

حامض الأبسيسيك

ABSCISIC ACID

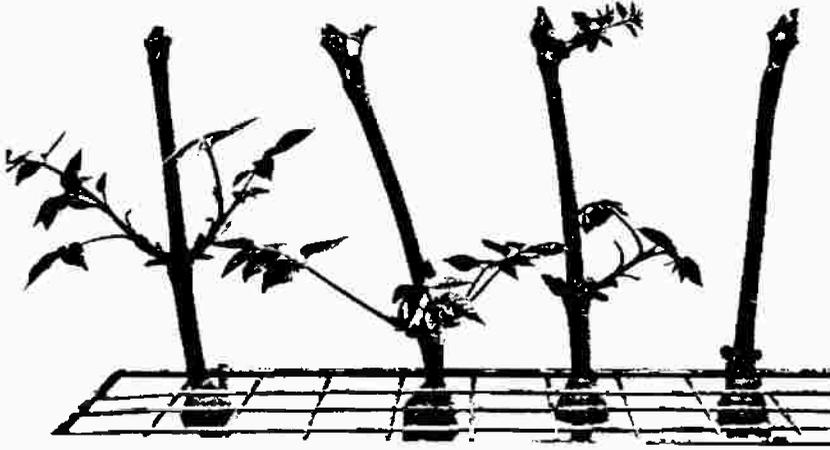
كيفية إكتشافه:

يرجع إكتشافه إلى مدرستين مختلفتين تعملان تقريباً في آن واحد وكل منهما مستقل عن الآخر تماماً، المدرسة الأولى في كاليفورنيا بالولايات المتحدة بواسطة Addicott ومساعدوه.

والمدرسة الثانية في ويلز Wales ببريطانيا بواسطة Wareing ومساعدوه.

قام Addicott ومساعدوه بعمل تجارب كثيرة للتعرف على أسباب سقوط لوز القطن الصغير الغير ناضج immature boll shedding حيث أنه من المعروف أن الأزهار غير المخصبة تسقط وأيضاً نسبة من الأزهار المخصبة أثناء تكوينها اللوز ولذلك فإن نسبة من اللوز الغير ناضج في الأعمار الصغيرة تسقط أيضاً في نباتات القطن . وقد أمكن عزل مركب في صورة بلورية من جدار لوز القطن الجاف تسبب سقوط أعناق أوراق البادرات. حيث يتم إزالة نصل الأوراق من الأعناق ثم يتم معاملة الأعناق بهذه المادة المختبرة. وقد سمي هذا المركب باسم abscisin I عام ١٩٦١ . أمكن أيضاً إستخلاص مركب آخر في صورة بلورية من لوز القطن الغير ناضج الصغير وأنه يسرع من سقوط أعناق أوراق القطن وسمى باسم abscisinII . إتضح أيضاً أن هذا المركب الأخير يسبب تثبيط نمو غمد الريشة لنبات الشوفان أى الزمير . إتضح أيضاً أن المركب الأول ليس له وجود وأن المركب الثاني هو الأساس ولذلك فقد أجريت البحوث بعد ذلك بإستعمال مركب abscisinII منذ إكتشافه عام ١٩٦٣ .

قام Wareing ومساعدوه بإجراء تجارب على البرعم الطرفي لبعض النباتات مثل الإسفندان *Acer* و *Betula* (شكل ١٤٠) لإختبار أسباب سكون هذا البرعم عند حلول فصل الخريف.



(شكل ١٤٠) تأثير ABA على سكون البراعم في نبات white ash من الشمال إلى اليمين المقارنة ثم تركيز ٤، جزء في المليون ثم ٢ جزء في المليون ثم ١٠ جزء في المليون.

وقد افترض تكون مركبات مثبطة تسبب سكون هذه البراعم. وقد أمكن إثبات ذلك بالدليل القاطع.

وقد إقترح تكوين مركبات مثبطة أو مركب مثبط في الأوراق التامة البلوغ mature في النباتين السابقين عند حلول الخريف أى في أيام قصيرة النهار. وأن هذا المركب ينتقل في اللحاء من الأوراق إلى أعلى حتى يصل إلى القمة النامية ويسبب منع إنقسام الخلايا والنمو ولذلك يصبح البرعم الطرفي كامن. أمكن بعد ذلك عزل مركب في صورة نقية بلورية من أوراق نبات الإسفندان *Acer*، أثناء وجود هذا النبات في أيام النهار القصير، وله فاعلية في تثبيط نمو البرعم الطرفي وأيضاً غمد الريشة للزمير وكمون بذور نبات *Betula* وسمى هذا المركب dormin عام ١٩٦٣ لأنه يسبب سكون البراعم dormancy.

وحيث أن كلاً من هاتين المجموعتين في الولايات المتحدة وبريطانيا كانتا تعملان مستقلتان تماماً دون أى إتصال ولكن فى النهاية وبعد الكشف عن المركب المعزول فى كل حالة إتضح أن المركبين لهما نفس الخواص الطبيعية والكيميائية . يتضح من ذلك أن المركبين abscisinII و dormin هما عبارة عن مركب واحد وقد إتفق على تسمية هذا المركب باسم حامض الأبسيسيك abscisic acid (ABA) عام ١٩٦٥ . وقد اشتق الأسم من سقوط الأوراق أو الثمار أو الأزهار حيث يسمى السقوط abscission وبالرغم أن تسمية هذا المركب مشتقة من عملية السقوط للأوراق أو الثمار الغير ناضجة إلا أن هذا المركب ليس له دور جوهري فى سقوط الأوراق أو الأزهار أو الثمار وأيضاً يمكن القول أنه عديم الفاعلية فى هذا الشأن . لذلك تعتبر التسمية غير معبرة حيث أن هذا المركب يسبب سكون البراعم وكمون البذور وتثبيط نمو النبات ولكن بالرغم من ذلك فإن التسمية مستمرة حتى الآن .

يعتبر هذا المركب من منظمات النمو من مجموعة المثبطات inhibitors وهو على العكس تماماً من منظمات النمو السابقة مثل الأوكسينات والجبريلينات والسيتوكينينات والتي تعتبر activators منشطات .

