



УДК 547.92:581.1

СИНТЕЗ ТЕТРАГЕМИСУКЦИНАТОВ БРАССИНОСТЕРОИДОВ И ИХ ВЛИЯНИЕ НА НАЧАЛЬНЫЙ РОСТ РАСТЕНИЙ ЯРОВОГО ЯЧМЕНЯ¹

© 2022 г. Р. П. Литвиновская*, #, Н. Е. Манжелесова*, О. П. Савочка*, В. А. Хрипач*

*Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Беларусь, 220141 Минск, ул. Акад. В.Ф. Купревича, 5/2

Поступила в редакцию 17.03.2021 г.

После доработки 05.04.2021 г.

Принята к публикации 15.04.2021 г.

Реакцией brassinosterоидов с ангидридом янтарной кислоты в присутствии диметиламинопиридина впервые получены производные 24-эпибрасинолида и 24-эпикастастерона с янтарной кислотой в виде тетрагемисукцинатов. В лабораторных опытах установлено, что полученные соединения оказывают заметное влияние на посевные качества семян и рост проростков ярового ячменя. Действие тетрагемисукцинатов в ряде тестов превосходило росторегулирующие эффекты соответствующих brassinosterоидов, янтарной кислоты и смеси этих фитогормонов.

Ключевые слова: brassinosterоиды, янтарная кислота, синтез тетрагемисукцинатов brassinosterоидов, ростостимулирующее действие

DOI: 10.31857/S0132342322030125

ВВЕДЕНИЕ

Стероидные гормоны растений — brassinosterоиды — известны как регуляторы роста и адаптогены. Накоплено значительное число экспериментальных данных по синтезу и росторегулирующей активности этих соединений, противострессовому действию, а также практическому применению [1, 2]. Выявлено одно из важнейших свойств фитогормональных стероидов — взаимодействие с другими фитогормонами. При стимуляции ростовых процессов показано синергическое взаимодействие brassinosterоидов и гиббереллинов, ауксинов и фенольных соединений [3, 4]. Эти сведения побуждают интерес исследователей к синтезу сложных эфиров фитогормональных стероидов с такого рода соединениями. Так, ранее мы осуществили синтез ряда производных brassinosterоидов с биологически значимыми кислотами. Конъюгаты с индолилуксусной кислотой [5], например, оказывали стимулирующее действие на рост стеблей проростков пшеницы, при этом ростостимулирующий эффект каждого из гормонов, взятых в отдельности или в виде смеси, уступал по величине действию сложноэфирного конъюгата, в котором оба фитогормональных ком-

понента связаны ковалентными связями. Аналогичные свойства проявляли производные brassinosterоидов с 5-аминолевулиновой кислотой [6]. Синтез и изучение салицилатов brassinosterоидов позволили сделать заключение, что они улучшают посевные качества семян ярового ячменя и действуют как индукторы иммунной системы растений проса и ячменя в условиях абиотического и биотического стресса [7, 8]. При этом механическая смесь компонентов не обладала таким эффектом.

В продолжение наших исследований сложноэфирных конъюгатов brassinosterоидов мы обратились к изучению гемисукцинатов стероидных фитогормонов. Янтарная кислота занимает особое место среди биостимуляторов — она оказывает активирующее действие на многие обменные процессы растений, повышает всхожесть семян и продуктивность некоторых растений, может изменять энергетический уровень некоторых ферментов, стимулируя накопление аскорбиновой кислоты и восстановленных форм аминокислот [9]. Янтарная кислота широко используется для стимуляции всхожести и роста, улучшения приживаемости, ускорения развития растений и повышения урожайности сельскохозяйственных культур [10]. Она нормализует естественную микрофлору почвы и оказывает общеукрепляющее действие — помогает лучше усваивать питательные вещества и удобрения. Имеются данные, что в связанной форме янтарная кислота проявляет более высокий ростостимулирующий эффект [11].

¹ Дополнительные материалы для этой статьи доступны по doi 10.31857/S0132342322030125 для авторизованных пользователей.

Сокращения: ЭБ — 24-эпибрасинолид; ЭК — 24-эпикастастерон; ЯК — янтарная кислота.

