

L. COASSINI LOKAR, F. TOMÈ

**HELLEBORUS MULTIFIDUS SUBSP. ISTRICUS (SCHIFFNER)
MERX. & POD.: DISTRIBUZIONE DI ALCUNI METABOLITI
SECONDARI NEGLI ORGANI IPOGEI**

**HELLEBORUS MULTIFIDUS SUBSP. ISTRICUS (SCHIFFNER) MERX. & POD.:
DISTRIBUTION OF SOME SECONDARY METABOLITES IN HYPOGEIC PARTS**

Riassunto breve — È stata valutata la variazione quantitativa di ellebrina e di alcune saponine nei singoli organi ipogei di *Helleborus multifidus* subsp. *istriacus* (Schiffner) Merx. & Pod., in relazione all'età della pianta, al ciclo biologico e al grado di aridità dell'ambiente. È stato analizzato inoltre il contenuto di ellebrina e di saponine in diverse parti di radici e di rizoma, al fine di chiarire il meccanismo di produzione e di localizzazione dei metaboliti secondari.

Parole chiave: *Helleborus multifidus*, Metaboliti secondari, Variabilità con fattori diversi.

Abstract — The content in hellebrin and saponins ($R_f = 0.63$ and 0.70 - TLC) in roots and rhizomes of *Helleborus multifidus* subsp. *istriacus* (Schiffner) Merx. & Pod. was examined in plants of different age in the principal phases of the life-cycle, and in different climatic condition. We analyzed the content of hellebrin and saponins in different parts of root and rhizome, in order to clarify the mechanism of distribution and storage of the secondary metabolites.

Key words: *Helleborus multifidus*, Secondary metabolites, Variability with various factors.

Introduzione

In questa seconda nota abbiamo voluto approfondire le ricerche precedentemente condotte sulla distribuzione di alcuni metaboliti secondari nelle varie parti di *Helleborus multifidus* subsp. *istriacus* (Schiffner) Merx. & Pod., che avevano messo in risalto come i cardenolidi principali, ellebrina e glucoellebrina, si localizzano esclusivamente negli organi ipogei, indipendente-

mente dall'età della pianta e dal ciclo biologico. Si era notata inoltre l'influenza di alcuni fattori esogeni ed endogeni sulla produttività di tali metaboliti secondari (COASSINI LOKAR & TOMÈ, 1983).

Nel presente lavoro abbiamo approfondito tale indagine, estendendola anche ad altri metaboliti secondari presenti negli organi ipogei, quali le saponine, delle quali è stata esaminata la variabilità in relazione all'età della pianta, al ciclo biologico e al grado di aridità dell'ambiente. È sembrato infatti interessante esaminare la distribuzione e la variabilità di tali metaboliti secondari, data la stretta relazione di tipo sinergico tra cardenolidi e saponine nei confronti dell'attività farmacologica della droga.

Abbiamo inoltre cercato di portare un chiarimento ai meccanismi di distribuzione e di localizzazione di ellebrina e di saponine nelle diverse parti dei singoli organi ipogei, sia perché l'argomento non risultava ancora affrontato in questi termini, sia al fine di individuare, se possibile, le interdipendenze tra i metaboliti secondari considerati.

Materiali e metodi

H. istriacus è stato campionato in numerose stazioni del Carso Triestino (Friuli-Venezia Giulia; Italia nord-orientale) collocate in aree caratterizzate da aridità diversa e crescente da E verso O (zona A, Carso orientale; zona B, Carso centrale; zona C, Carso occidentale) nell'ambito delle associazioni: *Seslerio-Quercetum petraeae* in cui l'entità è specie caratteristica, *Ostryo-Quercetum pubescentis* in cui è specie differenziale di sub-associazione e *Asaro-Carpinetum* in cui svolge ruolo di specie di ordine superiore (POLDINI L., ex verbis), durante l'intero ciclo ontogenetico, per più anni di seguito, nelle prime ore pomeridiane, raccogliendo a caso un gran numero di esemplari della stessa età (1, 2-3, 5-6 anni) (COASSINI LOKAR & TOMÈ, 1983); ogni campione medio era omogeneo per ubicazione geografica (quota, esposizione, ecc.) e per tipo di ambiente, in modo da poter escludere l'influenza di tali fattori sui risultati analitici.

Per le indagini sulla distribuzione e localizzazione dei metaboliti secondari nei singoli organi ipogei, questi sono stati ulteriormente suddivisi in: parti apicali (1), mediane (2) e terminali (3) delle radici e parti del rizoma corrispondenti alle parti distali (4), mediane (5) e portanti la gemma fiorale (6).

Ognuna di queste parti è stata analizzata singolarmente. Il tenore di umidità di ogni campione medio è stato determinato a parte (a 110°C sino a peso costante). Tutti i dati percentuali riportati si riferiscono al peso secco e sono medie di almeno tre analisi separate.

Le metodologie seguite per l'estrazione dei metaboliti secondari e per la caratterizzazione e il dosaggio di ellebrina sono ampiamente descritte in precedenti note (COASSINI LOKAR et al., 1979; 1982; 1983). Per quanto riguarda le saponine, delle molte presenti, sono state analizzate quella con $R_f = 0.63$ e quella con $R_f = 0.70$ (TLC). I metodi di individuazione e caratterizzazione delle saponine, nonché la ripetibilità e la sensibilità del metodo adottato, sono descritti in un altro lavoro (COASSINI LOKAR e coll., 1982).