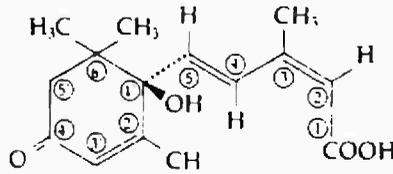
تركيب وأنواع حامض الأبسيسيك :

يتكون هذا المركب من ثلاثة وحدات من isoprene بينما يتكون الجبريللين من أربعة وحدات أى أن حامض الميفالونيك mevalonic acid أساسى فى تكوين هذا المركب كما هو الحال فى الجبريللين . توجد مجموعة كربوكسيل واحدة فى هذا المركب (شكل ١٤١) .

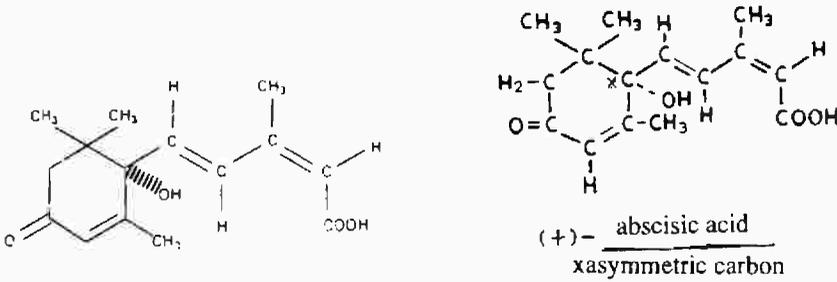
يوجد فى هذا المركب نوعين من التشابه isomerism تشابه ضوئى optical وتشابه فراغى تركيبى geometric .

يوجد لهذا المركب نوعين من المشابهات الضوئية optical isomers حيث أن الجزيء به ذرة كربون وهى رقم ١ غير متماثلة asymmetric . ولذلك يوجد نوعين من المشابهات الضوئية وهما dextrorotatory أى + حيث يحول الضوء المستقطب

ناحية اليمين والتونوع الآخر وهو laevorotatory أى - حيث يحول الضوء المستقطب ناحية الشمال . النوع الأول أى ABA+ هو الوحيد الذى يوجد طبيعياً فى النبات أما النوع الآخر وهو ABA - فلا يوجد فى النبات إطلاقاً (شكل ١٤٢) . يمكن عمل ABA تركيبى synthetic وهو يكون racemic أى يحتوى على خليط من كميات متساوية تقريباً من النوعين + و- . حيث أنه من الصعب جداً فصل هذين المشابهين عن بعضهما أثناء التصنيع . كما وجد أن كفاءة هذين المشابهين غير متساوية عادة فى الإختبارات الفسيولوجية والبيولوجية . ولذلك يستخدم هذا المخلوط الراسيمى racemic mixture من ABA التركيبى فى التجارب .



حمض S أبسيسيك S - abscisic

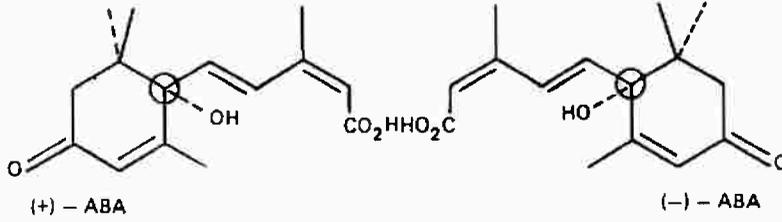


(شكل ١٤١) : التركيب الجزيئى لـ ABA

التركيب الجزيئى بالذرات (يمين)

التركيب الجزيئى العام (شمال)

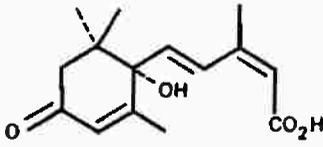
ذرة الكربون ذات علامة x فيها عدم الثبات ولذلك يحدث المشابهين الضوئيين لهذا المركب .



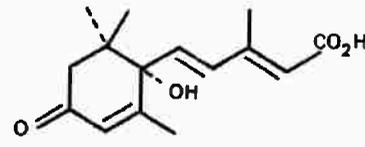
(شكل ١٤٢) : التركيب الجزيئي لمشابهي حامض الأبسيسيك.

يوجد لهذا المركب أيضاً نوعين من المشابهات الفراغية التركيبية geometric isomers (شكل ١٤٣) لذرة الكربون رقم ٢ فى السلسلة. حيث يوجد ABA 2-cis والنوع الأخر هو 2-trans ABA . يعتبر المركب الأول فعال فسيولوجياً بينما المركب الثانى غير فعال فسيولوجياً. تحتوى النباتات على خليط من هذين المشابهين.

يعتبر حمض الأبسيسيك من مركبات سس كوتربين sesquiterpene ويحتوى على خمس عشرة ذرة من الكربون ويتميز بحلقة سداسية التكوين ومركزاً غير متناظر وستة من الكربون الإستبدالى الغير مشبع (شكل ١٤١) والمركز غير المتناظر هو المسئول عن وجود صورتين من المشابهات enantiomorphic forms ، وهى R - حمض الأبسيسيك ((S) abscisic acid) و(R) والثانية S - حمض الأبسيسيك ((S) abscisic acid) وصورة الحمض (S) هى الصورة النشطة الموجودة طبيعياً ولهذا السبب يشار إليها ببساطة بحمض الأبسيسيك أو ABA دون تحديد. هذا بالإضافة إلى أن المشابهين نشطان ضوئياً ، فمثلاً (S)(+) - حمض الأبسيسيك (abscisic acid) - (+) (S) يمينى الدورة أى يتسبب فى انحراف الضوء المستقطب بشدة إلى اليمين. وفى الحقيقة فإن حمض الأبسيسيك يكشف عنه عادة بطرق التشتت الدورانى الضوء بصرية optical rotatory dispersion لأنه يعتبر من أكثر المنتجات الطبيعية ذات النشاط الضوئى المعروفة للإنسان.



