



УДК 547.972.02:582.632

ВТОРИЧНЫЕ МЕТАБОЛИТЫ КЛЕВЕРА
VI. ИЗОФЛАВОНЫ И ПТЕРОКАРПАНЫ В КОРНЯХ КЛЕВЕРА КРАСНОГО,
ИНОКУЛИРОВАННОГО КЛУБЕНЬКОВЫМИ БАКТЕРИЯМИ *

Поправко С. А., Соколова С. А.

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

Консенко Г. П.

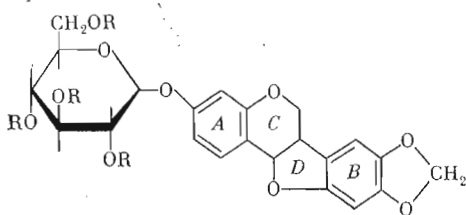
Всесоюзный научно-исследовательский институт кормов им. В. Р. Вильямса,
Московская область

Методом ГЖХ-масс-спектрометрии Me_3Si -эфиров суммарной фракции изофлавонов и птерокарпанов установлено, что в корнях сеянцев клевера красного, выращенных в стерильных условиях, содержится группа изофлавонов (формононетин (III), псевдобаптигенин (IV), биоханин А (VI), каликозин (V)) и отсутствуют птерокарпаны (инермин (II) и трифолиризин (I)). Инокуляция клубеньковыми бактериями не влияет на состав этой группы веществ в корнях. У равновозрастных растений, выращенных в полевых условиях, содержание птерокарпана (II), определенное методом ГЖХ, превышает содержание изофлавонов (III) и (IV). Изофлавоны ирилон (VII), обладающий высокой токсичностью против грибов *in vitro*, а также генистен (VIII) содержатся в корнях в концентрации менее 5 мг% к сухому веществу. Проведено сравнительное изучение токсичности соединений (I), (II), (IV)–(VIII) *in vitro* к *Sclerotinia trifoliorum* и *Botrytis cinerea*. Приведены и обсуждены данные масс-спектров Me_3Si -эфиров изофлавонов и птерокарпанов.

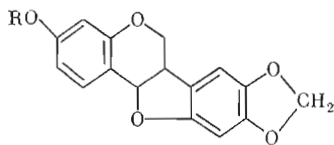
Для бобовых растений, и в частности клевера красного, характерно образование фитоалексинов птерокарпановой природы при воздействии различных биотических и абиотических факторов: инокуляция грибами, действие солями меди и ртути и т. д. [3, 4]. Образование фитоалексинов в наземной части растения наблюдается при инокуляции как патогенными, так и непатогенными для клевера грибами, причем первые оказались способными метаболизировать птерокарпаны, превращая их в менее токсичные производные [5, 6]. Индукция птерокарпанов в растении при инокуляции грибами, как указал Хийвеген [7], происходит в разной степени в зависимости от содержания в нем других веществ, обладающих антигрибной активностью.

Что касается реакции корней клевера красного на воздействие такого рода факторов, то она не была изучена. При выращивании клевера красного в естественных условиях Хитала [8] выделил из его корней и затем идентифицировал [9, 10] β -D-глюкозид инермина (I), названный трифолиризином. Позднее в корнях был идентифицирован и сам инермин (II) [11].

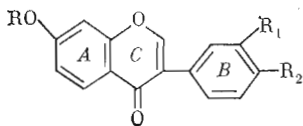
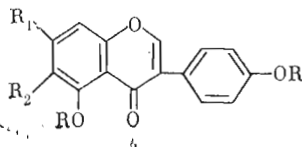
* Сообщения IV, V см. [1, 2].



(I) R = H

Me₃Si-(I) R = SiMe₃

(II) R = H

Me₃Si-(II) R = SiMe₃(III) R = R₁ = H, R₂ = OMe(IV) R = H, R₁ + R₂ = OCH₂O(V) R = H, R₂ = OMe, R₁ = OHMe₃Si-(III) R = SiMe₃, R₁ = H, R₂ = OMeMe₃Si-(IV) R = SiMe₃, R₁ + R₂ = OCH₂OMe₃Si-(V) R = SiMe₃, R₂ = OMe, R₁ = OSiMe₃(VI) R = R₂ = H, R₁ = OMe(VII) R = H, R₁ + R₂ = OCH₂O(VIII) R = R₂ = H, R₁ = OHMe₃Si-(VI) R = SiMe₃, R₁ = OMe, R₂ = HMe₃Si-(VII) R = SiMe₃, R₁ + R₂ = OCH₂OMe₃Si-(VIII) R = SiMe₃, R₁ = OSiMe₃, R₂ = H

В связи с тем что продуктивное долголетие клевера красного в значительной степени определяется состоянием его корневой системы, мы предприняли исследование реакции корней растений (выращенных как в стерильных условиях, так и в условиях полевого опыта) на инокуляцию клубеньковыми бактериями. Необходимые для этого семена клевера красного выращены при 25—27° С и непрерывном освещении в строго стерильных условиях. Двадцатидневные семена далее инокулировали суспензией клубеньковых бактерий (*Rhizobium trifolii*). Растения в естественных условиях выращивали в сплошном посеве, пробы отбирали в фазе кущения при образовании 5—7 настоящих листьев, а также в конце вегетационного периода после скашивания и начала отрастания. Корни после их отделения от наземной части измельчали и экстрагировали этиловым спиртом. Полученные экстракты анализировали далее на содержание изофлавонов и птерокарпанов.