Risultati

Variazioni col ciclo ontogenetico

I risultati relativi alle analisi quantitative condotte durante le fasi più salienti del ciclo biologico (fioritura (II-III), massima espansione fogliare (VII-VIII), quiescenza (XI-XII), separatamente su radici, rizomi e organi ipogei in toto di piante di età intermedia (3 anni)), sono riportati in fig. 1.

Al pari di quanto già osservato per ellebrina e glucoellebrina (COASSINI LOKAR & TOMÈ, 1983), anche le due saponine sono presenti in maggior quantità durante la fase di massima espansione fogliare e in minor quantità durante la fioritura.

Viene confermata la presenza di ellebrina in maggior quantità nelle radici durante tutto il ciclo biologico, mentre nel rizoma risulta maggiormente presente la saponina_{0.63}. Durante le fasi di fioritura e di massima espansione fogliare ellebrina e saponina_{0.63} sono presenti in quantità percentuali pressoché uguali in radici e rizomi, mentre durante la fase di quiescenza la percentuale di saponina_{0.63} nei rizomi supera quella dell'ellebrina nelle radici.

La saponina_{0.70} è in maggiori quantità nei rizomi nelle due prime fasi del ciclo biologico e nelle radici nella fase di quiescenza. Mentre questa saponina è il metabolita secondario presente sempre in minori quantità, la saponina_{0.63} è quello presente in quantità massima.

Il rapporto di distribuzione dell'ellebrina ($\bar{I}_{DE} = 1.85$) e della saponina_{0.63}

($\bar{I}_{ds} = 0.65$) tra radici e rizomi si mantiene costante durante tutto il ciclo biologico, mentre quello della saponina_{0.70} varia sensibilmente passando da 0.74 durante la fioritura a 1.14 durante la quiescenza, per un aumento percentuale costante nelle radici.

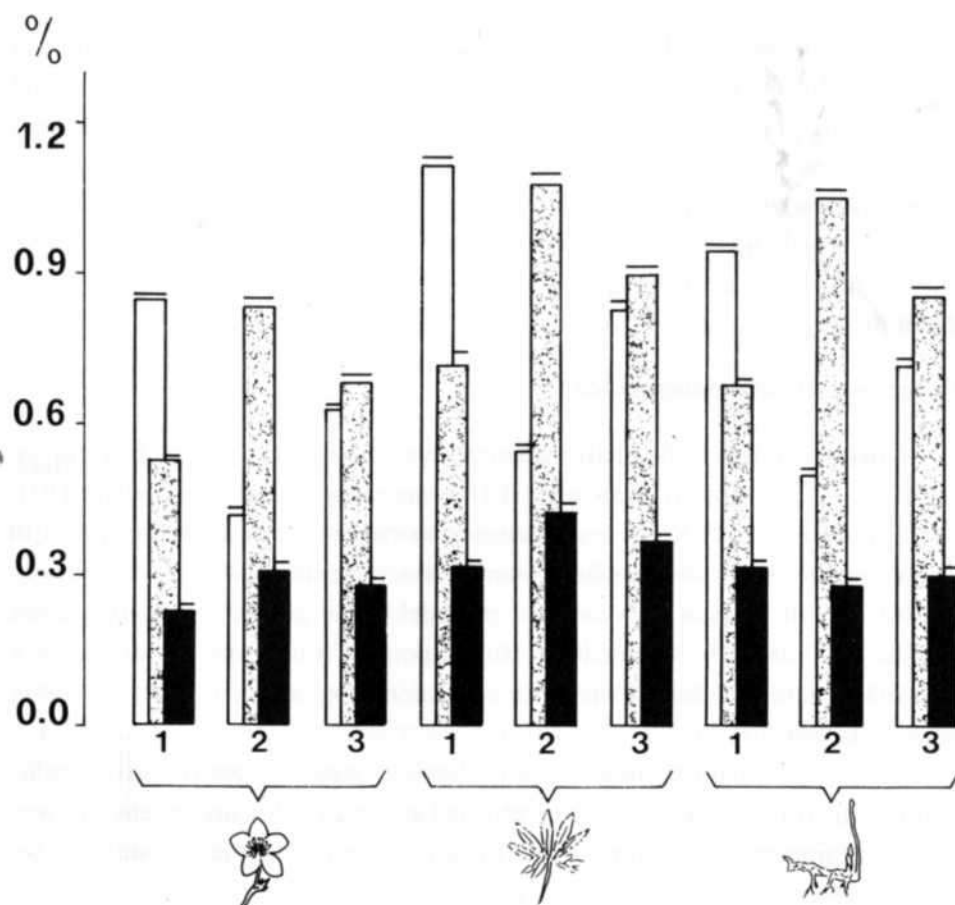


Fig. 1 - Variazioni percentuali di ellebrina □, saponina_{0.63} ▨, saponina_{0.70} ■ in radici (1), rizomi (2) e in organi ipogei in toto (3), in funzione del ciclo biologico (fase di fioritura (II-III), fase di massima espansione fogliare (VII-VIII) e fase di quiescenza (XI-XII)) di piante di *H. multifidus* di 3 anni (area B).
- Percent variations of hellebrin □, saponine_{0.63} ▨, saponine_{0.70} ■ in the roots (1), rhizomes (2) and hypogeic parts "in toto" (3) in principal phases of the life-cycle (flowering (II-III), maximum leaf development (VII-VIII), quiescence (XI-XII)) in plants of *H. multifidus* (3 years old, area B).

