

УДК 581.192.32

БИОХИМИЯ

Э. М. КОФ, П. В. ВЛАСОВ, Я. ЛАСОВСКИЙ, Г. С. ИЛЬИН

ОБНАРУЖЕНИЕ АБСЦИЗОВОЙ КИСЛОТЫ В ТКАНЯХ
ПОКОЯЩИХСЯ РАСТЕНИЙ

(Представлено академиком А. Л. Курсановым 30 III 1973)

Абсцизовая кислота впервые была выделена из тканей хлопчатника и явора как фактор, вызывающий опадение молодых плодов и покой у растений^(1, 2). Молекула абсцизовой кислоты содержит один асимметрически замещенный атом углерода в 1'-положении кольца и поэтому может существовать в двух изомерных формах. Растения содержат только одну из этих форм (+)-энантиomer, или правовращающей, т. е. вращающей вправо, по часовой стрелке, плоскость поляризации при прохождении через него луча света⁽³⁾. Полученный химическим путем рацемат содержит равные количества право- и левовращающих энантиомеров и не вызывает вращения плоскости поляризации. Разделение рацемата путем фракционной кристаллизации позволило показать, что ингибирующая активность правовращающей (+) и левовращающей (—) форм одинакова⁽⁴⁾. Изомеризация же $\Delta_{2,3}$ пис-двойной связи в боковой цепи в $\Delta_{2,3}$ -трансформу вызывала резкое снижение биологической активности ингибитора⁽⁵⁻⁷⁾. Но транс-форма абсцизовой кислоты, как и (—)-энантиomer, в растениях не найдена.

В качестве объектов исследования были взяты кора с осенних побегов ивы (*Salix purpurea* L.), осенние почки ивы и черной смородины (*Ribes nigrum* L.), семена табака (*Nicotiana tabacum*) и розы (*Rosa canina* L.).

Выделение абсцизовой кислоты мы проводили по методу Милфорроу⁽⁸⁾ в модификации Николаевой и сотрудников⁽⁹⁾ и Поздовой⁽¹⁰⁾. Метанольный экстракт из растительного материала (использовали 80% метанол) упаривали под вакуумом до водной фазы, центрифугировали 15 мин. при 6 тыс. об/мин. После подкисления надосадочной жидкости до pH 3 (1N H₂SO₄) ингибитор переводили в очищенный от перекисей серный эфир, а затем из эфира в 5% водный раствор бикарбоната натрия. Из полученного раствора бикарбоната натрия при pH 7 с эфиром удаляли слабокислые и нейтральные соединения. Оставшийся раствор бикарбоната подкисляли до pH 3 и ингибитор переводили в серный эфир, эфирный экстракт упаривали под вакуумом. Ингибитор растворяли в 96% этаноле и подвергали хроматографическому разделению в восходящем токе растворителя: изопропанол — NH₄OH — H₂O (10:1:1) на бумаге «Ленинградская медленная». Хроматограммы изучали на биологическую активность. Биотесты — рост отрезков колеоптилей пшеницы и прорастание семян горчицы Сарептской. Положение синтетической (±)-абсцизовой кислоты на бумажных хроматограммах определяли путем обработки их водным раствором KMnO₄, дающим желтый продукт с абсцизовой кислотой.

Зону хроматограммы, соответствующую по значению R_f стандарту абсцизовой кислоты и обладающую ингибирующей активностью, подвергали элюции 96% этанолом. Элюат рехроматографировали на пластинках для тонкослойной хроматографии марки «Силуфол UV-254» (адсорбент — силикагель с дополнительным люминесцентным индикатором) в восходящем токе бензола — этилацетата — уксусной кислоты (50:5:2), а затем в токе

растворителей: хлороформ — бензол — CH_3COOH (100:100:1) или бензол — этилацетат — CH_3COOH (70:30:5). Хроматограммы оценивали на биологическую активность. Зону ингибитора элюировали этанолом и использовали для изучения спектра поглощения ингибитора в у.-ф. свете, а также спектров дисперсии оптического вращения (д.о.в.) и кругового дихроизма (к.д.) (для получения спектров д.о.в. и к.д. ингибиторов растворяли в смеси этанол — 0,005 N H_2SO_4 в соотношении 1:1).