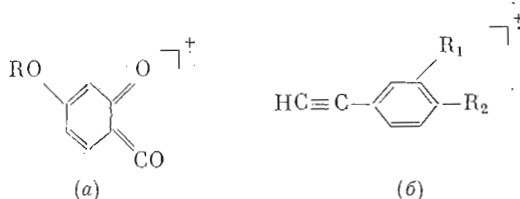
Ранее нами было показано [12], что изофлавоны и птерокарпаны можно анализировать методом ГЖХ в виде Me₃Si-эфиров на колонках с 5% SE-30/Chromaton-N-AW-HMDS. В настоящей работе мы использовали для этой цели колонки с 1,5% JXP/Chrom W, на которых анализируемые вещества имеют значительно более низкие температуры выхода. При этом триметилсилиловые эфиры инермина Me₃Si-(II), формонетина Me₃Si-(III) и каликозина Me₃Si-(V) выходят из колонки в виде индивидуальных пиков, а эфиры псевдобаптигенина Me₃Si-(IV) и биоханина Me₃Si-(VI), ирилона Me₃Si-(VII) и генистеина Me₃Si-(VIII) практически не разделяются. Триметилсилиловый эфир трифолиризина Me₃Si-(I) выходит при 290° С в виде размытого пика. Идентификацию изофлавонов и птерокарпанов осуществляли по масс-спектрам, комбинируя ГЖХ и масс-спектрометрию.

Масс-спектрометрическое исследование триметилсилиловых эфиров изофлавонов известного строения (III) — (VIII) показало, что таким путем можно надежно идентифицировать не только индивидуальные соединения, но и их смеси, не разделяемые методом ГЖХ. В спектрах эфиров изофлавонов (III) — (V) (см. табл. 1), не содержащих заместителей при С5, преобладающим по интенсивности является пик молекулярного иона и менее интенсивным пик иона (M — Me)⁺. Пики других ионов, за исклю-

Данные масс-спектров Me_3Si -эфиров изофлавонов (III)–(VIII)

Ионы	Вещество											
	Me_3Si -(III)		Me_3Si -(IV)		Me_3Si -(V)		Me_3Si -(VI)		Me_3Si -(VII)		Me_3Si -(VIII)	
	<i>m/e</i>	<i>I, %</i>	<i>m/e</i>	<i>I, %</i>	<i>m/e</i>	<i>I, %</i>	<i>m/e</i>	<i>I, %</i>	<i>m/e</i>	<i>I, %</i>	<i>m/e</i>	<i>I, %</i>
M^{++}	340	100	354	100	428	100	428	3	442	2	486	4
$(M-\text{Me})^+$	325	40	339	27	413	14	413	100	427	100	471	100
$(M-\text{CHO})^+$	311	1	325	1	399	23	399	1	413	<1	—	—
$(M-2\text{Me})^+$	310	1	324	2	398	68	398	2	412	<1	456	2
$(M-3\text{Me})^+$	295	<1	309	2	383	5	383	1	397	1	441	2
$(M-\text{Me}_3\text{Si})^+$	268	2	282	3	356	4	356	10	370	2	414	45
$(M-\text{Me}-\text{SiMe}_3)^+$	253	2	267	2	341	3	341	5	355	2	399	25
(a)	208	14	208	5	208	<1	—	—	—	—	296	2
(a+H)	209	4	209	4	209	2	239	<1	253	<1	297	1
(a-Me)	193	6	193	3	193	<1	—	—	—	—	—	—
(a-CO)	180	3	180	2	180	<1	—	—	—	—	—	—
б)	132	28	146	17	—	—	—	—	—	—	—	—

чением пика иона (б) в спектрах триметилсилиловых эфиров соединений (III) и (IV), имеют очень малую интенсивность. Пик при *m/e* 398 эфира (V) принадлежит иону $(M-2\text{Me})^+$ (переходу *m/e* 413→*m/e* 398 отвечает метастабильный пик при *m/e* 384,0, вычислено *m/e* 383,5). Этот ион, практически отсутствующий в спектрах триметилсилиловых эфиров соединений (III) и (IV), может быть использован для масс-спектрометрической идентификации каликозина (V).