Variazioni in funzione dell'età della pianta

Le variazioni percentuali dei metaboliti secondari considerati in radici e rizomi presi singolarmente, nonché negli organi ipogei presi in toto, in funzione dell'età della pianta, sono riportate in fig. 2.

È possibile rilevare che, indipendentemente dall'età, nelle radici sono sempre maggiormente presenti ellebrina e saponina_{0.70}, mentre nei rizomi è in

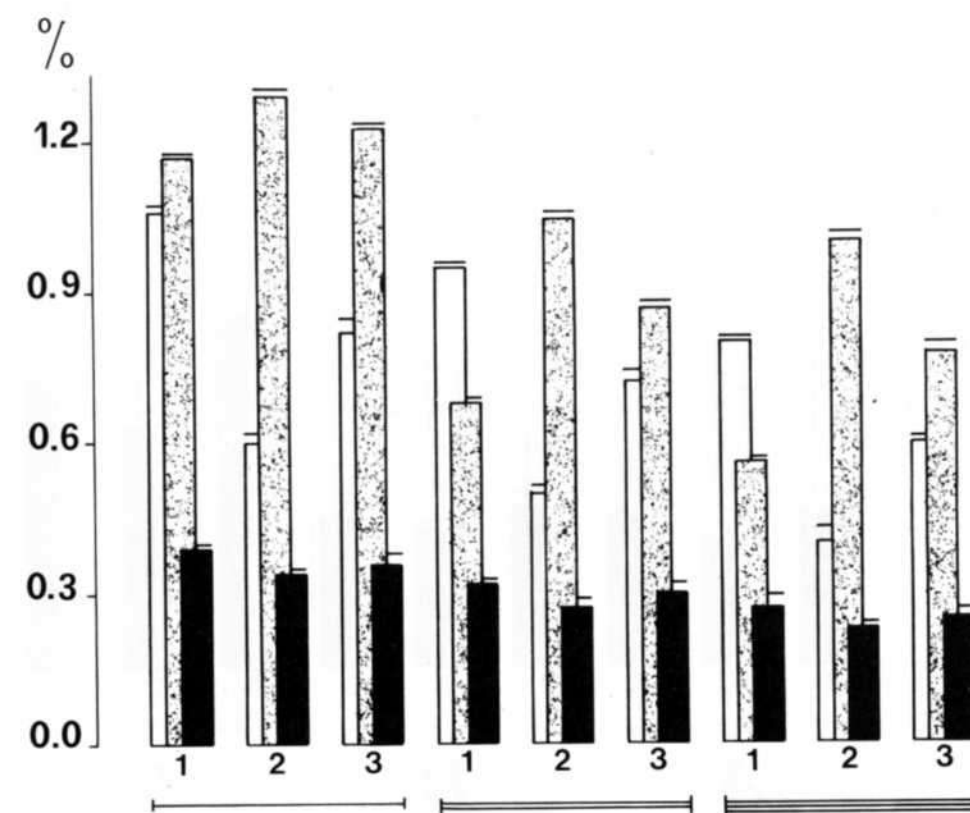


Fig. 2 - Variazioni percentuali di ellebrina □, saponina_{0.63} ▨, saponina_{0.70} ■ in radici (1), rizomi (2) e in organi ipogei in toto (3), in funzione dell'età della pianta (1 anno, 2-3 anni, 5-6 anni) raccolti durante la fase di quiescenza nell'area B.
- Percent variations of hellebrin □, saponine_{0.63} ▨, saponine_{0.70} ■ in the roots (1), rhizomes (2) and hypogeic parts "in toto" (3), in plants at different ages (1 year, 2-3 years, 5-6 years) during the quiescence phase (area B).