Автор для связи: (тел.: +375 (17) 356-56-15; эл. почта: litvin@iboch.by).

Цель настоящей работы – синтез конъюгатов brassinosterоидов ряда 24-эпибрасинолида с янтарной кислотой и оценка их влияния на начальный рост растений ярового ячменя.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Синтез гемисукцинатов осуществляли взаимодействием 24-эпибрасинолида (ЭБ) (I) и 24-эпикастастерона (ЭК) (II) с ангидридом янтарной кислоты (ЯК) в пиридине в присутствии диметиламинопиридина. Использование эквивалентных количеств ангидрида или его небольшо-

го избытка приводит к получению смеси эфиров с участием гидроксильных групп по различным положениям молекулы, при этом преобладают тризамещенные производные, что четко видно из хромато-масс-спектров (см. дополнительные материалы). При проведении реакции с большим избытком янтарного ангидрида (10 экв. на каждую гидроксильную группу исходного brassinosterоида (I) или (II)) при 90°C в течение 96 ч в качестве основных продуктов выделены соответствующие тетрагемисукцинаты (III) и (IV) (схема 1).

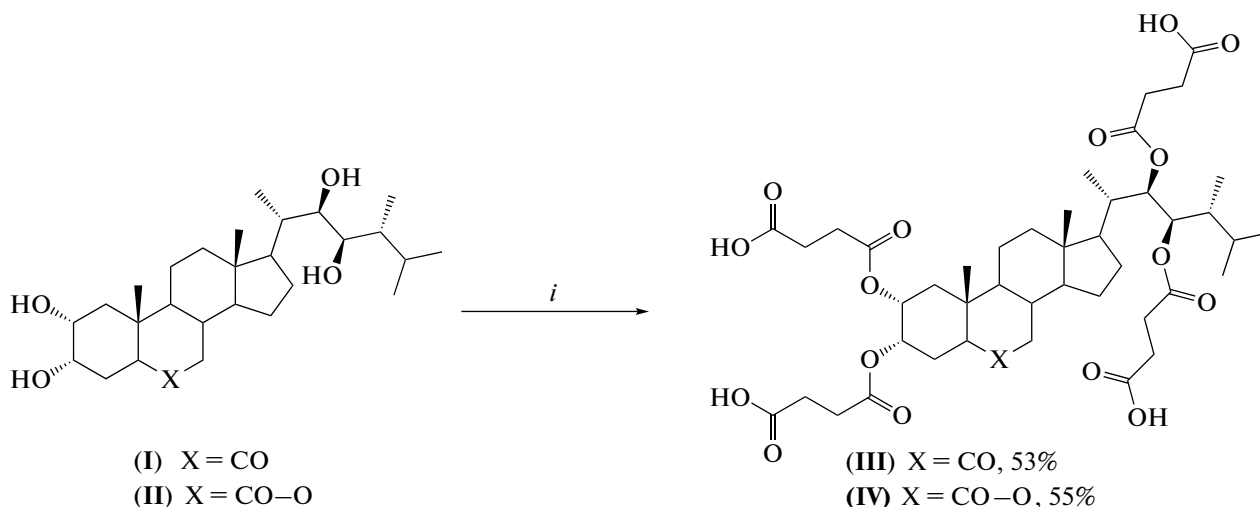


Схема 1. Синтез тетрагемисукцинатов brassinosterоидов ряда 24-эпибрасинолида. *i* – янтарный ангидрид, 4-диметиламинопиридин, 90°C, 90–96 ч.

Доказательство структуры полученных соединений – значительное смещение в слабое поле в спектре ¹H-ЯМР сигналов протонов при атоме С2, С3, С22 и С23 – 4.83, 4.99 и 5.10–5.15 м.д. для тетрагемисукцината 24-эпикастастерона (III) и 4.93, 5.20, 5.35 и 5.44 м.д. для тетрагемисукцината 24-эпибрасинолида (IV) по сравнению с исходными brassinosterоидами [1] и появление 16-протонного мультиплета (2.41–2.55 и 2.64–2.71 м.д. соответственно), принадлежащего метиленовым протонам остатков янтарной кислоты. В спектре ¹³C-ЯМР дополнительно присутствуют восемь сигналов углеродных атомов групп С=О. Достоверность приведенных структур также доказывает присутствие в масс-спектрах высокого разрешения полученных тетрагемисукцинатов пика молекулярного иона и появление дополнительного сильного сигнала валентных колебаний карбонильной группы в ИК-спектрах.