В спектрах эфиров изофлавонов (VI) — (VIII), содержащих Me_3SiO -группу при C5 (см. табл. 1), пик молекулярного иона имеет интенсивность порядка 2–4%, а максимальной интенсивностью обладает пик иона $(M-\text{Me})^+$. Во всех случаях выбросу Me-группы из молекулярного иона соответствуют пики метастабильных ионов. Для триметилсилильных производных соединений: (VI), *m/e* 428→*m/e* 413 (найдено *m/e* 398,5, вычислено *m/e* 398,5); (VII), *m/e* 442→*m/e* 427 (найдено *m/e* 413,0, вычислено *m/e* 412,5) и (VIII), *m/e* 486→*m/e* 471 (найдено *m/e* 457,0, вычислено *m/e* 456,5). Таким образом, соотношение интенсивностей пиков молекулярного иона (M^+) и иона $(M-\text{Me})^+$ в спектрах триметилсилиловых эфиров изофлавонов может служить диагностическим признаком наличия заместителя при C5.

В масс-спектрах триметилсилиловых эфиров этой группы изофлавонов также присутствует пик иона $(M-2\text{Me})^+$ (переходу *m/e* 413→*m/e* 398 в спектре силилированного соединения (VI) соответствует пик метастабильного иона с *m/e* 383,5, вычислено 383,5). В спектрах триметилсилиловых эфиров соединений (VI) — (VIII) присутствуют максимальные по интенсивности пики ионов $(M-\text{Me})^+$.

Основные характеристические данные масс-спектров Me_3Si -эфиров трифолиризина и пнермина *

Ионы	Me_3Si -(I)		Me_3Si -(II)		
	m/e	$I, \%$	ионы	m/e	$I, \%$
M^{+}	734	4	M^{+}	356	100
$(A-\text{SiMe}_3)^{+}$	356	67	$(M-\text{Me})^{+}$	341	9
$(A+H)^{+}$	284	92	$(M-\text{OH})^{+}$	339	10
$(A+H-\text{Me})^{+}$	271	18	(θ)	206	9
$(T-H)^{+}$	450	12	(ε)	175	7
$(T-\text{Me}_3\text{SiOH})^{+}$	361	58	(σ)	162	9

* Обозначения ионов А и Т, соответствующие агликонной и углеводной частям молекулы, взяты нами из работы [15].

Таблица 3

Содержание пнермина (II) и изофлавонов (III)–(VI) (мг% к сухому веществу) в корнях клевера красного при разных условиях выращивания, определенное ГЖХ в виде триметилсилиловых эфиров

Вещество	Температура выхода эфира *, °C	Условия выращивания			
		стерильные	стерильные с инокуляцией клубеньковыми бактериями	естественные	
				фаза кущения	фаза отрастания
(II)	197	—	—	209	214
(III)	210	175	145	83	415
(IV)				22	148
(V)	220	62	41	Следы	123
(VI)	215	99	93	—	—

* Дана для условий комбинированной ГЖХ-масс-спектрометрии.

Таблица 4

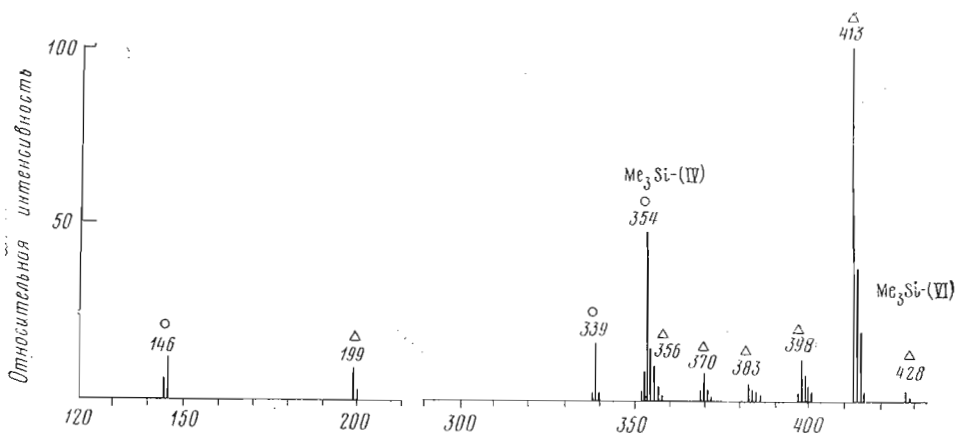
Действие птерокарпанов и изофлавонов в концентрации 0,2 мМ на рост мицелия *B. cinerea* и *S. trifoliorum*

Вещество	<i>B. cinerea</i>		<i>S. trifoliorum</i>	
	диаметр колонии, мм	% подавления к контролю	диаметр колонии, мм	% подавления к контролю
Контроль без вещества	25,7±0,3	0	10,0±0,7	0
(I)	—*	—*	9,0±0,3	10,0
(II)	10,3±0,3	73,4	7,9±0,6	21,0
(IV)	26,1±0,4	+**	10,0±0	0
(V)	19,6±0,4	23,7	10,6±0,6	+**
(VI)	21,2±0,2	17,5	9,3±0,4	7,0
(VII)	24,0±0,5	6,6	7,3±0,2	27,0
(VIII)	20,3±0,3	21,0	9,3±0,4	7,0

* Не определяли.