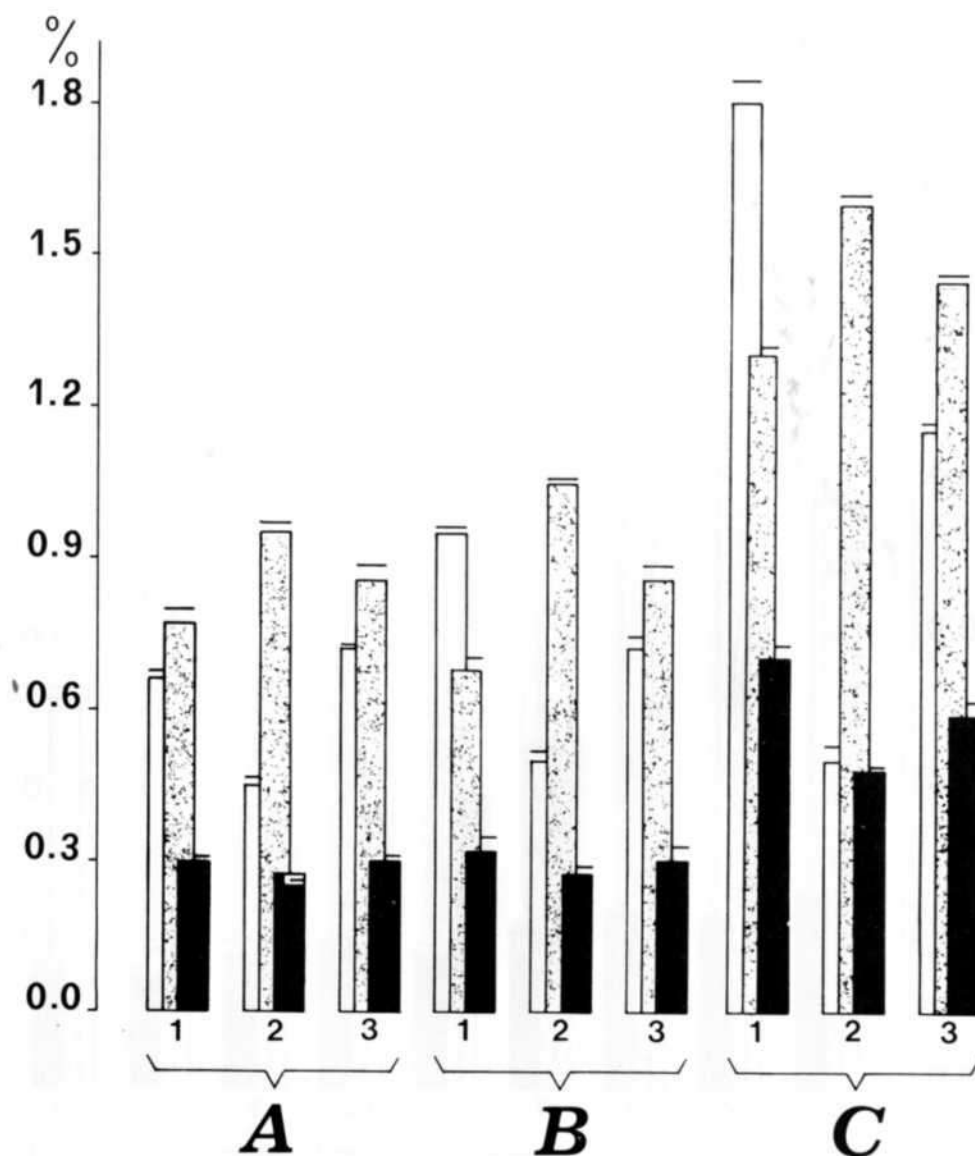


Fig. 3 - Variazioni percentuali di ellebrina □, saponina_{0.63} ▨, saponina_{0.70} ■ in radici (1), rizomi (2) e organi ipogei in toto (3), in funzione dell'ambiente (A → B → C, aree ad aridità crescente) durante la fase di quiescenza (piante di 3 anni).

- Percent variations of hellebrin □, saponine_{0.63} ▨, saponine_{0.70} ■ in roots (1), rhizomes (2) and hypogeic parts "in toto" (3), resulting from the influence of environmental factors (A → B → C, areas with increasing aridity) (quiescence phase, 3 years old plants).

quantità sempre maggiore la saponina_{0.63}. La pianta risulta maggiormente produttiva nel primo anno di vita, in cui inoltre il contenuto percentuale di saponina_{0.63} (1.23%) supera quello dell'ellebrina (1.05%).

Il rapporto di distribuzione tra radici e rizomi di saponina_{0.63} diminuisce al progredire dell'età della pianta (da un massimo di 0.90 per piante di 1 anno ad un minimo di 0.56 per piante di 6 anni), il che indica che il metabolita si localizza sempre più preferenzialmente nei rizomi. Il rapporto di distribuzione dell'ellebrina invece aumenta col progredire dell'età (da 1.75 a 2.00). Il rapporto di distribuzione della saponina_{0.70} non varia in funzione dell'età ($\bar{I}_d = 1.16$).

I grafici delle figg. 1 e 2 si riferiscono a campioni rappresentativi dell'area B, ma risultati analoghi sono stati ottenuti per i campioni delle altre aree.

Variazioni in funzione dell'ambiente

Le indagini sulle variazioni del contenuto percentuale dei tre metaboliti secondari in funzione dell'aridità dell'ambiente (A < B < C), sono state condotte su campioni di piante di età intermedia (2-3 anni). Dagli istogrammi di fig. 3 (periodo di quiescenza) si rileva che vi è una proporzionalità diretta tra grado di aridità e produzione di metaboliti secondari; i valori percentuali medi totali infatti praticamente raddoppiano passando dall'area A alla C (l'ellebrina varia dallo 0.55% all'1.15%, la saponina_{0.63} da 0.83% all'1.45%, la saponina_{0.70} da 0.29% a 0.59%).

Il fattore ambientale inoltre influenza in maniera significativa il rapporto di distribuzione dell'ellebrina tra radici e rizomi, che varia da 1.44 → 1.85 → 3.68, il che indica che all'aumentare del grado di aridità del terreno il cardenolide tende ad accumularsi sempre maggiormente nelle radici. L'ambiente più termofilo influisce in maniera meno sensibile sulla distribuzione delle due saponine tra i singoli organi ipogei.

Distribuzione e localizzazione dei metaboliti secondari

Al fine di chiarire ulteriormente il meccanismo di localizzazione e di distribuzione dei metaboliti secondari negli organi ipogei, sono state condotte indagini su singole parti di radici e rizomi (cfr. Materiali e Metodi) di campioni dell'area B di 2-3 anni di età.

