

Академик А. С. САДЫКОВ, Л. В. МЕТЛИЦКИЙ,
А. К. КАРИМДЖАНОВ, А. И. ИСМАИЛОВ, Р. А. МУХАМЕДОВА,
М. Х. АВАЗХОДЖАЕВ, Ф. Г. КАМАЕВ

ИЗОГЕМИГОССИПОЛ — ФИТОАЛЕКСИН ХЛОПЧАТНИКА

Обобщение многочисленных исследований, проведенных с различными растениями (1), показывает, что в явлениях фитоиммунитета большое значение имеет способность растений продуцировать в ответ на инфекцию антибиотические вещества — фитоалексины, практически отсутствующие в интактных тканях. Важная роль фитоалексинов установлена и в устойчивости хлопчатника к возбудителю инфекционного увядания — вилта (2-8). Однако о химической природе фитоалексинов хлопчатника в литературе приводятся разные данные. Так вилтоустойчивость хлопчатника (2-3) коррелирует со скоростью образования «госсипол-эквивалента», основу которого (60-80%) образует госсипол. По другим данным (6, 7), основную часть «госсипол-эквивалента» составляет вергосин и гемигоссипол. При этом вилтоустойчивость хлопчатника коррелирует с содержанием вергосина.

Мы изучили химическую природу и фунгитоксичность одного из фитоалексинов хлопчатника, инфицированного *Verticillium dahliae*.

Для исследований использовали очищенную от коры ксилему стеблей здоровых и инфицированных *V. dahliae* растений длиной 25-30 см, считая от корневой шейки. Ткань измельчали, экстрагировали очищенным хлороформом в отношении 1 : 5, концентрировали под вакуумом в атмосфере азота при 40°.

Таблица 1

Фунгитоксичность соединений, элюированных с хроматограммы после разделения экстракта стебля инфицированного хлопчатника сорта 108-ф

	Зоны роста ингибирования						
	1	2	3	4	5	6	7
Подавление прорастания конидия, %	29	31	24	72	50	50	15
роста гиф, %	32	33	36	79	47	49	18

Примечание. Растворитель бензол : метиловый спирт (9 : 1) (в объемных отношениях).

Экстракты разделяли на силикагеле. Проявление хроматограммы флороглюцином показало присутствие в экстракте от 3 до 8 госсиполоподобных соединений, что зависело от вилтоустойчивости растений и степени их поражения. Наибольший набор этих веществ обнаружен в вилтоустойчивых сортах Ташкент 1 и 3.

Сопоставление со значением R_f свидетеля и характер окраски с флороглюцином позволили нам предположить, что в экстрактах ксилемы из инфицированных растений хлопчатника почти полностью отсутствует (либо

присутствует только в виде следов) госсипол, который в больших количествах был обнаружен нами в коре стебля и корня здоровых и инфицированных растений хлопчатника.

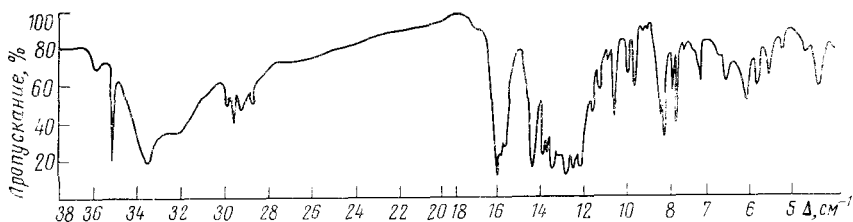


Рис. 1. И.-к. спектр вещества № 4. (прибор UR-20, таблетки с KBr)

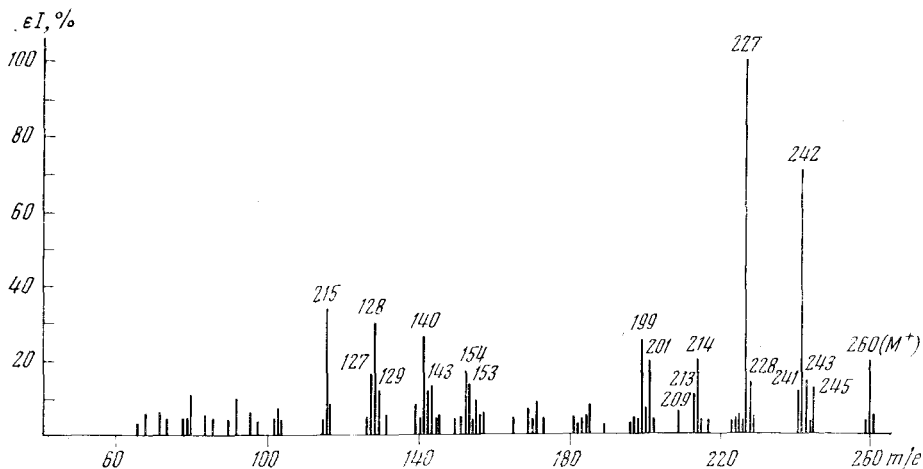


Рис. 2. Масс.-спектр вещества № 4 (прибор МХА-1303)

Зоны хроматограммы, соответствующие отдельным веществам, элюировали этиловым эфиром (до полноты измельчения), концентрировали и испытывали на фунгитоксичность по отношению к конидиям *V. dahliae*. В результате были обнаружены три зоны ингибирования, соответствующие веществам №№ 4, 5 и 6 (табл. 1); из них максимальной токсичностью обладало соединение № 4, дающее ярко-малиновую окраску при проявлении флороглюцином, которое и послужило предметом последующей идентификации.

