 2 и табл. 2, находятся в соответствии и с изменениями ростовой активности корней клевера этого сорта, определенной методом гистограмм.

Резкое снижение содержания ингибиторов роста в корнях клевера в осенний период указывает на наличие в растении механизмов, осуществляющих активную трансформацию (например, гликозидирование) указанных метаболитов в процессах его подготовки к перезимовке. Интересно, что, по литературным данным, вхождение в фазу зимнего покоя в случае почек древесных сопровождается обратным явлением: содержание ингибиторов роста в них резко возрастает. В данном случае следует, однако, иметь в виду, что у озимых культур, к которым относится клевер красный, прохождение фаз осеннего закалывания по срокам совпадает с другим важнейшим физиологическим процессом — яровизацией или индукцией цветения. К концу этого периода, который в Подмоскowie завершается во второй половине октября [9], растения приобретают не только устойчивость к холоду, но и способность переходить к генеративному развитию. В случае же почек древесных, например исследованной нами ранее березы [10], завершение фазы зимнего покоя сопровождается снижением содержания ингибиторов роста, но перед зацветанием биосинтез этих веществ вновь резко усиливается. На связь биосинтеза полифенольных соединений табака в связи с фазой цветения указывали ранее Цукер и Нитш [11].

Следует также отметить, что у зимующих почек древесных в отличие от переживающих органов многолетних растений значительная доля исследуемых веществ находится во внеклеточном пространстве, на поверхности почек. Возрастание содержания этих веществ в этом случае, очевидно, не влечет за собой неблагоприятных последствий для устойчивости клеток к действию холода. В перезимовывающих же корнях клевера снижение содержания гидрофобных полифенолов, локализованных во внутриклеточном пространстве, по-видимому, повышает их способность противостоять действию низких температур в ходе перезимовки.

Эти факты свидетельствуют о способности растения контролировать биосинтез ряда соединений вторичного обмена в связи с фазами развития, что представляет значительный интерес для выявления механизмов приспособления вида к неблагоприятным условиям среды.

Экспериментальная часть

Использовали корни клевера красного второго года жизни в вегетативной фазе развития, сорт Коницевский — зимостойкий, позднеспелый. Пробы отбирали 20 сентября и 20 октября 1976 г. на опытном участке Центральной экспериментальной базы ВНИИ кормов им. В. Р. Вильямса. В качестве заведомых образцов при ТСХ использовали каликозин, ирилон и инермин, выделенные ранее из корней клевера красного [2, 3], псевдобаптигенин (Serva, США), изохавибетол и этиловый эфир изохавибетола, полученные синтетически [4].

Подготовка растительного материала и получение экстракта. От корневых систем 20 растений отрезали верхние (15 см) части, тщательно отмывали их от остатков почвы холодной водой, грубо измельчали, перемешивали и отбирали среднюю пробу весом 100 г. Ее тщательно измельчали, экстрагировали этанолом (3×400 мл) и спиртовой раствор упаривали в вакууме досуха при 40° С.

Разделение экстрактов и анализ ростовой активности in vitro. Четыре порции по 9 мг сухого остатка экстракта каждая растворяли в 0,5 мл сме-

си этанол — вода (1 : 1) и полученные растворы наносили в виде узкой полосы на пластинки силуфола (15×15 см). После высушивания пластинок на воздухе в течение 1 ч проводили хроматографирование в системе хлороформ — метанол (95 : 5) до прохождения фронта растворителей на 13 см. После высушивания пластинки разрезали на 10 одинаковых зон и затем зоны с R_f 0—0,3 элюировали последовательно 10 мл ацетона и 10 мл метанола, а остальные зоны — 2 раза по 10 мл ацетона. Элюаты упаривали в вакууме досуха. Контролем в опытах служили элюаты зон с пластинок, на старт которых наносили 0,5 мл смеси этанол — вода (1 : 1) и затем хроматографировали в указанных условиях. Сухие остатки растворяли в 0,03 мл этанола, затем добавляли по 2 мл 10^{-7} М раствора β -индолилуксусной кислоты в 2% водном растворе сахарозы и далее проводили биопробу на растяжение отрезков колеоптилей пшеницы [8]. Для каждой пробы опыт повторяли два раза и результаты изображали в виде гистограмм (рис. 2).

Определение ростовой активности индивидуальных веществ *in vitro* проводили в том же биотесте. Для получения концентраций $3 \cdot 10^{-4}$, $1 \cdot 10^{-4}$, $5 \cdot 10^{-5}$ и $1 \cdot 10^{-5}$ М к 2 мл 10^{-7} М раствора β -индолилуксусной кислоты в 2% водном растворе сахарозы добавляли по 0,03 мл спиртовых растворов веществ, имеющих концентрации $2 \cdot 10^{-2}$, $6,6 \cdot 10^{-3}$, $3,3 \cdot 10^{-3}$ и $6,6 \cdot 10^{-4}$ М соответственно. Точность определений находилась в пределах 1,3—1,5%.