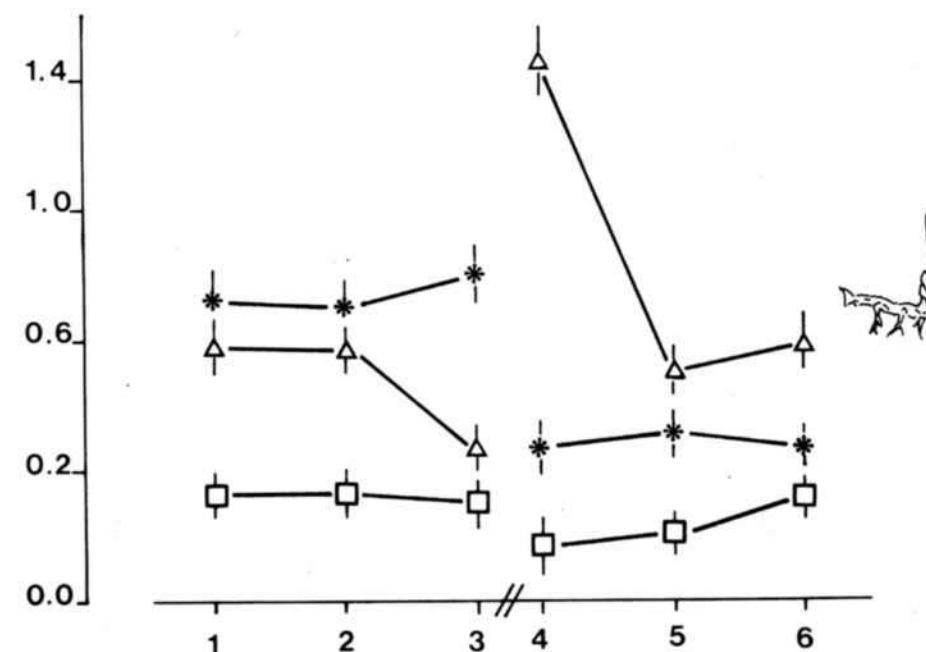
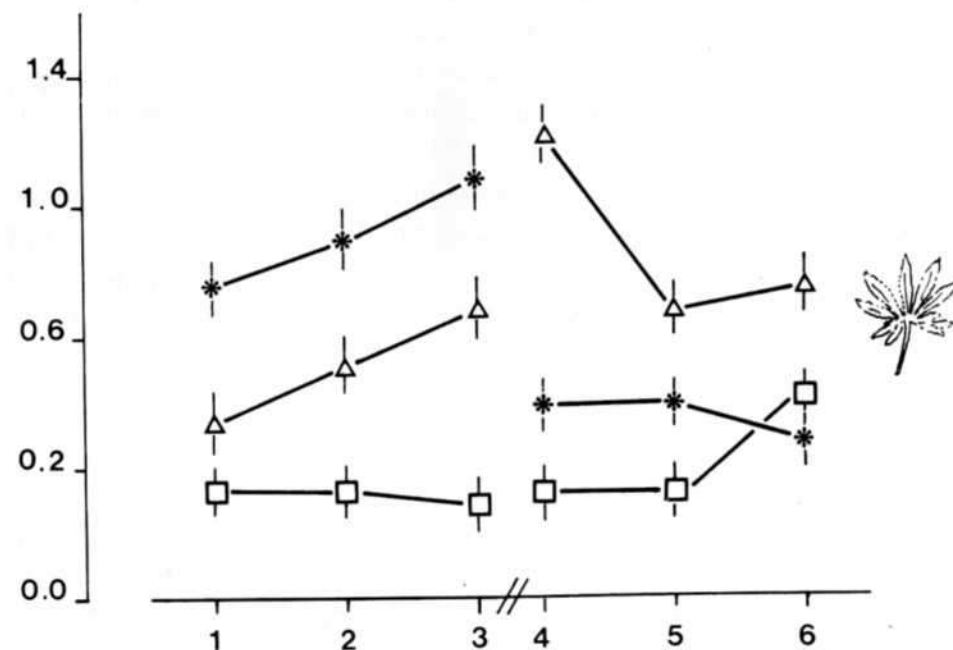
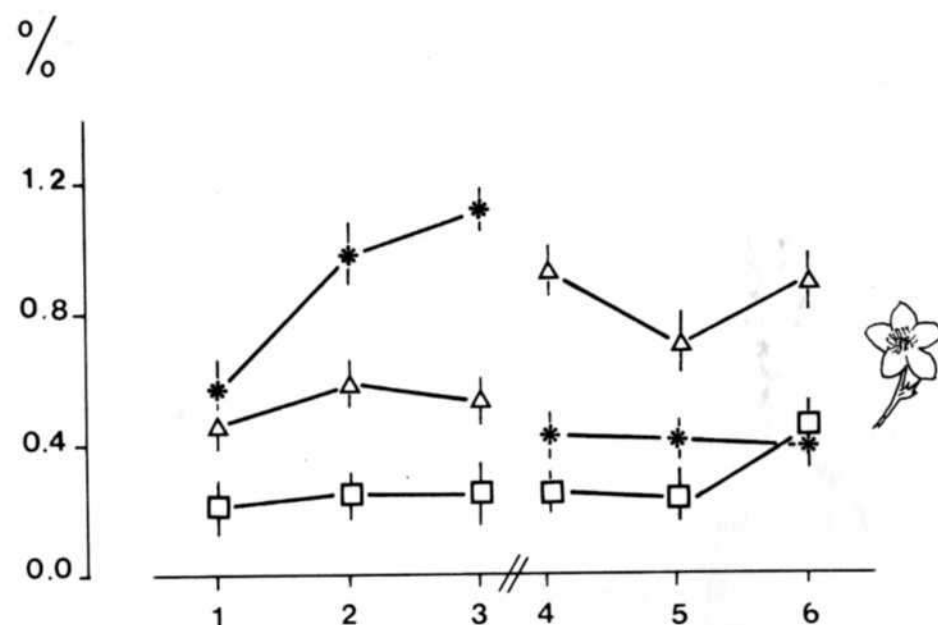