2 - cis - ABA



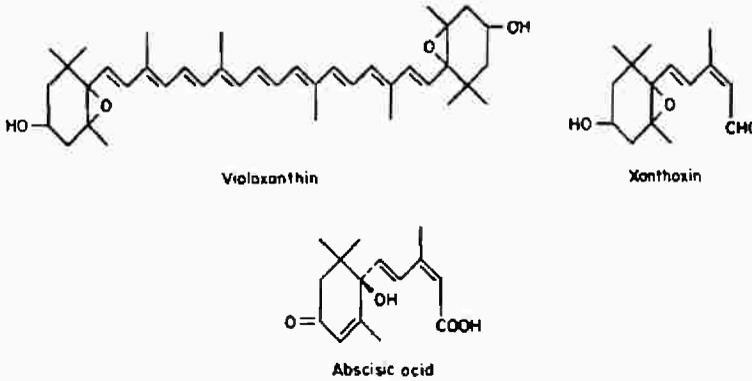
2 - trans - ABA

(شكل ١٤٣) : التركيب الجزيئي لـ 2-cis-ABA و 2-trans-ABA

كيفية تخليق ABA طبيعياً:

يعتقد في حدوث طريقتين يتم بهما تخليق ABA وهما طريقة أكسدة الزانثوفيل وطريقة حامض الميفالونيك. توجد طريقة ثالثة خاصة بالفطر *Cercospora rosicola*.

في طريقة أكسدة الزانثوفيل xanthophyll (شكل ١٤٤) يتحول أحد مركبات الزانثوفيل وهو فيولزانثين violaxanthin عن طريقة عملية الأكسدة إلى مركب xanthoxin. وجد أن المركب الأخير يشابه ABA في كثير من الأختبارات الفسيولوجية.

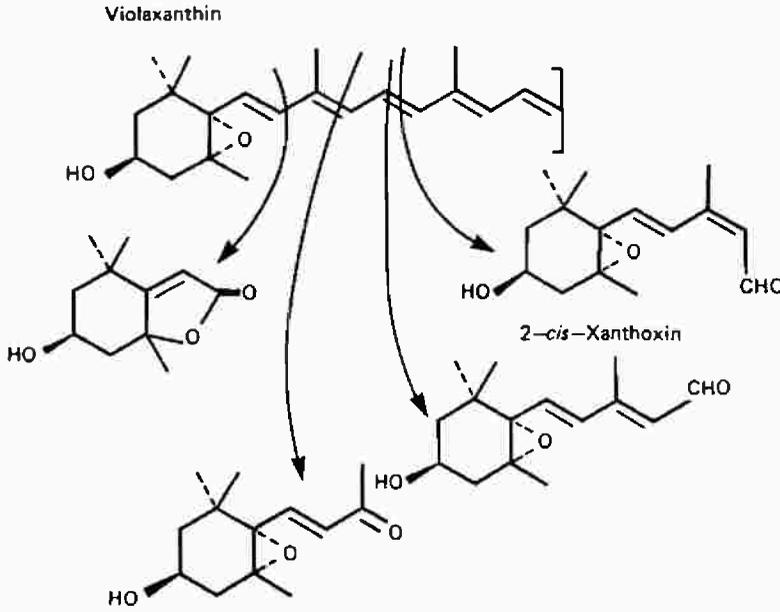


(شكل ١٤٤) : تخليق حامض الابسيسيك عن طريق أكسدة بعض الزانثوفيلات مثل فيولزانثين وزانثوكسين.

ويعتقد أن هذا المركب هو عبارة عن المركب الأصيل precursor الذى يتكون منه ABA. حيث وجد أنه من السهل جداً أن يتحول مركب xanthoxin فى داخل النبات إلى ABA.

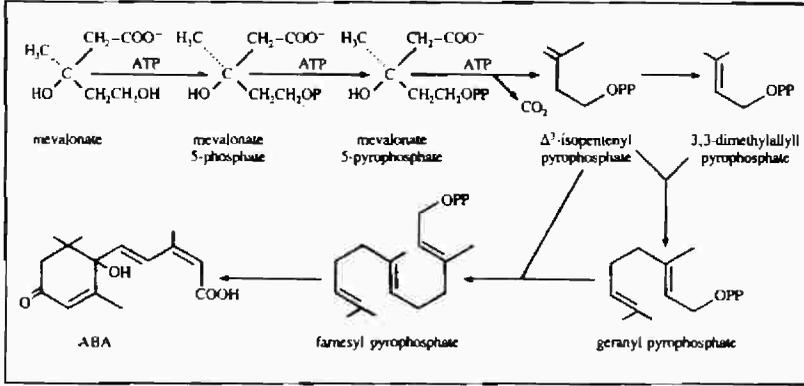
ومما يثبت ذلك أن تغذية نبات الطماطم بمركب xanthoxin يسبب زيادة فى تركيز ABA. وقد أستعمل فى هذه التجارب مركب xanthoxin معلّم أى مشع بإستعمال كربون مشع ك¹⁴.

وجد فى تجارب أخرى أن المركبات الوسيطة لتحلل فيولازانثين تحتوى بعض المركبات منها 2-cis-xanthoxin ومركبات أخرى (شكل ١٤٥). ومن المآخذ على هذه الطريقة أن بعض النباتات لا تحتوى أو تحتوى على كميات أثرية من مركب violaxanthin وبالرغم من ذلك يتكون ABA.



(شكل ١٤٥) : الأكسدة الضوئية *in vitro* لمركب فيولازانثين وحيث يتحلل وينشق إلى مركبات عديدة منها 2-cis-xanthoxin وثلاثة مركبات أخرى. جميع هذه الأربعة مركبات أمكن عزلها من الأوراق الخضراء.