** Прирост превышает контроль.

У триметилсилиловых эфиров (VI)–(VIII) пики характеристических ионов, за исключением пика иона $[M-\text{Me}_3\text{Si}-\text{Me}]^{+}$ в спектре соединения (VIII), имеют низкую интенсивность. Такой путь фрагментации подтверждается присутствием в спектре этого эфира пика метастабильного иона (m/e 414→ m/e 399; найдено m/e 384,5, вычислено m/e 384,5). Таким образом, для масс-спектра триметилсилилового эфира генистеина (VIII) харак-



Масс-спектр фракции, содержащей $\text{Me}_3\text{Si}-(\text{IV})$ и $\text{Me}_3\text{Si}-(\text{VI})$, полученной при анализе корней семян клевера красного, выращенных в стерильных условиях. Кругом обозначены пики, отвечающие фрагментации $\text{Me}_3\text{Si}-(\text{IV})$, треугольником — пики, отвечающие фрагментации $\text{Me}_3\text{Si}-(\text{VI})$

терно наличие трех интенсивных пиков ионов с m/e 471, 414 и 399 и среднеинтенсивного пика иона с m/e 228, которые могут быть использованы для идентификации его методом хромато-масс-спектрометрии.

В спектрах всех изученных эфиров присутствуют также слабые по интенсивности пики ионов $(M-3\text{Me})^+$. В спектре производного (V) образование иона $(M-3\text{Me})^+$ подтверждается наличием метастабильного пика (m/e 398 \rightarrow m/e 383; найдено m/e 370,0, вычислено m/e 368,6). Заряженные фрагменты ретродиенового распада (ионы (а), (б) и т. д.), которые хорошо выявляются в спектрах полных метиловых эфиров изофлавонов [13, 14], обнаруживаются только в спектрах триметилсилиловых эфиров изофлавонов (III) и (IV). Пики этих ионов в масс-спектрах остальных соединений отсутствуют.

Характер фрагментации триметилсилилового эфира трифолиризина в целом аналогичен распаду триметилсилиловых эфиров гликозидов флавонов, описанному недавно [15, 16]. Его масс-спектр приведен в табл. 2. Преобладающим по интенсивности является пик иона с m/e 73. Пик молекулярного иона имеет интенсивность 4%. Расщепление связи агликон — сахар сопровождается переносом H-атома и Me_3Si -группы и приводит к образованию трех заряженных фрагментов, содержащих агликон $(A-\text{Me}_3\text{Si})^+$ (m/e 356), $(A+H)^+$ (m/e 284), $(A+H-\text{Me})^+$ (m/e 271), причем наиболее интенсивен среди них пик иона $(A+H)^+$ (92%). Как и в случае триметилсилиловых эфиров гликозидов флавонов [15, 16], в спектрах присутствуют ионы $(T-H)^+$ (m/e 450) и $(T-\text{Me}_3\text{SiOH})^+$ (m/e 361), характеризующие остатки сахара. В области меньших значений массовых чисел наблюдается также ряд ионов, образующихся в результате распада остатка гексозы и обнаруженных ранее в масс-спектрах триметилсилиловых эфиров флавоноидов [15] (m/e 217, 204, 147).

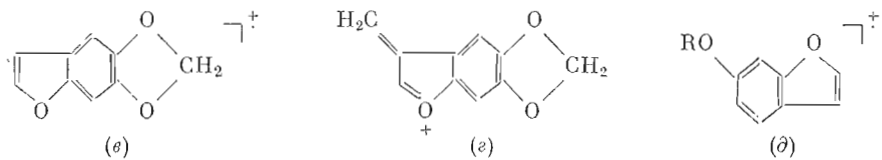
В спектре триметилсилилового эфира инермина преобладающим по интенсивности является пик молекулярного иона (m/e 356), осколочные ионы имеют интенсивность не более 10% (см. табл. 2). Выбросу Me и OH-группы из молекулярного иона соответствуют пики метастабильных ионов (m/e 356 \rightarrow m/e 341, найдено m/e 326,5, вычислено m/e 326,6; m/e 356 \rightarrow m/e 339, найдено m/e 323,0, вычислено m/e 322,8). Ионы с m/e 162 и 175 присутствуют в спектрах как соединения (II), так и его триметилсилильного производного. Это указывает на то, что они содержат элементы колец B и D и, по-видимому, имеют структуры (е) и (з). В спектре соединения (II) присутствует пик иона с m/e 134, отсутствующий в спектре силилированного производного, однако в спектре послед-