Fig. 4 - Distribuzione percentuale di ellebrina (*), saponina_{0.63} (Δ), saponina_{0.70} ($\square$) nelle diverse parti di radici (1, 2, 3) e rizomi (4, 5, 6) nelle tre fasi del ciclo biologico (fioritura (II-III), massima espansione fogliare (VII-VIII), quiescenza (XI-XI)) di piante di 3 anni dell'area B.

- Percent distribution of hellebrin (*), saponine_{0.63} (Δ) and saponine_{0.70} ($\square$) in the different parts of roots (1, 2, 3) and rhizomes (4, 5, 6) in the principal phases of the life-cycle (flowering (II-III), maximum leaf development (VII-VIII), quiescence (XI-XII)) of 3 years old plants, area B.

Durante le fasi principali del ciclo biologico l'ellebrina è sempre più concentrata nella parte delle radici più prossima al rizoma (3). Durante la fase di fioritura la saponina_{0.63} si distribuisce in maniera abbastanza omogenea nelle varie parti di radici e rizomi e tende ad accumularsi nella parte distale del rizoma (4) durante le due fasi successive (fig. 4).

Il contenuto di saponina_{0.70} è piuttosto omogeneo nelle diverse parti di radici e rizomi durante il ciclo biologico, con una lieve costante accentuazione nella parte del rizoma portante la gemma fiorale (6).

La distribuzione dei metaboliti secondari considerati tra le varie parti di radici e rizomi varia in funzione dell'età della pianta. Durante il primo anno di vita infatti i metaboliti si distribuiscono in maniera piuttosto omogenea (fig.