في طريقة حامض الميفالونيك mevalonic يتكون ABA من هذا الحامض (شكل ١٤٦) يتكون ABA من ثلاث وحدات من isoprene ولذلك يسمى sesquiterpene بينما يتكون الجبريللين من أربعة وحدات من isoprene ولذلك يسمى diterpene . ولذلك يعتبر حامض mevalonic هو المركب الأصل precursor الذي يتكون منه ABA أو الجبريللين. وجد أن أوراق نبات القمح يمكن أن تخلق بسرعة كبيرة ABA عند وجود النبات في ظروف قلة الماء water stress وأن معاملة هذا النبات بحامض mevalonic مشع يسبب ظهور الإشعاع في ABA . كما يمكن إثبات ظهور الإشعاع فيه عند معاملة أجزاء مختلفة من النبات بحامض mevalonic مشع وهذه الأجزاء هي الأجنة أثناء تكوينها والأندوسبرم والثمار في عدد من النباتات. يتم تحويل حامض mevalonic إلى 2-trans ABA وهذا المركب غير نشط فسيولوجياً وتحدث هذه الخطوة في وجود الضوء أو الظلام.



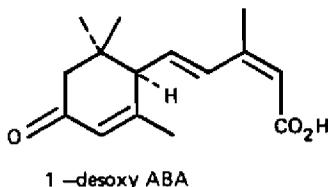
(شكل ١٤٦) : خطوات تحويل ABA من حامض الميفالونيك.

يتم تحويل 2-trans ABA إلى 2-cis ABA في وجود الضوء فقط. يعتبر المركب الأخير نشط فسيولوجياً. خطوات التحول غير معروفة حتى الآن.

يضاد ABA نشاط وفعالية الجبريللين في كثير من التفاعلات والعمليات الحيوية. كما أن نقص تركيز الجبريللين في النبات endogenous gibberellins يصاحبه

دائماً زيادة في تركيز endogenous ABA والعكس صحيح. وقد أمكن إثبات ذلك في كثير من النباتات منها الأسفندان *Acer* و *Betula* ودرنات البطاطس أثناء فترات سكون البراعم وأيضاً أثناء فترات نموها.

وجد أن فطر *Cercospora rosicola* يكون 1-desoxy ABA في البيئة ويكون أيضاً حامض ABA (شكل ١٤٧).



(شكل ١٤٧): تكوين مركب 1-desoxy ABA أثناء تخليق ABA في مزرعة الفطر *Cercospra rosicola*.

مدي إنتشار ABA في النباتات المختلفة :

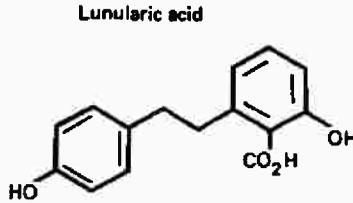
يوجد ABA في أجزاء مختلفة لنباتات كثيرة من الفطريات والطحالب والبكتريا والثيريديات ومنها السرخسيات و عاريات وكاسيات البذور. لا يوجد حتى الآن دليل على وجود هذا المركب في الحزازيات المنبثقة أو القائمة ولازال هذا الوضع للحزازيات غامض. يوجد مركب مشبط إسمه lunularic أمكن إستخلاصه من الحزازيات المنبثقة.

أمكن إثبات وجود مركب ABA في كثير من النباتات (جدول ١٠). تعتبر الثمار من الأجزاء الغنية بهذا المركب وعامة تحتوى على أعلى التركيزات بالنسبة للأجزاء الأخرى من النبات ومثال ذلك ثمار الورد حيث تحتوى على أعلى تركيز من هذا المركب حتى الآن.

وجد في جميع أنسجة النباتات الزهرية ومنها أنسجة الجذر وخشب ساق النبات وعصارة الخشب وعصارة اللحاء وجيوب اللقاح وبتلات الأزهار والثمار والبذور.

تتراوح تركيزاته بكثرة فهو يوجد بتركيز 5 - 3 ميكروجرام لكل كيلوجرام فى النباتات المائية ويوجد بتركيز 10 ملليجرام لكل كيلو جرام فى الجدار الثمرى الوسطى mesocarp لثمار الأفوكادو. تركيزه فى أوراق نباتات المناطق المعتدلة يتراوح عادة بين 50 إلى 500 ميكروجرام لكل كيلو جرام. وجد حديثاً نسبياً أن فطر *Botrytis cinerea* يقوم بتخليق ABA.

يوجد بديل ABA لهورمون فى الحزازيات يسمى حامض ليونولاريك lunularic (شكل 148). يمكن تقدير تركيزه بطريقة حيوية بواسطة إستعمال جيمات gemmae حزاز *Lunularia cruciata* وهو حزاز منبطح وقد سمي الهورمون بإسم هذا الحزاز لأنه أستخرج منه لأول مرة. وقد أمكن إثبات أن التركيزات العالية نسبياً من هذا الهورمون تمنع نمو الجيمات. يوجد هذا الهورمون فى حزازيات منبطحة أخرى. يوجد أيضاً مثيل أستر هذا الهورمون طبيعياً فى النبات وقد أمكن التعرف عليه بواسطة GLC.



(شكل 148) : التركيب الجزيئى لحامض lunularic.

يتأثر هذا الهورمون بطول النهار ففى النهار القصير يقل تركيز الهورمون وينمو الحزاز بسرعة والعكس فى حالة النهار الطويل. وجد أيضاً أن أطوال موجة الضوء تؤثر على تركيز الهورمون والنمو ففى الضوء الأحمر (طول موجه 650 نانومتر) يقل تركيز الهورمون وتزداد سرعة نمو الحزاز والعكس صحيح فى الضوء الأحمر البعيد (طول موجه 735 نانومتر) ولذلك فإن للفيتوكروم دور فى ذلك. وجد أن هذا الهورمون يحل محل ABA فى هذه النباتات حيث يزداد تركيزه عند حدوث جفاف فى بيئة الحزاز وتوقفه عن النمو.

(جدول ١٠) : بعض النباتات والأجزاء التي يوجد فيها ABA .