Действие изохавибетол и этилового эфира изохавибетол
в разных концентрациях на рост мицелия *B. cinerea* и *F. oxysporum*
% подавления по отношению к контролю

Концентрация вещества, мг/л	<i>B. cinerea</i>		<i>F. oxysporum</i>	
	изохавибетол	этиловый эфир изохавибетол	изохавибетол	этиловый эфир изохавибетол
100	74,4	100,0	100,0	100,0
80	68,4	100,0	74,5	56,4
60	62,4	92,4	60,5	66,0
40	56,1	74,5	50,0	53,6
20	49,8	23,1	28,0	28,8
10	24,4	+ *	Не определяли	6,8

* Прирост превышает контроль.

него присутствует пик иона, сдвинутый на 72 массовые единицы в область больших значений массовых чисел (m/e 206). Этот ион содержит элементы колец A и C и, по-видимому, имеет структуру (δ).



Масс-спектр фракции, содержащей триметилсилиловые эфиры (IV) и (VI) (получена при анализе корней сеянцев клевера красного, выращенных в стерильных условиях), приведен на рисунке. Результаты определения содержания изофлавонов и птерокарпанов в корнях приведены в табл. 3. Как видно из этих данных, растения, выращенные в стерильных условиях, отличаются от выращенных в полевых условиях тем, что в их корнях полностью отсутствует инермин (II), а также, судя по данным ГЖХ*, и его глюкозид (I). На отсутствие птерокарпанов в корнях растений клевера красного, выращенных в стерильных условиях, ранее указывал и Хийвеген [17]. Однако экспериментальных доказательств, подтверждающих это, он не привел.

В зависимости от условий выращивания наблюдаются заметные различия в содержании в корнях изофлавонов. Корни растений, которые были выращены в стерильных условиях, содержат биоханин А (VI) наряду с формонетинном (III), псевдобаптигенином (IV) и каликозином (V), присутствующими в относительно больших количествах (см. рисунок). Идентификация биоханина А была осуществлена по времени удерживания и масс-спектру его триметилсилильного производного (см. рисунок и табл. 1). Это соединение не обнаружено в корнях растения, выращенного в естественных условиях.

Инокуляция клубеньковыми бактериями не привела к существенному изменению состава экстракта корней в отношении исследуемой группы веществ: в них также отсутствовали инермин (II) и трифолиризин (I), а содержание изофлавонов (III)–(VI) сравнимо с тем, что было до инокуляции (см. табл. 3). Этот результат, очевидно, дополнительно свидетельствует о глубоком симбиозе бобового растения с азотфиксирующими бактериями, поскольку в ранних работах выяснено [4, 5], что воздействие на растения не только патогенных, но и непатогенных грибов всегда приводит к четко выраженной защитной реакции образования фитоалексинов птерокарпановой природы.

* Количественное определение содержания (I) не проводилось ввиду размытости его пика на хроматограммах.

В инокулированных клубеньковыми бактериями корнях клевера красного отсутствовал инермин, обладающий, по литературным данным, высокой антигрибной активностью *in vitro* [18]. Поэтому представляло интерес выяснить, не обладают ли таким защитным действием изофлавоны (IV) — (VIII), а также описанные ранее [19] изохавибетол и его этиловый эфир. С этой целью испытания были проведены с грибами *Fusarium oxysporum* (один из возбудителей корневой гнили) и *Sclerotinia trifoliorum* (возбудитель клеверного рака) и непатогеном *Botrytis cinerea*. Токсичность веществ оценивали в условиях биотеста по лишайному росту мицелия грибов.

Как следует из данных табл. 4, наибольшую антигрибную активность в выбранной концентрации 0,2 мМ проявили по отношению к *B. cinerea* инермин, а по отношению к *S. trifoliorum* — инермин и ирилон. Остальные испытанные изофлавоны также проявили определенную токсичность по отношению к обоим взятым для испытания грибам, однако во всех случаях она оказалась меньше, чем у инермина. Результаты испытаний формонетина по отношению к грибам *F. solani* и *Aphanomyces euteiches*, опубликованные недавно [20], также указывают на сходный уровень активности: при концентрации 0,1 мМ она составила 18,1 и 16,7% соответственно.

Обращает на себя внимание тот факт (см. табл. 4), что все испытанные соединения оказались гораздо более активными по отношению к непатогенному грибу, чем к патогенному. Такой результат был получен при тестировании инермина и медикарпина по отношению к патогену *Kabatella caulivora* и непатогенному грибу [21]. Очевидно, этим же объясняется и выявленный ранее высокий уровень токсичности инермина ($ED_{50} < 20$ мкМ) против непатогенного для клевера гриба *Monilinia fructicola*, полученный в том же биотесте [18].