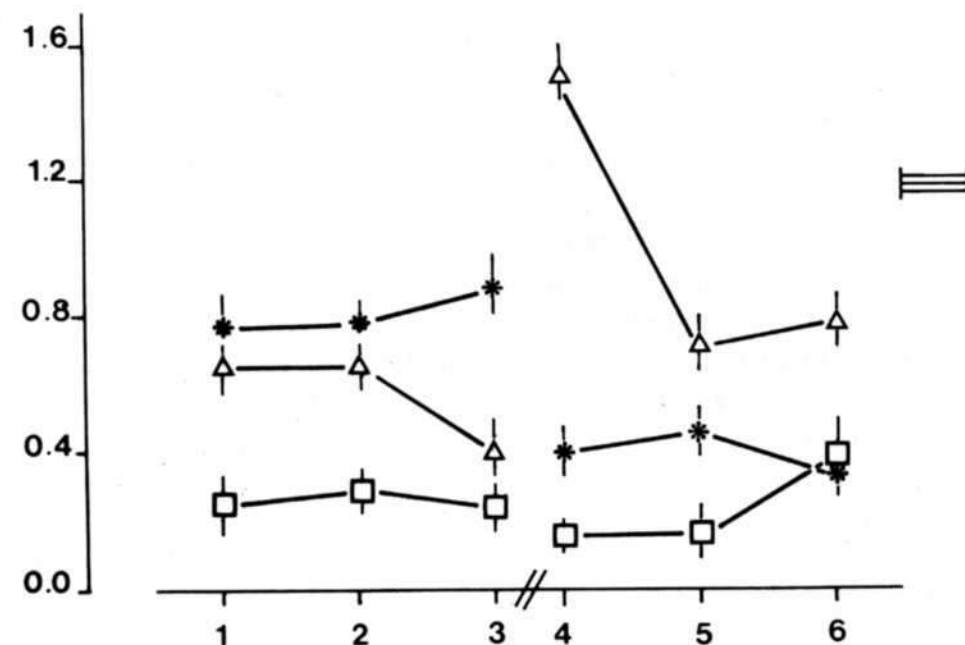
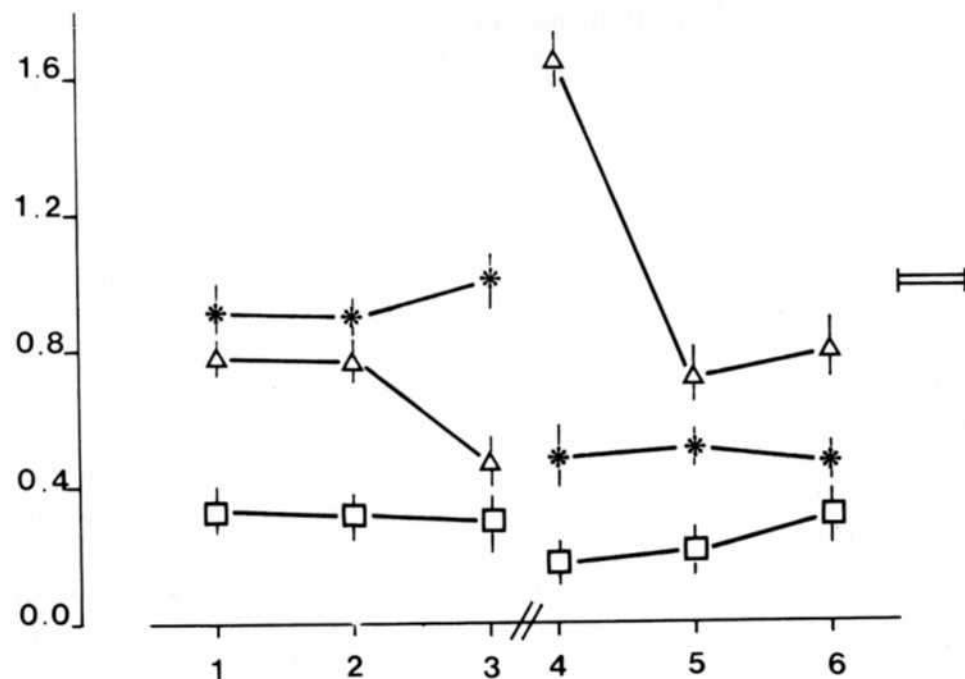
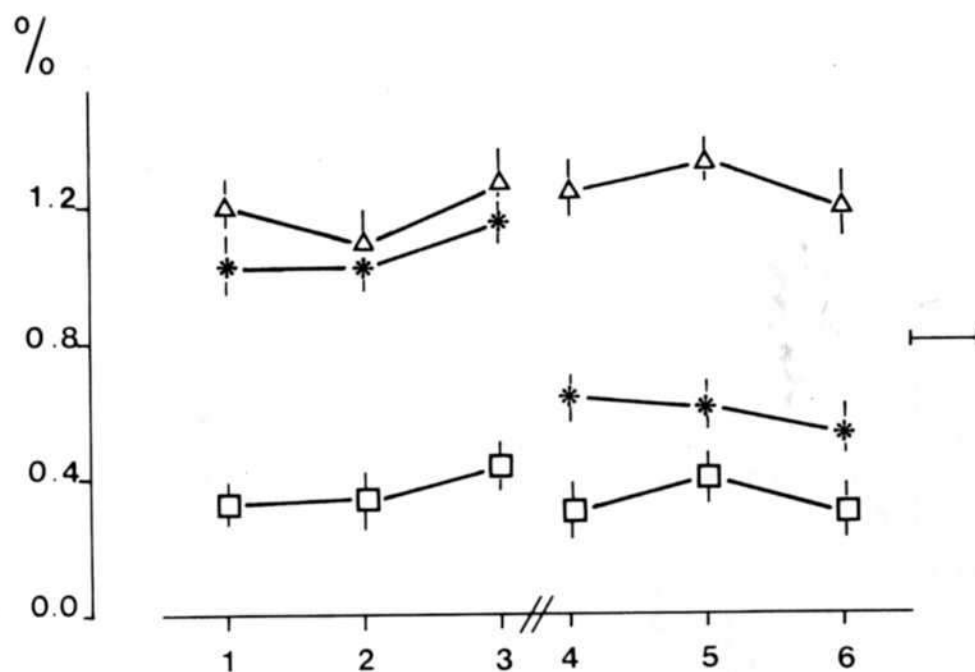


Fig. 5 - Distribuzione percentuale di ellebrina (*), saponina_{0.63} (Δ), saponina_{0.70} (□) nelle diverse parti di radici (1, 2, 3) e rizomi (4, 5, 6) in funzione dell'età della pianta (1-1 anno, 2-2-3 anni, 3-5-6 anni). Campionamenti relativi all'area B, fase di quiescenza.

- Percent distribution of hellebrin (*), saponine_{0.63} (Δ) and saponine_{0.70} (□) in the different parts of roots (1, 2, 3) and rhizomes (4, 5, 6) in plants at different ages (1-1 year, 2-2-3 years, 3-5-6 years) (area B, quiescence).

5); all'aumentare dell'età si nota invece che la saponina_{0.63} tende a localizzarsi nella parte distale del rizoma (4) e la saponina_{0.70} nella parte del rizoma portante la gemma fiorale (6).

Conclusioni

Le indagini condotte al fine di chiarire i meccanismi di distribuzione di alcuni metaboliti secondari nei singoli organi ipogei e in alcune loro parti di *Helleborus multifidus* subsp. *istriacus* (Schiffner) Merx. & Pod. in funzione di alcuni fattori endogeni ed esogeni, hanno consentito di trarre alcune indicazioni.