العضو أو الجزء أو النسيج النباتي	النبات
الأوراق	<i>Acer pseudoplatanus</i> الأسفندان
الأوراق	<i>Betula pubescens</i>
الدرنات	البطاطس
الريزوم	<i>Pteridium aquilinum</i> سرخس
الساق	الفاصوليا
البرعم القمي	<i>Xanthium strumarium</i> زائثيم
البرعم الزهري	البن
الثمار	التفاح
الأندوسبرم	جوز الهند الخوخ
عصارة الخشب xylem sap	

تحتوي النباتات على مركبات مشابهة بدرجة كبيرة لـ ABA في تركيبها الكيماوي. ومن هذه المركبات phaseic acid الموجود في *Phaseolus multiflorus* ومركب thiaspirone الموجود في أوراق نبات الشاي ومركب 2-trans ABA الموجود في ثمار الشليك ومركب abscisyl B-D-glucopyranoside (+) الموجود في ثمار الترمس. يوجد مركب methyl ester ABA وهو ذو نشاط ضعيف يتكون تركيباً فقط أي صناعياً ولا يتكون هذا المركب طبيعياً في النبات . ويمكن إعتباره ABA تركيبي مع ملاحظة ضعف فاعليته ونشاطه.

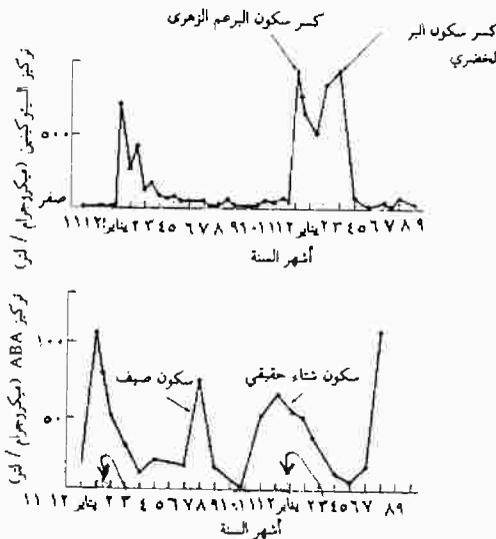
أماكن تخليق ABA :

تعتبر البلاستيدات الخضراء هي مكان تخليق ABA. عند عزل بلاستيدات خضراء سليمة من أنسجة ثمار الأفوكادو فإنها تكون قادرة على تخليق ABA عند تغذيتها أو معاملةها بحامض mevalonic. وجد أيضاً أن عزل بلاستيدات خضراء سليمة صحيحة من أوراق الفاصوليا تكون قادرة على تخليق ABA. أما عن وجود

أماكن أخرى لتخليق هذا المركب خلاف البلاستيدات الخضراء فحتى الآن لم يمكن إثبات ذلك حيث أنه لم يمكن إثبات تخليق هذا المركب في أنسجة خالية من البلاستيدات الخضراء حتى الآن. ولكن حديثاً وجد أنه يمكن تخليق ABA في سيتوبلازم خلايا أوراق السبانخ وأنه لم يتم تخليقه في البلاستيدات الخضراء في هذه الخلايا عكس القاعدة العامة. انظر موضوع تخليق وانتقال وتوزيع الهرمون داخل الخلية.

إنتقال ABA :

نتيجة للدراسات على إنتقاله في غمد الريشة لنباتات العائلة النجيلية وأيضاً قطاعات سيقان نباتات مختلفة فقد اتضح أن إنتقال ABA يكون جهازى systemic وفي أى اتجاه. أى أنه لا يظهر خاصية الإنتقال القطبى. تكون سرعة الإنتقال حوالى ٢ سم لكل ساعة. يزداد تركيز ABA في عصارة الخشب في نبات الصفصاف أثناء الشتاء وأيضاً في الصيف عندما يتوقف النمو ويقل في الربيع والعكس صحيح في السيتوكينين (شكل ١٤٩).



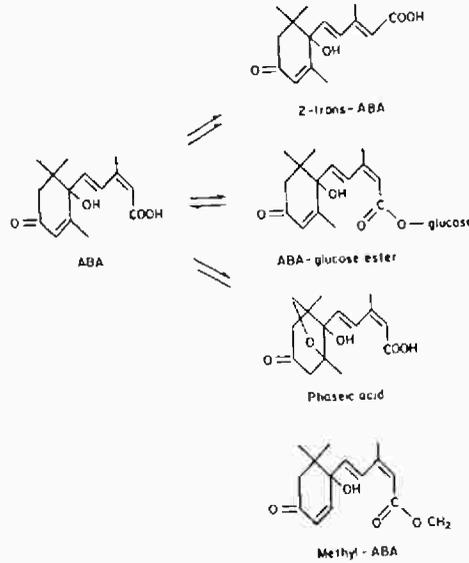
(شكل ١٤٩) : تركيز ABA والسيتوكينين في عصارة خشب نبات الصفصاف أثناء أشهر السنة المختلفة.

ينتقل بسرعة كبيرة على وجه الخصوص في نسيج اللحاء كما يمكن أن ينتقل في نسيج الخشب كما أنه يمكن أن ينتقل من خلية إلى أخرى وخاصة الخلايا البارنثيمية ولذلك فإن وجوده في أي نوع من الأنسجة أو الخلايا لا يكون دليل على أن التخليق يحدث في هذه الخلايا حيث يمكن أن ينتقل إلى هذه الخلايا دون أن يخلق فيها .

وجد أن معاملة ورقة بادرة الفاصوليا بهذا الهرمون فإنه يتنشر في جميع أجزاء البادرة في خلال يوم واحد ووجد ١٨٪ منه في العقد الجذرية. وجد نفس الشيء في بادرة القطن الأمريكي (*G. hirsutum*) حيث يظهر ABA في جذور البادرة بعد ثمانية أيام من معاملة الأوراق . أستعمل في التجربتين السابقتين ABA مشع في ذرة الكربون ك^{١٤}.

طرق فقد نشاط ABA - Inactivation of ABA

يحدث للـ ABA في النبات تحولات كثيرة ونتيجة لذلك يفقد هذا المركب خصائصه وهذه الحالات ما يأتي (شكل ١٥٠).