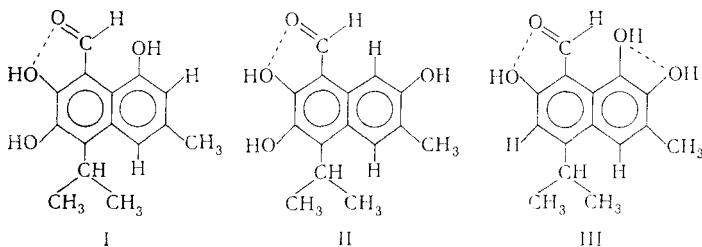
Для накопления вещества № 4 10 кг измельченных стеблей больных растений хлопчатника сорта 108-ф трижды экстрагировали хлороформом. Объединенные хлороформные экстракты концентрировали и упаривали досуха под вакуумом в токе азота при температуре 35–40° и экстрагировали петролейным эфиром. Экстракт петролейного эфира концентрировали и наносили на колонки силикагеля КСК (3,5×130 см). Колонки последовательно промывали петролейным эфиром и смесью растворителей: петролейный эфир : бензол : метиловый спирт — 80 : 15 : 5 и 55 : 40 : 5, а затем бензол : метиловый спирт — 95 : 5 и 90 : 10. Фракции, содержащие вещество № 4, перехроматографировали несколько раз, получали элюат, дающий одно пятно на силикагеле. После упаривания растворителя и перекристаллизации из водного ацетона удалось выделить 80 мг кристаллического вещества с т. пл. 142–144° (с разложением) — игольчатые кристаллы желтого цвета с зеленоватым оттенком, хорошо растворимые в спирте, ацетоне, этилацетате, эфире, хлороформе, плохо растворимые в бензоле и нерастворимые в воде. Вещество № 4, в отличие от госсипола, с флороглюцино-

вым реактивом реагирует медленно, давая малиновое окрашивание; нагревание ускоряет реакцию. Величина ЭД₅₀ вещества № 4 для роста гиф *V. dahliae* равна 10 мкг/мл. Полное подавление достигалось при концентрации 50 мкг/мл. У.-ф. спектр вещества (в хлороформе) имеет максимум поглощения при λ 267 нм, указывающий на наличие ароматического ядра, и λ 365 нм. И.-к. спектр вещества (рис. 1) сходен со спектром госсипола (9). В и.-к. спектре отмечены полосы поглощения при ν 3520⁻¹ см (ОН...ОН), 3360⁻¹ см (ОН...О=C-H), 2980, 2960, 2925, 2870 см⁻¹ (СН, СН₂) и 1610⁻¹ см (Н-C=O...НО). В масс-спектре (рис. 2) имеется интенсивный пик молекулярного иона с m/e 260 (M⁺) и малоинтенсивный пик иона с m/e (M-1)⁺, соответствующий потере атома водорода. Фрагментация вещества начинается элиминированием 15 массовых единиц с образованием ионов с m/e 245 (M-CH₃), 243 (M-OH), 242 (M-H₂O) и иона с m/e 214 (M-CH₂O₂).

Образование ионов с m/e (M-H₂O) и (M-OH), а также отщепление 17, 18 массовых единиц из ионов с m/e 243, 242 и 227 указывает на присутствие в молекуле нескольких гидроксильных групп. Ионы с m/e 217, 214, 200, 199, 185 и 171, 169, 153 образуются при элиминировании СО, СНО, СНО₂ и СН₂O₂-групп из различных фрагментов вещества № 4. Потеря разнообразных групп атомов при фрагментации соединения № 4 из молекулярного иона и из различных фрагментов молекулы указывает на существование его в различных таутомерных формах, что характерно и для госсипола (10).

В спектре п.м.р. вещества № 4 (раствор в CdCl₂) наблюдаются следующие сигналы. Шестипротонный дублет при 1,42 м.д. принадлежит метильным протонам изопропильного радикала, взаимодействующим с метиновым протоном этой группы (3,76 м.д.) с константой $J=7$ гц. Положение сигнала метильной группы (2,32 м.д.) характерно для метильных групп, присоединенных к ароматическим системам. Интегральные интенсивности остальных сигналов соответствуют одному протону, и распределение сигналов (синглеты) следующее: 5,55; 6,23; 6,60; 7,46; 11,50; 14,95 м.д. Встряхивание образца с D₂O позволило идентифицировать сигналы гидроксильных групп (5,55; 6,23; 14,97 м.д.). Положение остальных сигналов характерно для протона альдегидной группы (11,50 м.д.) и олефиновых протонов (6,60 и 7,46 м.д.).