В табл. 5 приведены данные по антигрибной активности изохавибетола и этилового эфира изохавибетола *in vitro*. Из них следует, что оба соединения в концентрациях от 20 до 100 мг/л обладают значительной токсичностью. В концентрации 40 мг/л, которая приблизительно соответствует концентрации, выбранной для испытания изофлавонов и инермина (0,2 мМ), подавление роста мицелия грибов составляет 50—70%, т. е. по своему уровню приближается к ингибированию инермином.

Результаты изучения содержания инермина и изофлавонов в экстрактах корней растений первого года жизни в начале вегетационного периода (кущение) показывают, что содержание в них инермина составляет в среднем 209 мг% к сухому веществу у изученных сортов (см. табл. 3). Содержание изофлавонов (III) и (IV) в этот период гораздо меньше, чем содержание в них инермина. В конце вегетационного периода (отрастание после скашивания) содержание изофлавонов (III) — (V) в корнях резко возрастает, а содержание инермина практически не изменяется и составляет по сортам в среднем 214 мг%. Среди изофлавонов в этот период по содержанию преобладает формонетин (III) (415 мг%), а содержание псевдобаптигенина (IV) и каликозина (V) составляет в среднем 148 и 123 мг% соответственно. Интересно, что биоханин А (VI) в экстрактах не был обнаружен. Кроме того, изофлавоны ирилон (VII) и генистеин (VIII), а также изохавибетол и его этиловый эфир не были обнаружены ни в одном из изученных нами вариантов, так как их содержание в корнях, составляющее для ирилона 2,7 мг% [13], для изохавибетола 0,23 мг% и для его этилового эфира 3,9 мг% к сухому веществу [19], находилось ниже предела чувствительности выбранного нами метода (ГЖХ-анализ), т. е. ниже 5 мг%. Однако именно эти вещества наряду с инермином оказались *in vitro* наиболее активными против грибов.

Таким образом, в корнях клевера красного, выращенного в естественных условиях, в ходе вегетации накапливаются в больших количествах те соединения изофлавоновой природы, которые *in vitro* малотоксичны

для грибов. Эндogenous вещества, обладающие высокой токсичностью (ирилон, производные 5-(пропен-1'-ил)пирокатехина), находятся в корнях в следовых количествах. Что касается инермина, полностью отсутствующего в растениях, выращенных в стерильных условиях, то он так же, как и изофлавоны, содержится в корнях клевера при выращивании его в естественных условиях в весьма значительном количестве, которое намного превышает его содержание в наземной части. Наблюдающееся, несмотря на это, довольно частое поражение корневой системы грибами заболеваниями может быть связано со способностью патогенных грибов превращать это соединение в ряд менее токсичных производных, а также с выявленным нами ранее фактом резкого снижения содержания инермина и других изофлавонов в ходе закалывания [12]. Нельзя исключить и того, что продукты детоксикации инермина патогеном ввиду их высокого содержания в корнях могут оказаться токсичными для растения и таким образом снижать защитный эффект этой группы полифенолов. В связи с этим особый интерес представляет изучение дополнительных факторов устойчивости клевера красного, в частности выявление в нем других высокоактивных метаболитов и оценки их содержания в сортах, контрастных по своей устойчивости к заболеваниям. Это относится в первую очередь к недавно описанному трифолиану [2], ирилому и производным 5-(пропен-1'-ил)пирокатехина, обнаружившим повышенную фунгитоксичность.

Экспериментальная часть

В качестве заведомых образцов использовали инермин (II), трифолизин (I), ирилон (VII), каликозин (V), выделенные ранее из корней клевера красного [11, 13, 22]*, формопонетин (III), псевдобангигенин (IV), биоханин А (VI), генистеин (VIII) (Serva, США), изохавибетол и его этиловый эфир, полученные синтетически [19]. Получение триметилсилиловых эфиров изофлавонов и птерокарпанов и их ГЖХ проводили в условиях, описанных ранее [12]. Комбинированную ГЖХ-масс-спектрометрию триметилсилиловых эфиров проводили на приборе ЛКВ-9000, снабженном колонкой (1000×3 мм) с 1,5% JXR/Chrom W-HP (100–120 меш). Температуру повышали со 100 до 220° С со скоростью 6° С/мин и с 220 до 300° С со скоростью 10° С/мин.

Использовали корни клевера красного первого года жизни в вегетативной фазе развития (сорта «Конищевский», «Северодвинский-289», «Полтавский-75», «Узбекистанский-3»). Пробы отбирали 18 июля и 20 сентября 1978 г. на опытном участке Центральной экспериментальной базы ВНИИ кормов им. В. Р. Вильямса.