(شكل ١٥٠) : إرتباط حامض الأبسيسيك وتأثره بالضوء.

١ - عن طريق التحول الضوئي حيث يتحول الى 2-trans ABA .

٢ - الأكسدة لتكوين phaseic acid .

المركبان السابقان ليس لهما أى تأثير أو أى نشاط للحامض ABA .

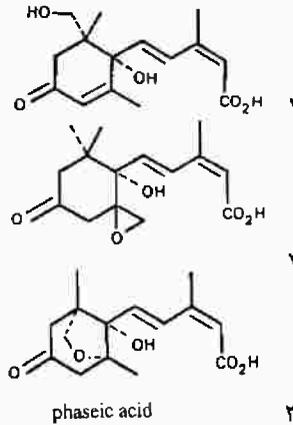
٣ - يمكن تحويله إلى glucoside وهو مركب ABA glucose ester حيث يرتبط الجلوكوز بمجموعة الكربوكسيل وهذا المركب أيضاً غير فعال ولكن بواسطة العصير الخلوى فى الخلايا يمكن تحويله إلى حامض الإبيسيك بسهولة .

يتم منع نشاط ABA بطرق عديدة منها الإرتباط conjugation والقيد binding . فى حالة الأرتباط يكون أرتباط ABA بمركب آخر حجمه صغير عادة مثل سكر أحادى أو حامض أمينى ويكون ذلك بواسطة رابطة تعاونية covalent link مثل رابطة الجلوكسيد glucoside أو رابطة الأستر . بينما يعتبر القيد أن يصبح الهرمون مقيد bound ABA أى يرتبط بجزئيات كبيرة ويكون الإرتباط برابطة غير تعاونية non covalent bond ولا يمكن إستخلاصه بعملية الغسيل بواسطة بيئة مائية . يمكن فقد نشاط حامض الأبسيسيك بطرق عديدة وهى ما يأتى :

١ - فقد التنشيط بالأكسدة Oxidative inactivation of ABA :

أول المحاولات لعزل ناتج تحول غذائى لهذا الهرمون metabolite of ABA نتج عنها مركب S-hydroxymethyl ABA (شكل ١٥١ أ) . يوجد مشابه لهذا المركب وهو عبارة عن phaseic acid . وقد تم عزله من الفاصوليا . ولكن أتضح فيما بعد أن هذا التركيب خاطئ (شكل ١٥١ ب) . وقد أمكن بإستعمال NMR nuclear magnetic resonance spectrum التعرف على التركيب الصحيح لهذا المركب (شكل ١٥١ ج) . فى حالة أستر ميثيل ABA فإنه يتكون قمتين أى علامتين signals حيث أن الذرة رقم ٦ تحمل مجموعتين ميثيل . بينما فى حالة التركيب الصحيح لحامض phaseic يكون له قمة (علامة signal) واحدة عند ذرة الكربون رقم ٦ وقمة أخرى عند ذرة الكربون رقم ٢ وكلاهما لمجموعة الميثيل . بينما فى حالة أستر

ميثيل ABA يمكن إزالة مجموعة الميثيل على الذرة رقم ٢ وأن يحل محلها ذرة إيدروجين مشع عبارة عن الديوتيريوم deuterium. وعند فحص المركب الأخير وهو 2-Me-deuteriated sample of ABA بواسطة بروتون NMR (بروتون NMR) (شكل ١٥٢) فإنه لا يتكون قمة لمجموعة الميثيل عند ذرة الكربون رقم ٢. عند تغذية نباتات طماطم بواسطة المركب السابق أي 2-Me-deuteriated ABA فإنه يتم تحويله داخل النبات إلى phaseic. باستخلاص الحامض الأخير من الطماطم والكشف عنه بواسطة NMR فإنه يتكون قمتين signals لمجموعتين ميثيل إذا كان التركيب الأول صحيح وتتكون قمة واحدة فقط إذا كان التركيب الثاني صحيح وذلك في حالة إستبدال مجموعة الميثيل على ذرة الكربون رقم ٢ بذرة إيدروجين مشع ديوتيريوم. وجد أنه تتكون قمة واحدة فقط دليل على أن المركب الثاني صحيح والمركب الأول خاطيء. يتكون حامض الفاسيك وذلك بإستبدال مجموعة هيدروكسي ميثيل 6-hydroxymethyl على ذرة الكربون رقم ٦ وتكوين قنطرة أو رابطة إيثير an ether bridge وأيضاً عمل تشبيح للرابطة المزدوجة الموجودة بين ذرة كربون رقم ٢ وذرة كربون رقم ٣.