Сравнение спектра вещества № 4 со спектрами п.м.р. госсипола и его производных (11-13) указывает на то, что исследуемое вещество является госсиполоподобным соединением, причем отличается от госсипола наличием в спектре п.м.р. сигнала еще одного ароматического протона (6,60 м.д.). Этот факт, а также наличие в масс-спектре пика с m/e 260 показывает, что выделенное соединение состоит из одного нафтильного радикала, с метильной, изопропильной, альдегидной и тремя гидроксильными группами. Расположение сигнала одной из гидроксильных групп в области очень низкого поля (14,97 м.д.) свидетельствует о наличии сильной внутримолекулярной водородной связи, что возможно при орто-расположении гидроксильной и альдегидной группы (13). Таким образом, вещество № 4 можно представить одной из трех формул:



Выбор между этими формулами сделан на основании опытов по двойному резонансу, при изучении ядерного эффекта Оверхаузера (я.э.О.) (¹³, ¹⁴). При облучении полем H₂ сигнала метильной группы (2,32 м.д.) сигнал ароматического протона (7,46 м.д.), расположенного в орто-положении к метильной группе, увеличивает свою интенсивность на 27%, в то время как интенсивность другого сигнала остается без изменений, т. е. проведенный эксперимент исключает формулу (I), в которой оба протона должны обнаруживать я.э.О. в одинаковой степени. Кроме того, для формы (I) должна наблюдаться метаконстанта сигналов обоих протонов ($J \sim 1,5-2,5$ гц), чего не наблюдается в спектре вещества № 4. При облучении полем H₂ сигналов метильных групп изопропильного радикала сигнал протона при 7,46 м.д. увеличивает свою интенсивность на 20%, сигнал при 6,60 м.д. — на 18%, что свидетельствует о равной степени удаленности этих протонов от метилов изопропильного радикала. Подобная ситуация соответствует форме (III), а не (II), в которой расстояние между ароматическими протонами и изопропильным радикалом существенно различаются. Таким образом, на основании спектра п.м.р. с экспериментами по я.э.О. заключаем, что вещество № 4 имеет строение (III). По данным у.-ф., и.-к. спектроскопии, масс-спектрометрии и спектроскопии п.м.р., а также на основании физико-химических свойств наиболее вероятной для вещества № 4 является формула 1, 2, 7-тригидрокси-3-метил-5-изопропил-8-альдегидонафтил. Идентифицированное вещество нами названо изогемигоссиполом.

Ранее показано, что изогемигоссипол отсутствует в интактных тканях хлопчатника и у возбудителя вилта, в вилтоустойчивых сортах он обнаружен в больших количествах, чем в восприимчивых. В тех же количествах, в которых изогемигоссипол обнаружен в экстрактах вилтоустойчивых сортов, он способен полностью подавлять конидий *V. dahliae*.

Все изложенное дает нам основания рассматривать изогемигоссипол как один из фитоалексинов хлопчатника.

Отдел биоорганической химии
Академии наук УзССР
Ташкент

Поступило
25 VI 1974

Институт биохимии им. А. Н. Баха
Академии наук СССР
Москва

Институт экспериментальной биологии растений
Академии наук УзССР
Ташкент

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Л. В. Метлицкий, О. Л. Озерецковская, Фитоалексины, «Наука», 1973. ² A. A. Bell, *Phytopathology*, v. 57, 759 (1967). ³ A. Bell, *Phytopathology*, v. 59, № 8, 1119 (1969). ⁴ A. A. Bell, T. Presley, *Phytopathology*, v. 59, № 8, 1141 (1969). ⁵ A. A. Bell, T. Presley, *Phytopathology*, v. 59, № 8, 1147 (1969). ⁶ A. J. Zak, N. T. Keen, D. C. Erwin, *Phytopathology*, v. 62, № 12, 1402 (1972). ⁷ J. Zak, N. T. Keen et al., *Phytopathology*, v. 62, № 2, 1398 (1972). ⁸ Л. В. Метлицкий, Н. В. Любимова, Р. А. Мухамедова, Изв. АН СССР, сер. биол., № 2, 268 (1971). ⁹ Т. А. Данилова, А. Н. Миронова, Тр. Всесоюз. п.-и. ш-та жиров, т. 23, 202 (1965). ¹⁰ Н. И. Барам, А. И. Исмаилов и др., Химия растительных веществ, Ташкент, 1972, стр. 66. ¹¹ Н. И. Барам, А. И. Исмаилов и др., ДАН, т. 195, № 5, 1097 (1970). ¹² S. C. Datta, V. V. S. Murty, T. R. Sevhardi, *Ind. J. Chem.*, v. 10, 691 (1972). ¹³ W. Von Philipsborn, *Angew. Chem.*, B. 83, 470 (1971). ¹⁴ G. E. Bachers, Z. Schaefer, *Chem. Rev.*, v. 71, 617 (1971).