1. *Выращивание семян клевера красного в искусственных условиях.* Семена клевера красного (сорт «Конищевский») скарифицировали обработкой конц. H_2SO_4 в течение 30 мин и затем стерилизовали 3 мин в 1% водном растворе $KMnO_4$. Далее семена проращивали на 0,5% бобовом агаре в темноте при 24° С в течение 3 сут. Отобранные неинфицированные проростки высотой 10–20 мм размещали на жидкую среду Кнопа в закрытые стеклянные пробирки размером 340×40 мм и выращивали при температуре 25–27° С и непрерывном освещении 5000 лк в течение 36 сут. Оценка стерильности проводилась в течение всего опыта и состояла в отборе двух капель питательного раствора из каждой пробирки на бобовый агар и выдерживании его при 24° С в течение 3 сут. Высота растений к моменту уборки $15,8 \pm 0,2$ см, длина корней $24,5 \pm 0,3$ см, число настоящих листьев $3,9 \pm 0,04$. Инокуляцию клубеньковыми бактериями *Rhizobium trifolii* проводили на 20-е сутки выращивания путем добавления (по каплям) бактериальной суспензии в среду Кнопа.

* Авторы приносят искреннюю благодарность П. Д. Фрайштат, любезно предоставившей образцы этих соединений, а также этиловый эфир изохавибетола для проведения биологических испытаний и ГЖХ.

2. *Получение и анализ экстрактов корней клевера.* От 100 семян каждого варианта (стерильные условия, инокуляция *R. trifolii*) отделяли корни. Четыре пробы по 10 г грубо измельчали и фиксировали 20 мл кипящего этанола. Далее пробы гомогенизировали и экстрагировали спиртом (20 мл×3). Спиртовые экстракты упаривали в вакууме досуха ($22,0 \pm \pm 0,1\%$ к сухому веществу). От 30–40 растений, выращенных в естественных условиях, отделяли корни и четыре пробы по 5 г грубо измельчали, фиксировали и экстрагировали как описано выше. Сухой остаток спиртового экстракта составлял в среднем по сортам $22,5 \pm \pm 0,1\%$ к сухому веществу. Полученный сухой остаток растворяли в 10 мл суспензии этилацетата с водой, подкисленной до pH 3,0, и тщательно смывали колбу этой же суспензией (10 мл×2) в делительную воронку. Подкисление здесь и далее проводили 2 н. H_2SO_4 , подщелачивание — 5% водным раствором $NaHCO_3$. После расслаивания суспензии этилацетатный слой отделяли (экстракт 1), а водный слой экстрагировали этилацетатом (10 мл×5) (экстракт 2), затем его подщелачивали до pH 7,5, снова экстрагировали этилацетатом (10 мл×3) (экстракт 3) и затем отбрасывали. Экстракты 1–3 объединяли и обрабатывали 17 мл 5% водного раствора $NaHCO_3$, затем водный слой подкисляли до pH 7,5, экстрагировали этилацетатом (10 мл×3) (экстракт 4) и далее отбрасывали. Экстракт 1–4 объединяли, сушили над Na_2SO_4 и упаривали в вакууме досуха. Полученный сухой остаток составлял $4,2 \pm \pm 0,9\%$ к сухому веществу для семян, выращенных в искусственных условиях, и $7,2 \pm \pm 0,9\%$ для растений, выращенных в естественных условиях. В каждом случае $1/5$ по весу часть полученного сухого остатка заливали 0,1 мл N,O-бис(триметилсилил)ацетамида (20° С, 5 мин) и 1 мкл полученного раствора анализировали методом ГЖХ. Результаты (среднее по трем повторностям) приведены в табл. 3.

3. *Определение токсичности изофлавонов и инермина in vitro.* Культуры *B. cinerea* и *F. oxysporum* были получены из Института биохимии им. А. Н. Баха АН СССР. *S. trifoliorum* была выделена из склеродий, собранных на полях Центральной экспериментальной базы ВНИИ кормов в 1976/77 г. Для получения концентрации 0,2 мМ предварительно приготовленные 0,3 мл 33 мМ спиртового раствора вещества (при необходимости для полного растворения его однократно доводили до кипения) вливали в 50 мл 0,5% агаризованной среды Чапека, нагретой до 80° С. Аналогично готовили растворы с необходимыми весовыми концентрациями (см. табл. 5). В качестве контроля использовали ту же среду, содержащую 0,6% добавку спирта. После тщательного перемешивания раствор вещества разливали в 10 чашек Петри (\varnothing 4 мм). После застывания агара в центр каждой чашки помещали равные кусочки мицелия 10–12-дневной культуры гриба (3×3 мм) и инкубировали их в термостате в темноте при 24° С в течение 4 (*B. cinerea*, *F. oxysporum*) и 5 сут (*S. trifoliorum*), после чего измеряли диаметр колоний в каждой чашке с точностью до 1 мм. В контроле средний диаметр колонии составлял 25,7 мм (*B. cinerea*), 35,0 мм (*F. oxysporum*) и 10,0 мм (*S. trifoliorum*). Результаты опыта, осуществленного в 10 повторностях, обрабатывали математически. В табл. 4 приведены данные со значениями абсолютной ошибки выборочной средней, в табл. 5 даны средние значения трех параллельных опытов. Стандартное отклонение во всех случаях не превышало 1%.