Исследование активности полученных соединений проводили в лабораторных опытах, применяя характерные для биорегуляторов фитотесты по влиянию на посевные качества семян и рост

проростков [12]. Использование семян с пониженной всхожестью позволило выявить определенные особенности регуляторного действия синтезированных соединений. Отмечено, что применение фитогормональных стероидов ряда 24-эпибрасинолида и их модифицированных производных (III) и (IV) приводило к значительному повышению энергии прорастания семян и в меньшей степени – всхожести. Наибольшую активность показали ЭБ и его тетрагемисукцинат (IV). Они значительно стимулировали прорастание семян – на 30 и 40% соответственно (рис. 1а). ЭК и его тетрагемисукцинат (III) оказались менее активными (стимуляция прорастания семян – на 14 и 10% соответственно). При этом тетрагемисукцинат (IV) был более активен, чем исходный ЭБ, тогда как тетрагемисукцинат (III) – чуть менее активен, чем ЭК. Механическая смесь ЭБ и янтарной кислоты показала меньшую активность по сравнению с конъюгированной формой, а смесь ЭК с янтарной кислотой, наоборот, была более активна, чем соответствующий тетрагемисукцинат.

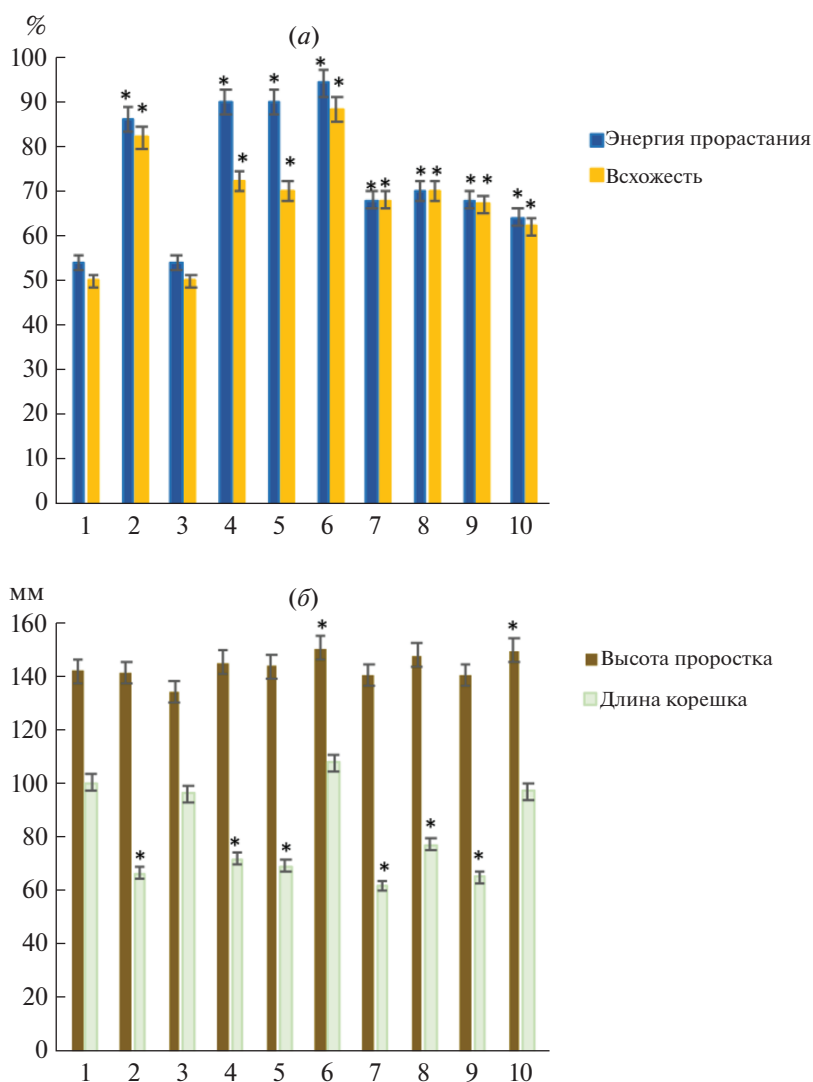


Рис. 1. Влияние фитогормональных стероидов и их тетрагемисукцинатов на прорастание семян (а) и рост проростков (б) ярового ячменя. 1 – Контроль; 2 – ЭБ (II), 10⁻⁸ М; 3 – ЯК, 10⁻⁸ М; 4 – ЭБ + ЯК, 10⁻⁸ М (1 : 1); 5 – ЭБ + ЯК, 10⁻⁸ М (1 : 4), 6 – тетрагемисукцинат (IV), 10⁻⁸ М; 7 – ЭК (I), 10⁻⁸ М; 8 – ЭК + ЯК, 10⁻⁸ М (1 : 1); 9 – ЭК + ЯК, 10⁻⁸ М (1 : 4), 10 – тетрагемисукцинат (III), 10⁻⁸ М. * Различия достоверны по сравнению с контролем ($p \leq 0.05$).

Все изученные соединения и композиции, кроме тетрагемисукцината (IV), в той или иной степени ингибировали рост корешков, тогда как на растяжение колеоптилей они либо не оказывали влияния, либо его стимулировали (рис. 1б).

Наибольший ингибирующий эффект (~30%) отмечался на корешках под влиянием природных brassinosteroidов. Стимулирующий эффект отмечен только под действием тетрагемисукцината (IV) (10%). Максимальное стимулирующее действие на рост колеоптилей оказывали тетрагемисукцинаты. Соединения, взятые по отдельности, на этот показатель не влияли, смеси занимали промежуточное положение, стимулируя рост проростков, но в меньшей степени, чем тетраге-