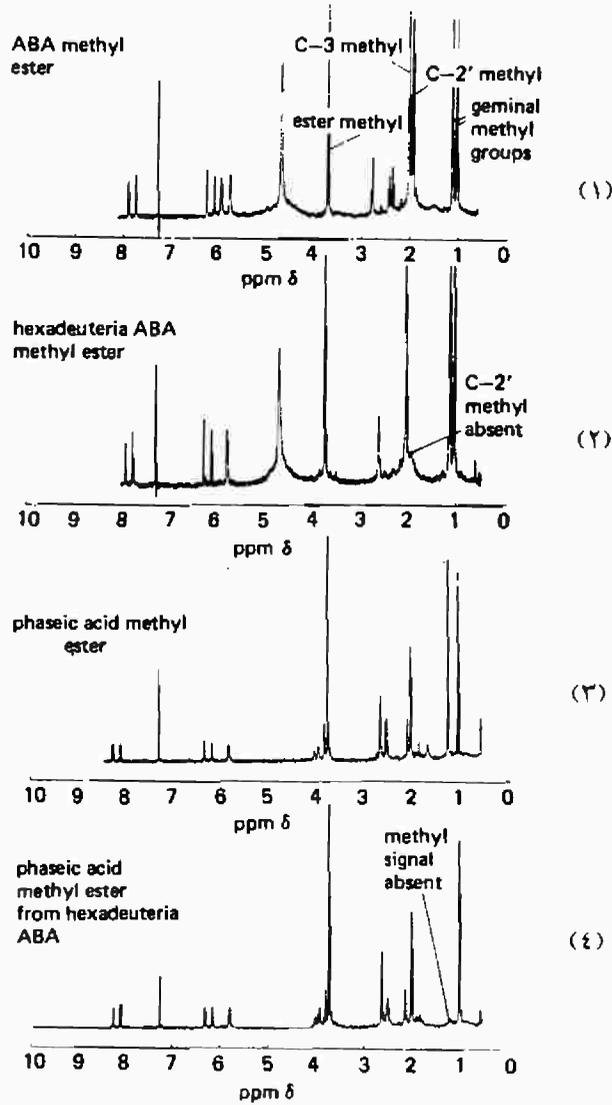


(شكل ١٥١) : حامض الفاسيك ومشتقاته

١ - 6,S hydroxymethyl ABA = Metabolite C

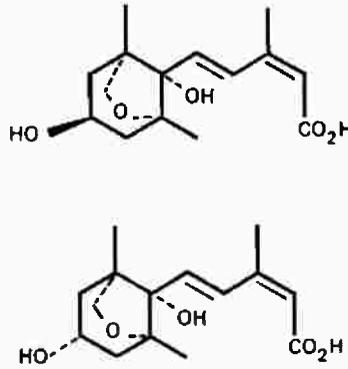
٢ - تركيب خاطيء لحامض الفاسيك.

٣ - تركيب صحيح لحامض الفاسيك.



(شكل ١٥٢): أطياف ميثيل أستر حامض الفاسيك وميثيل أستر ABA بأستعمال جهاز NMR. مجموعة الميثيل على ذرة الكربون ٢ في الحلقة واضحة في ABA عند $\delta 1.9$ (١) ولكنها غائبة في حالة hexadeuteria ABA (٢). وعند أستعمال hexadeuteria ABA في تغذية نبات الطماطم فإن حامض الفاسيك المتكون ينقصه مجموعة ميثيل عند $\delta 1.2$ (٤) بالمقارنة بحامض الفاسيك العادي (٣). يثبت ذلك أن مجموعة الميثيل في حامض الفاسيك تنشأ من مجموعة الميثيل الموجودة على ذرة الكربون رقم ٢ في حامض الأيسيميك ABA.

بعد تكوين حامض الفاسيك فإنه يختزل إلى نوعي two epimeric من dihydrophaseic acid حيث توجد مجموعة إيدروكسيد على ذرة الكربون رقم ٤ حيث يكون التوزيع الفراغي لمجموعة الإيدروكسيد في أحدهما إلى أعلى وفي الآخر إلى أسفل (شكل ١٥٣). وجد تفاعل عكسي يمكن به تحويل، عن طريق الأنزيمات، مركبين dihydrophaseic acid عن طريق الأكسدة إلى phaseic acid وذلك بواسطة أنزيمات alcohol dehydrogenases في وجود زيادة من excess من NAD. يتحول dihydrophaseic acid إلى 4-B-D-glucoside



(شكل ١٥٣) التركيب الجزيئي لمشابهين dihydrophaseic acid.

يمكن أن يفقد ABA نشاطه وذلك بتحليله (تخطيمه destruction) أو أخفاء خاصة هامة للهورمون masking of an essential feature ويحدث تغيير بحيث يصبح الهورمون قطبي بدرجة كبيرة highly polar وأيضاً محب للماء hydrophilic properties ويكون ذلك بالأتحاد مع glucosyl أو ما يشابهه.

يحدث تجمع للمرتبطات القطبية polar conjugates في الفجوة العصارية للخلية. يمكن أن يحدث نحر للهورمون من هذه المرتبطات وذلك بواسطة تحلل قلوي alkaline hydrolysis. يعتبر ABA glucose ester وأيضاً ABA glucoside من المرتبطات والتي نتيجة لتحللها قلوياً ينتج ABA. تركيز ABA في البروتوبلازم وفي

فتات الخلية أى أجزاء الخلية بعد تخطيمها fragments يكون أعلى من تركيزه فى العصير الخلوى وذلك فى ثمار الجريب فروت واليوسفى .

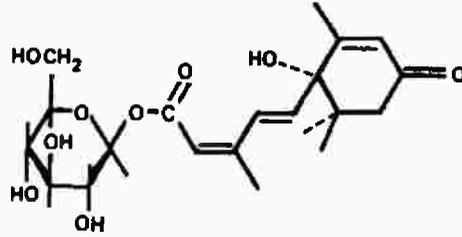
يعتبر كل من phaseic acid و dihydrophaseic acid ليس لهما أى تأثير على النمو أى عديما النشاط . وجد أن phaseic acid يثبط عملية البناء الضوئى بينما ABA لا يؤثر .

وجد أن حامض الفاسيك و ABA كلاهما فعال ويسببان غلق الثغور فى نبات *Commelina communis* وفى حالة ثغور الفول فإن ABA فعال فى غلق الثغور بينما حامض الفاسيك غير فعال . يعتبر dihydrophaseic acid غير فعال فى غلق الثغور إطلاقاً .

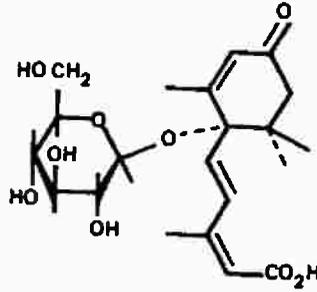
٢ - الأرتباط فى Conjugation of ABA-ABA :

يعتبر المركب المرتبط conjugate هو مركب مرتبط مع ABA ، وقد أمكن عزل أول مركب مرتبط وهو جلوكوز أستر ABA (glucose ester ABA) (ABAGE) . وجد أن كفاءة المركب الأخير هو نصف كفاءة ABA . يمكن أيضاً تخرير ABA نتيجة لتحلل ABAGE . وجد أيضاً أن ABAGE يعتبر أحد مشتقات ABA فى سيقان الطماطم (شكل ١٥٤) .