Спектры поглощения в у.-ф. свете снимали на спектрофотометрах «Unicum» и СФ-4, спектры д.о.в.— на спектрополяризаторе «Jasco», спектры к.д.— на дихромографе «Roussel—Jouan II». Стандарт, (\pm)-абсцизовая кислота, получен от Корнфорта (J. E. Cornforth), Англия.

Первое разделение экстрактов из тканей коры ивы, почек ивы и смородины, а также семян табака и розы с помощью хроматографии на бумаге с последующим изучением хроматограмм на биологическую активность показало присутствие в них ингибитора, близкого по значению R_f , синтетической (\pm)-абсцизовой кислоте (табл. 1) и обладавшего высокой биологической активностью (табл. 2).

Рехроматография ингибитора на пластинках «Силуфол UV-254» позволила установить одинаковую подвижность ингибитора из исследованных тканей и стандарта — (\pm)-абсцизовой кислоты в нескольких системах растворителей (табл. 2). О положении ингибитора на пластинках с тонким слоем силикагеля судили по результатам кохроматографирования с синтетическим стандартом, просмотра в у.-ф. свете и по биологической активности отдельных участков хроматограмм (табл. 2).

Изучение спектров поглощения в у.-ф. свете этанольных (не подкисленных) растворов ингибитора из всех изучавшихся объектов показало, что максимумы поглощения ингибитора и синтетической (\pm)-абсцизовой кислоты обнаружаются при длине волны 253—256 м μ (рис. 1).

Оптическая активность молекулы ингибитора (эффект Коттона) исследовалась двумя способами. Изучалась дисперсия оптического вращения — вращение плоскости поляризации при прохождении луча света через исследуемое вещество — и круговой дихроизм — разность показателей поглощения лучей света, имеющих правую и левую круговую поляризацию. Обе величины, имеющие одинаковую физическую природу, характеризуют оптическую активность асимметрических молекул или хромофорных групп в молекуле (¹¹).

До настоящего времени для установления идентичности ингибитора с абсцизовой кислотой, как правило, пользовались методом д.о.в. Вместе с тем, метод к.д. имеет ряд преимуществ перед методом д.о.в. Так примеси

Таблица 1

Сравнительная подвижность абсцизовой кислоты и ингибитора из ивы, смородины, семян табака и розы в различных системах растворителей

Последовательность хроматографирования в системах растворителей	Значение R_f абсцизовой кислоты	Значение R_f ингибитора				
		из осенних почек смородины	из осенних почек ивы	из осенней коры ивы	из семян табака	из семян розы
Первичное хроматографирование на бумаге в изопропаноле — $\text{NH}_4\text{OH} — \text{H}_2\text{O}$ (10 : 1 : 1)	0,7—0,9	0,6—0,9	0,7—1	0,55—0,85	0,7—1	0,73—0,93
Повторное хроматографирование на тонком слое силикагеля						
1) в бензоле — этилацетате — CH_3COOH (50 : 5 : 2)	0,15—0,25	0,12—0,27	0,15—0,25	0,15—0,28	0,18—0,32	0,12—0,20
2) в хлороформе — бензоле — CH_3COOH (100 : 100 : 1)	0,05—0,1	0,05—0,01	—	0,05—0,1	—	—
3) в бензоле — этилацетате — CH_3COOH (70 : 30 : 5)	0,8—0,9	—	—	—	0,75—0,9	—

в виде оптически активных веществ, не поглощающих свет в изучаемой области спектра, но имеющих полосы поглощения в области видимой или дальней ультрафиолетовой, могут создавать дополнительный фон, накладывающийся на интересующий сигнал д.о.в. Поскольку эффект к.д. локализован в пределах полосы поглощения, влияние наложения далеких полос на этот эффект отсутствует. Кроме того, к.д. обладает большей разрешающей способностью⁽¹¹⁾.