мисукцинаты. Следует отметить, что янтарная кислота в виде тетрагемисукцинатов с brassinosteroidами полностью снимала ингибирующее действие последних на рост первичных корешков, тогда как в составе смесей данный эффект проявлялся частично. При этом в вариантах с применением смесей 24-эпибрасинолида с янтарной кислотой на результат не оказывало влияния используемое количество последней (1 и 4 экв.), тогда как смесь 24-эпикастестерона с 1 экв. янтарной кислоты была более активной, чем его смесь с 4 экв. кислоты.

Проведенные лабораторные опыты свидетельствуют о том, что тетрагемисукцинаты brassinosteroidов с янтарной кислотой обладают росто-

регулирующим действием. Более детальное изучение этих соединений может показать, связано ли это со структурой brassinosterоида (возможно, конъюгат выступает в роли “депо”, постепенно высвобождая действующее вещество) или имеет место синергический эффект.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Оборудование и материалы. ИК-спектры (ν , см^{-1}) получены на спектрометре Spectrum 100 (Perkin Elmer, Великобритания) в пленке. Спектры ^1H -ЯМР (δ , м.д., КССВ, Гц) и ^{13}C -ЯМР (δ , м.д.) получены в дейтерированных растворителях с использованием остаточного пика растворителя в качестве внутреннего стандарта (δ_{H} 3.31 м.д. и δ_{C} 49.2 м.д. для CD_3OD ; δ_{H} 7.58 м.д. и δ_{C} 135.9 м.д. для $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) на спектрометре Avance 500 (Bruker, Германия; 500 МГц для ^1H и 125 МГц для ^{13}C). Масс-спектры получены на масс-спектрометре 6410 Triple Quad LC/MS 1200 HPLC (Agilent Technologies, США) при регистрации положительных и отрицательных ионов в режиме электроспрей-ионизации (ESI, 70 эВ). Масс-спектры высокого разрешения получены на приборе 6550 iFunnel Q-TOF LC/MS (Agilent Technologies, США) электроспрей-ионизацией в режиме положительных ионов. Протекание реакций контролировали методом ТСХ на пластинках Kieselgel 60 F_{254} с визуализацией путем обработки анисовым проявителем с последующим нагреванием. Хроматографическое разделение реакционных смесей осуществляли на силикагеле 40/60 (Kieselgel 60, Merck, Германия). В работе использовали реактивы фирмы Sigma-Aldrich (США) и brassinosterоиды ЭК (I) и ЭБ (II), синтезированные в лаборатории химии стероидов Института биоорганической химии НАН Беларуси.