- l'entità è maggiormente produttiva durante la fase di massima espansione fogliare (VII-VIII), nel primo anno di vita, in ambienti caratterizzati da forte aridità;
- ellebrina e saponina_{0,70} si trovano sempre in maggiori quantità nelle radici, indipendentemente dai fattori endogeni ed esogeni considerati;
- la saponina_{0,63} si concentra sempre maggiormente nei rizomi ed è, dei tre metaboliti secondari considerati, quello presente in maggiori quantità in assoluto. Questa sembra essere una caratteristica precipua dell'entità carsica, dal momento che nell'entità *H. odor* subsp. *laxus* (Host) Merx. & Pod. (che nel Friuli-Venezia Giulia è ampiamente distribuita dalla pianura alluvionale ai rilievi montani esterni dell'arco alpino orientale) tale saponina si localizza sempre nelle radici, ma in quantità molto inferiori (fino a 5 volte), tanto che spesso non si rilevano differenze significative nei contenuti percentuali medi delle due saponine, che spesso si equivalgono (COASSINI LOKAR & POLDINI, 1979);
- il diverso grado di aridità dell'ambiente sembra influire in maniera determinante sulla produzione dei metaboliti secondari, tanto che nel passaggio da ambienti più mesofili (zona A) ad ambienti nettamente termofili (zona C) si nota un aumento nel tenore dei metaboliti di 2-3 volte;
- poiché al progredire dell'età della pianta la saponina_{0,63} tende a localizzarsi sempre maggiormente nel rizoma, mentre l'ellebrina sempre più nelle radici, sembra vi sia una correlazione inversa tra i due metaboliti secondari per quanto riguarda la loro localizzazione;
- le indagini condotte al fine di chiarire i meccanismi di distribuzione e di localizzazione dei tre metaboliti secondari consentono di trarre solo alcune indicazioni di carattere generale: nei rizomi la parte con la gemma fiorale è sempre la meno ricca di metaboliti, la parte distale invece ha la maggior quantità di saponina_{0,63}; nelle radici non sembra che si possa identificare chiaramente una zona di accumulo dei metaboliti, anche se si nota una tendenza dell'ellebrina a localizzarsi nelle parti più prossime al rizoma;
- la presenza di notevoli percentuali di saponine nell'entità carsica dovrebbe avere un effetto positivo sulle proprietà farmacologiche della droga di *H. multifidus* subsp. *istriacus*, come dimostrerebbero alcune prove preliminari (DALLA LOGGIA et al., 1982).

Non sembra possibile invece affermare che vi è un'interdipendenza tra i

metaboliti secondari considerati, poiché quando l'entità è maggiormente produttiva, lo è nei confronti di tutti e tre i metaboliti, indipendentemente dai fattori endogeni ed esogeni presi in esame. Si è notato soltanto che vi è una correlazione inversa per quanto riguarda la localizzazione di ellebrina e saponina_{0,63}, soprattutto in funzione del grado di aridità dell'ambiente.

Ringraziamento

Desideriamo ringraziare sentitamente il prof. Livio Poldini per le utili discussioni durante lo svolgimento del lavoro e per la lettura critica del manoscritto.

Manoscritto pervenuto il 25.II.1983.

ZUSAMMENFASSUNG — Die quantitative Schwankung des Hellebrin- und Saponin-Gehaltes in den unterirdischen Organen von *Helleborus multifidus* subsp. *istriacus* wurde in Zusammenhang mit den Alter, dem Lebenszyklus und dem Trockenheitsgrad der Umwelt untersucht. Es ist ausserdem der Hellebrin- und Saponin-Gehalt in verschiedenen Teilen der Wurzel und des Rhizoms zur Ermittlung der Erzeugungs- und Lokalisierungs-art der sekundären Abbaustoffe festgestellt.

Bibliografia

- COASSINI LOKAR L. & POLDINI L., 1979 - Relazione tra chemotipi e tipi di vegetazione sull'esempio di *Helleborus odor* subsp. *laxus* in Friuli. *Atti Gior. Gr. Piant. Officinali della Soc. Bot. Ital.*, Verona 23-28 maggio 1979: 126-131.
- COASSINI LOKAR L., POLDINI L. & TUBARO A., 1982 - Influenza dei fattori altitudinale, stagionale, ambientale sulla produzione dei principi attivi in *Helleborus odor* subsp. *laxus* (Host) Merx. & Pod. *Giorn. Bot. Ital.*, 116 (1-2): 51-61.
- COASSINI LOKAR L. & TOMÈ F., 1983 - *Helleborus multifidus* subsp. *istriacus* (Schiffner) Merx. & Pod.: cardenolidi nelle diverse parti della pianta e nella droga. *Atti Boll. Soc. Adr. Scienze*, Trieste, 67: 19-24.
- DALLA LOGGIA R., SCARCIA V. & TUBARO A., 1981 - Pharmacodynamic aspects of some species of the genus *Helleborus*. I. Relationship between toxicity and hellebrin content. *Boll. Soc. Adr. Scienze*, Trieste (in press).
- POLDINI L., COASSINI LOKAR L. & FORNASARO F., 1977 - Nota preliminare sulle ricerche farmaco-botaniche in due specie di *Helleborus* nel Friuli-Venezia Giulia. *Giorn. Bot. Ital.*, 111 (6): 368.

Indirizzi degli Autori — Authors' addresses:

- Dr. Laura COASSINI LOKAR
Istituto ed Orto Botanico
dell'Università degli Studi
Sal. Monte Valerio 14, I-34127 TRIESTE
- Dr. Franca TOMÈ
Istituto di Scienze Botaniche
dell'Università degli Studi
Via G. Colombo 60, I-20133 MILANO