ЛИТЕРАТУРА

1. Фрайштат П. Д., Поправко С. А. (1979) Химия природн. соед., 729–730.
2. Фрайштат П. Д., Поправко С. А., Вульфсон Н. С. (1979) Биоорган. химия, 5, 1879–1880.
3. Higgins V. J., Smith D. G. (1972) Phytopathology, 62, 235–238.
4. Dewick P. M. (1975) Phytochemistry, 14, 979–982.
5. Bilton J. N., Debnam J. R., Smith I. M. (1976) Phytochemistry, 15, 1411–1412.
6. Debnam J. R., Smith I. M. (1976) Physiol. and Plant Pathol., 9, 9–23.

7. Hijwegen T. (1977) *Netherl. J. Plant. Pathol.*, **83**, 161–163.
8. Nietala P. K. (1960) *Ann. Acad. Sci. Fennicae, Series A II Chemica*, **100**, 54–62.
9. Bredenberg J. B., Nietala P. K. (1961) *Acta chem. scand.*, **15**, 696–699.
10. Bredenberg J. B., Nietala P. K. (1961) *Acta chem. scand.*, **15**, 936–937.
11. Поправко С. А., Садовская В. Л., Фрайштат П. Д., Хромова Л. М. (1973) Прикладная ботаника и интродукция растений, с. 128, «Наука», М.
12. Поправко С. А., Соколова С. А., Фрайштат П. Д., Ковоненко Г. П. (1979) *Биоорган. химия*, **5**, 1654–1661.
13. Фрайштат П. Д., Поправко С. А., Вульфсон Н. С. (1979) *Биоорган. химия*, **5**, 228–233.
14. Itagaki Y., Kurokawa T., Sasaki Sh., Chang Ch.-F., Chen F.-Ch. (1966) *Bull. Chem. Soc. Japan*, **39**, 538–543.
15. Schels H., Zinsmeister H. D., Pflieger K. (1977) *Phytochemistry*, **16**, 1019–1023.
16. Schels H., Zinsmeister H. D., Pflieger K. (1978) *Phytochemistry*, **17**, 523–526.
17. Hijwegen T. (1973) *Phytochemistry*, **12**, 375–380.
18. Perrin D. R., Cruickshank I. A. M. (1969) *Phytochemistry*, **8**, 971–978.
19. Фрайштат П. Д., Поправко С. А., Вульфсон Н. С. (1978) *Биоорган. химия*, **4**, 563–565.
20. Van Etten H. D. (1976) *Phytochemistry*, **15**, 655–659.
21. Sakuma T., Yoshihara T., Sakamura S. (1976) *Biochemistry and Cytology of Plant-Parasite Interaction*, p. 223–232, Osaka.
22. Popravko S. A., Fraishtat P. D., Wulfson N. S. (1976) 4th Indo-Soviet Symposium on the Chemistry of Natural Products, p. 81, Lucknow.

Поступила в редакцию
11.IX.1979

CLOVER SECONDARY METABOLITES. VI. ISOFLAVONES AND PTEROCARPANS IN RED CLOVER ROOTS INOCULATED WITH NODULE BACTERIA

POPRAVKO S.A., SOKOLOVA S.A., 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*

Using GLC-MS of Me₃Si-ethers of isoflavone and pterocarpan total fractions, it was established that the roots of red clover seedlings grown in sterile conditions contained the group of isoflavones – formononetin (III), pseudobaptigenin (IV), biochanin A (VI), and kalikosine (V), but no pterocarpan – maackiain (inermine) (II) or trifolirizin (I). The composition of this group of compounds in roots was unchanged after inoculation of seedlings with nodule bacteria (*Rhizobium trifolii*). The concentration of pterocarpan (II) in roots analyzed by GLC method exceeded that of isoflavones (III) and (IV) in equal-aged seedlings grown in field. Isoflavones genistein (VIII) and irionone (VII) which manifested in vitro a high toxicity against fungi were present in roots in the concentration less than 5 mg% dry matter. Comparative toxicity of compounds (I), (II), (IV) – (VIII) against *Sclerotinia trifoliorum* and *Botrytis cinerea* was assayed in vitro. The data on mass spectra of Me₃Si-ethers of isoflavones and pterocarpan are discussed.