(22R,23R)-5 α -Эргостан-6-она 2 α ,3 α ,22,23-тетрагемисукцинат (III). К раствору 57 мг (0.123 ммоль) ЭК (I) в 3 мл абсолютного пиридина добавляли 492 мг (4.92 ммоль) янтарного ангидрида и 2 мг (0.016 ммоль) диметиламинопиридина. Полученную смесь перемешивали при 90°C в течение 96 ч. Затем упаривали пиридин, остаток растворяли в хлороформе и хорошо промывали водой от избытка янтарной кислоты, сушили над Na_2SO_4 , растворитель удаляли в вакууме. Остаток хроматографировали на силикагеле (элюент CHCl_3 : MeOH , 3 : 1). Получили 56 мг (53%) тетрагемисукцината (III) в виде маслообразного вещества.

(22R,23R)-В-Гомо-7-окса-5 α -эргостан-6-она 2 α ,3 α ,22,23-тетрагемисукцинат (IV). По методике, описанной для соединения (III), из 48 мг (0.10 ммоль) ЭБ (II), 400 мг (4.00 ммоль) янтарного ангидрида и 2 мг (0.016 ммоль) 4-диметиламинопиридина получили 48 мг (55%) тетрагемисукцината (IV) в виде маслообразного вещества.

Данные спектров соединений (III) и (IV) приведены в дополнительных материалах.

Действие brassinosterоидов и их конъюгатов с янтарной кислотой на ранний рост растений ярового ячменя. Тестирование brassinosterоидов ряда 24-эпибрасинолида и их тетрагемисукцинатов с янтарной кислотой изучали в лабораторных условиях на семенах ярового ячменя сорта Магутны. Семена проращивали на растворах веществ в чашках Петри в термостате при 20°C, затем выставляли на свет в люминистатную установку Philips 59451 (Германия) с освещенностью 6 тыс. люкс и световым режимом 16/8 ч. Через 3 сут согласно ГОСТ 12038-84 [13] проводили учет энергии прорастания, через 7 сут – учет всхожести, через 10 сут измеряли высоту coleoptилей и длину корешков контрольных и опытных вариантов. В контрольном варианте семена проращивали на дистиллированной воде. Оптимальная концентрация исследуемых веществ была взята как наиболее активная, исходя из результатов предыдущих исследований [5–8].

Эксперименты повторяли независимо трижды при 4-кратной повторности, число растений в повторности – не менее 20. На рис. 1 представлены средние арифметические и их среднеквадратические ошибки ($M \pm m$). Достоверность различий рассчитывали по t -критерию Стьюдента. Достоверными считали отличия при $p \leq 0.05$.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Впервые получены производные 24-эпибрасинолида и 24-эпикастастерона с янтарной кислотой. Синтез тетрагемисукцинатов осуществляли взаимодействием соответствующих brassinosterоидов с ангидридом янтарной кислоты в присутствии диметиламинопиридина. В тестах на проростках ярового ячменя установлено, что полученные соединения оказывают заметное влияние на посевные качества семян и рост проростков. Действие тетрагемисукцинатов в ряде тестов превосходило росторегулирующие эффекты соответствующих brassinosterоидов, янтарной кислоты и смеси этих фитогормонов.