Выделение и анализ суммарной фракции изофлавонов и птерокарпанов. 1,0 г сухого остатка экстракта тщательно растирали с 7 мл дистиллированной воды, подкисленной до pH 3,0, и полученную суспензию экстрагировали этилацетатом (5×7 мл) (А). Водный слой подщелачивали до pH 8,0, снова экстрагировали этилацетатом (3×10 мл) (Б), затем подкисляли до pH 7,5, еще раз экстрагировали этилацетатом (3×10 мл), после чего отбрасывали. Этилацетатные вытяжки (А) экстрагировали 5% водным раствором NaHCO_3 , бикарбонатный раствор подкисляли до pH 7,5, экстрагировали его этилацетатом (2×20 мл) (В) и отбрасывали. Этилацетатные растворы А, Б и В объединяли, упаривали в вакууме досуха и взвешивали.

Для получения Me_3Si -эфиров изофлавоны и птерокарпаны обрабатывали свежеперегнанным N,O -бис(триметилспил)ацетамидом (100 мкл/5 мг вещества, 5 мин при 20°C). Комбинированную ГЖХ-масс-спектрометрию Me_3Si -эфиров проводили на приборе ЛКВ-9000, снабженном колонкой размером 1000×3 мм с 1% OV-17 на газхроме Q (0,125—0,149 мм), при программировании температуры от 200 до 300°C со скоростью $4^\circ\text{C}/\text{мин}$, температура инжектора 320°C , молекулярного сепаратора и ионного источника 240°C , энергия ионизирующих электронов 70 эВ. Для анализа использовали по 2,5 мкг Me_3Si -эфиров индивидуальных веществ и по 50 мкг суммарных фракций изофлавонов и птерокарпанов. ГЖХ Me_3Si -эфиров проводили на приборе «Хром-4», снабженном колонкой размером 1000×3 мм с 5% SE-30 на хроматоне N-AW-HMDS (0,125—0,160 мм), температуру повышали от 200 до 320°C со скоростью $4^\circ\text{C}/\text{мин}$, температура инжектора 340°C , расход азота 15 мл/мин.

ЛИТЕРАТУРА

1. Фрайштат П. Д., Поправко С. А., Вульфсон Н. С. (1979) Биоорган. химия, 5, 228—231.
2. Поправко С. А., Садовская В. Л., Фрайштат П. Д., Хромова Л. М. (1973) в сб.: Прикладная ботаника и интродукция растений (под ред. Н. В. Цицина), с. 128, «Наука», М.
3. Popravko S. A., Fraishtat P. D., Wulfson N. S. (1976) 4th Indo-Soviet Symposium on the Chemistry of Natural Products, p. 81, Lucknow.
4. Фрайштат П. Д., Поправко С. А., Вульфсон Н. С. (1978) Биоорган. химия, 4, 563—565.
5. Bredenberg J. B., Nietala P. K. (1961) Acta chem. scand., 15, 696—699.
6. Bredenberg J. B., Nietala P. K. (1961) Acta chem. scand., 15, 936—937.

7. Chang Ch. F., Suzuki A., Kumai S., Tamura S. (1969) *Agr. and Biol. Chem.*, **33**, 398-408.
8. Кефели В. И., Турецкая Г. Х., Коф Э. М., Власов П. В. (1973) в сб.: Методы определения фитогормонов, ингибиторов роста, дефолиантов и гербицидов (под ред. Ю. В. Ракитина), с 7, «Наука», М.
9. Федоров А. К. (1970) Особенности развития зимующих сельскохозяйственных культур, «Колос», М.
10. Кононенко Г. П., Поправко С. А., Вульфсон Н. С. (1975) *Биоорган. химия*, **1**, 506-511.
11. Zucker M., Nitsch C. N., Nitsch J. P. (1965) *Amer J. Bot.*, **52**, 271-277.

Поступила в редакцию
19.II.1979

CLOVER SECONDARY METABOLITES. III. A CHANGE IN CONCENTRATION OF RED CLOVER ROOTS GROWTH INHIBITORS IN AUTUMN

POPRAVKO S. A., SOKOLOVA S. A., FRAISHTAT P. D., KONONENKO G. P.

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry,
Academy of Sciences of the USSR, Moscow;
V. R. Williams All-Union Fodder Research Institute,
Moscow region*

Isoflavones pseudobaptigenin, kalycosine and irilone, pterocarpan inermin, isochavibetol and its ethyl ether found in red clover roots proved to suppress at the concentration $3 \cdot 10^{-4}$ – 10^{-5} M the wheat coleoptile elongation induced in vitro by indoleacetic acid. The concentration of these compounds in Konishchevsky red clover roots was examined by means of gas-liquid chromatography of the trimethylsilyl ethers. It was established that the concentration of isoflavone formononetin as well as of pseudobaptigenin, kalycosine and pterocarpan inermin sharply decreases after natural hardening and vernalization.