В силу сказанного, для идентификации (+)-абсцизовой кислоты, выделенной из растительных объектов, очевидно, что именно изучение к.д. может быть особенно полезно, поскольку ингибитор присутствует в тканях в крайне низких концентрациях; кроме того, степень очистки ингибитора может быть не всегда достаточной для получения качественных спектров в д.о.в.

Полученные нами спектры д.о.в. растворов ингибитора из ивы, смородины, табака и розы (рис. 2) имели следующие характеристики: максимум при длине волны 285—290 мк, первая точка пересечения нуля при 269—270 мк, минимум — при 250 мк, второе пересечение нуля — при 225—230 мк. Эти характеристики близки к таковым для (+)-абсцизовой кислоты⁽³⁾ и эндогенной абсцизовой кислоты^(9, 10, 12, 13).

Спектр к.д. того же образца представлен на рис. 3. Как и следовало ожидать из общей теории оптической активности^(11, 14), максимум спектров к.д. по своему расположению соответствует точкам пересечения нуля спектра д.о.в. и, наоборот, точки пересечения нуля к.д. соответствуют максимумам в спектрах д.о.в. Точки *a*, *b* и *c* на рис. 2. Отрицательный максимум спектра к.д. — при длине волны 230—232 мк, положительный максимум — при 265 мк, пересечение нуля — при 248 мк, спад — при 315—320 мк. Таким образом, выделенный ингибитор имеет характерные для (+)-абсцизовой кислоты спектры д.о.в., известные из литературных источников, и спектры к.д., соответствующие свойствам д.о.в.

Полученные экспериментальные данные (биологическая активность, подвижность при хроматографировании на бумаге и тонком слое силикателя, спектры поглощения в у.-ф. свете, д.о.в. и к.д.) позволили охарактеризовать ингибитор из коры ивы, почек ивы и смородины и семян табака и розы.

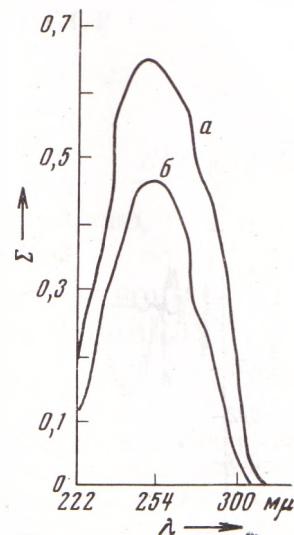


Рис. 1. Спектры поглощения в у.-ф. свете синтетической (\pm)-абсцизовой кислоты (а) и ингибитора из семян табака (б)

Таблица 2

Биологическая активность ингибитора из коры ивы, почек ивы и смородины и семян табака и розы

Объект	Навеска воз- душно-сухого материала в пятни, г	Биологическая активность, % к контролю	
		рост отрезков колеоптицией пшеницы	прорастание семян горчи- цы
Осенняя кора ивы	0,5	59	20
Осенние почки ивы	0,3	—	48
Осенние почки смородины	0,3	73	55
Семена табака	45	—	20
Семена розы	8,4	25	41
Синтетическая (\pm)-абсцизовая кислота	$1,6 \cdot 10^{-4}$	50	30