Полученные результаты могут стать основой для создания препаратов росторегулирующего и адаптогенного действия.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей и использованием животных в качестве объектов исследований.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Khripach V.A., Zhabinskii V.N., de Groot A.E.* // *Brassinosteroids: A New Class of Plant Hormones*. San Diego: Academic Press, 1999. 456 p. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.2000.0423d.x>
2. *Nolan T.M., Vukašinić N., Liu D., Russinova E., Yin Y.* // *Plant Cell*. 2020. V. 32. P. 295–318. <https://doi.org/10.1105/tpc.19.00335>
3. *Vajcus A., Hayat S.* // *Plant Physiol. Biochem.* 2009. V. 47. P. 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2008.10.002>
4. *Манжелецова Н.Е., Вольнец А.П.* // Физиология патогенеза и болезнеустойчивости растений / Под ред. Решетникова В.Н. Минск: Беларуская навука, 2016. С. 169–188.
5. *Литвиновская Р.П., Минин П.С., Райман М.Э., Жилицкая Г.А., Куртикова А.Л., Кожарнович К.Г., Деревянчук М.В., Кравец В.С., Хрипач В.А.* // *Химия природ. соед.* 2013. Т. 49. С. 408–414. [*Litvinovskaya R.P., Minin P.S., Raiman M.E., Zhilitskaya G.A., Kurtikova A.L., Kozharnovich K.G., Derevyanchuk M. V., Kravets V.S., Khripach V.A.* // *Chem. Nat. Comp.* 2013. V. 49. P. 478–485.] <https://doi.org/10.1007/s10600-013-0643-8>
6. *Хрипач В.А., Литвиновская Р.П., Райман М.Э., Минин П.С., Кисель М.А., Тростянка И.В., Долгопалец В.И.* // Патент BY 18530 С1, опубл. 30.08.2014.
7. *Литвиновская Р.П., Вайнер А.А., Жилицкая Г.А., Колупаев Ю.Е., Савочка О.П., Хрипач В.А.* // *Химия природ. соед.* 2016. Т. 52. С. 394–398. [*Litvinovskaya R.P., Vayner A.A., Zhylitskaya H.A., Kolutraev Yu.E., Savachka A.P., Khripach V.A.* // *Chem. Nat. Comp.* 2016. V. 52. P. 452–457.] <https://doi.org/10.1007/s10600-016-1671-y>
8. *Манжелецова Н.Е., Литвиновская Р.П., Полянская С.Н., Корытько Л.А., Савочка О.П.* // Доклады НАН Беларуси. 2019. Т. 63. С. 304–311. <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2019-63-3-304-311>
9. *Грабовская Н.И., Бабенко О.К., Сафронова Н.М., Хусаинова Р.К.* // Современная наука: актуальные проблемы теории и практики. Сер. Естественные и технические науки. 2020. № 1. С. 28–32.
10. *Верещагин А.Л., Акимова С.С., Нуйкина Н.В., Щурова И.А., Прищенко Ю.Е., Антонова О.И., Кузьменко И.А., Кузьменко С.И., Бреговдзе Н.Г.* // Патент RU 2267924 С1, опубл. 20.01.2006.
11. *Латашко В.М., Бадовская Л.А., Пономаренко Р.И., Сокирко В.П.* // Материалы 6-й Международной конференции “Регуляторы роста и развития растений в биотехнологиях”. Москва, 2001. С. 255.
12. *Knight B.E.A., Taylor H.F., Wain R.L.* // *Ann. Appl. Biol.* 1969. V. 63. P. 211–223.
13. ГОСТ 12038-84 Семена сельскохозяйственных культур. Методы определения всхожести. Москва: ИПК Издательство стандартов, 2004.

Synthesis of Brassinosteroid Tetrahemisuccinates and Their Effect on the Initial Growth of Spring Barley Plants

R. P. Litvinovskaya*, #, N. E. Manzhalesava*, A. P. Savachka*, and V. A. Khripach*

#Phone: +375 (17) 356-56-15; e-mail: litvin@iboch.by

*Institute of Bioorganic Chemistry of National Academy of Science of Belarus, ul. Academica V.F. Kuprevicha 5/2, Minsk, 220141 Belarus

For the first time, conjugates of 24-epibrassinolide and 24-epicastasterone with succinic acid were obtained in the form of tetrahemisuccinates by the reaction of brassinosteroids with succinic acid anhydride in the presence of dimethylaminopyridine. In laboratory test experiments it was found that the compounds obtained have a noticeable effect on the sowing quality of seeds and the growth of seedlings of spring barley plants. The effect of the conjugates in a number of tests exceeded the growth-regulating effects of the corresponding brassinosteroids, succinic acid, and a mixture of these phytohormones.

Keywords: brassinosteroids, succinic acid, synthesis of tetrahemisuccinates of brassinosteroids, growth-stimulating effect