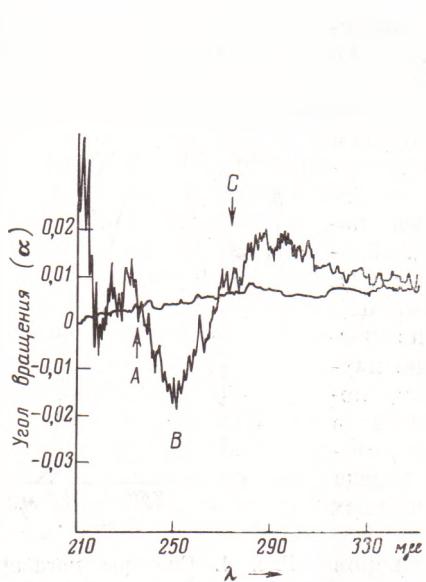


Рис. 2

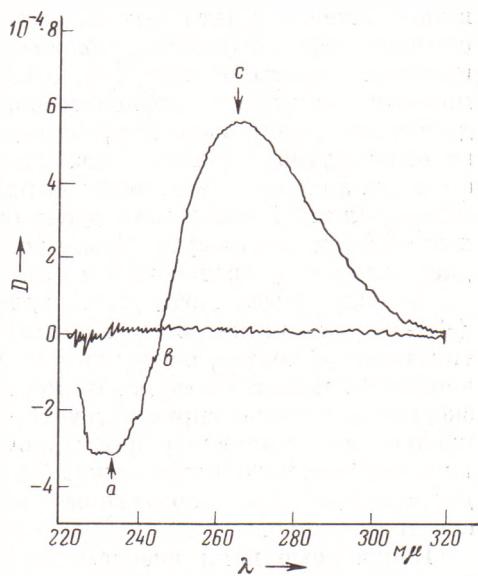


Рис. 3

Рис. 2. Спектр дисперсии оптического вращения ингибитора из семян розы (измерения проводили в 1-сантиметровой кювете). А, В, С — см. текст

Рис. 3. Спектр кругового диахроизма ингибитора из семян розы (оптическая плотность раствора равна 0,51). Измерения проводили в 1-сантиметровой кювете. а, б, с — см. текст

ризовать ингибитор, выделенный из коры ивы, почек ивы и смородины, семян табака и розы, как (+)-абсцизовую кислоту.

Все изучавшиеся нами объекты находились в состоянии покоя. Из тканей активнорастущих ивы и смородины выделить абсцизовую кислоту в достаточных количествах не удалось. По-видимому, абсцизовая кислота является одним из факторов, принимающих участие в регуляции процессов роста и покоя у растений.

Выражаем искреннюю благодарность Лаборатории физики биополимеров Института молекулярной биологии Академии наук СССР и межфакультетской лаборатории биоорганической химии Московского государственного университета за предоставленную возможность использовать диахромограф «Roussel — Jouan II» и спектрополяриметр «Jasco» для исследования спектров к.д. и д.о.в.

Институт физиологии растений
им. К. А. Тимирязева
Академии наук СССР
Москва

Поступило
28 III 1973

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ K. Okhuma, O. Smith et al., Life Science, 2, 142 (1963).
- ² J. E. Cornforth, B. V. Milborrow et al., Nature, 105, № 4978 (1965).
- ³ R. V. Millborrow, Science progress, 57, 228, 533 (1969).
- ⁴ B. V. Milborrow, In: Biochemistry and Physiology of Plant Growth Substances, Ottawa, 1968, p. 1531.
- ⁵ J. W. Cornforth, B. V. Milborrow, G. Ryback, Nature, London, 207, 715 (1965).
- ⁶ B. V. Milborrow, Planta, 70, 155 (1966).
- ⁷ В. И. Кефели, Ч. Ш. Кадыров и др., Физиол. раст., 17, в. 5, 1047 (1970).
- ⁸ B. V. Milborrow, Planta, 76, № 2, 93 (1967).
- ⁹ М. Г. Николаева, В. А. Царкова, Е. Н. Полякова, Бот. журн., 53, № 7, 975 (1968).
- ¹⁰ Л. М. Поздова, Бот. журнал, 57, № 2, 265 (1972).
- ¹¹ Л. Веллюз, М. Легран, М. Грежан, Оптический круговой диахроизм, М., 1967.
- ¹² С. А. Острейко, В. сборн. научн. работ Научно-исследовательского зонального института садоводства нечерноземной полосы, 3, 1971, стр. 278.
- ¹³ P. A. Jenkins, K. R. Shepherd, New Phytologist, 71, № 3, 501 (1972).
- ¹⁴ К. Джерасси, Дисперсия оптического вращения, ИЛ, 1962.