وجد حديثاً نسبياً مركب مرتبط اخر وهو ABA glucoside (ABAGS) . وجد أن كلا من ABAGE و ABAGS قابلان للتحلل بواسطة قلوى ضعيف (شكل ١٥٤) ولذلك يجب الحذر التام أثناء عمل التجارب عند تقدير تركيز ABA الحر والمركبات المرتبطة . وجد أن كحول الميثانول المتعادل وعلى وجه الخصوص القلوى يهاجم جلوكوز أستر ABA وينتج عن ذلك ميثيل ABA (MeABA) بينما يتحول ABAGS تدريجياً ذاتياً إلى ABAGE . يستعمل فى الأستخلاص عادة أسيتون حامضى . عامة جميع الأختبارات السابقة المبكرة لتقدير تركيز ABA الحر والمربط مشكوك فى صحتها ومن أمثلة ذلك أهمية ABA فى سكون البراعم أصبحت مثار للجدل .



ABA glucose ester



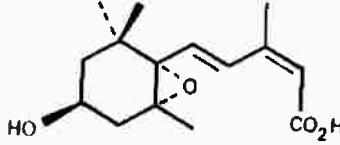
ABA glucoside

(شكل ١٥٤) : التركيب الجزيئي لمرتبطات ABA.

أجريت كثير من التجارب على نباتات ذابلة ووجد أن تركيز ABA ارتفع إلى أربعين مره بينما تركيز ABA المرتبط ظل ثابتاً. يدل ذلك على أن ABA المرتبط لا يعتبر مصدر لـ ABA الحر. وفي أحد التجارب لأكتشاف مدى التحلل المباشر لـ ABA المرتبط إلى ABA حر على نبات البنجر وعند تغذية النبات على ABA مشع في الكربون ك^{١٤} فإن ABA المرتبط الناتج منه يكون مشع أيضاً، وعند ذبول هذه النباتات فإن كمية ABA الحر تزيد بدرجة كبيرة بينما كمية ABA المرتبط تقل قليلاً جداً أى أن مصدر ABA هو ليست ABA المرتبط. وجدت نفس النتيجة في نبات الطماطم ولكن غير معروف حتى الآن هل يمكن تعميم النتيجة أم لا أى أنها عامة لجميع النباتات أو خاصة بالنباتات السابقة فقط.

وجد أن ABA + يمكن أن يتحول إلى حامض فاسيك بسهولة ولكن ABA - يتحول بضعف أو بصعوبة كما وجد أيضاً أن ABA (+) 2-trans يتحول بصعوبة

بالغة، والعكس صحيح في حالة مرتبطات الجلوكوز وهي ABAGE و ABAGS فإنها تتكون بسرعة في ABA - عنه في حالة ABA + أو 2-trans ABA. وجد أن بعض المركبات الأخرى xanthoxin acid ترتبط بسهولة (شكل ١٥٥).



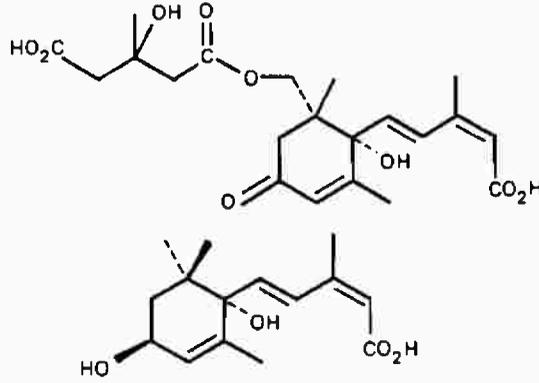
(شكل ١٥٥): التركيب الجزيئي لحمض xanthoxin.

يتضح مما سبق أن الأكسدة عبارة عن تثبيط متخصص (specific inactivation) و ABA بينما يعتبر الارتباط تثبيط غير متخصص (unspecific inactivation).

يتم تحويل حامض الفاسيك وأيضاً dihydrophaseic acid إلى ABAGE و ABAGS وأيضاً توجد مركبات أخرى لم يمكن تعريفها حتى الآن ولكن قد أستدل عليها بواسطة autoradiography of chromatograms أو بواسطة (monitoring HPLC elution profiles) HPLC الأستكشاف لنواتج الفصل لـ وجد أيضاً أنه يتكون من hydroxymethyl ABA مركب هو عبارة عن hydroxymethyl glutaryl ABA (شكل ١٥٦) في بذور الأكاسيا الكاذبة (*Robinia pseudacacia*) false acacia. ووجد أيضاً أن ABA يتحول إلى 1,4 -trans diol ABA في نبات البسلة (شكل ١٥٦) وأن هذا المركب يحدث له تجفيف dehydration أثناء التسخين أثناء أستعمال glc-mass spectrometry وينتج عنه مركب آخر وهو 4-deoxy ABA.

٣- إحداث التشابه Isomerization:

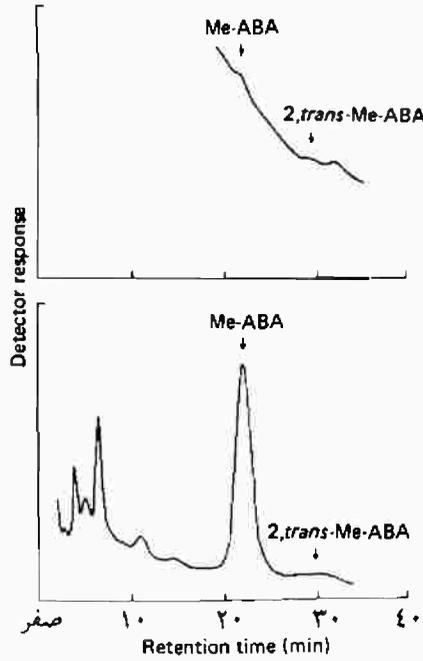
يسبب الضوء تحويل في تركيب ABA ويصبح مشابه له وهو 2-trans ABA ويتكون نتيجة لذلك خليط منهما والنسبة بينهما ١ : ١. وجد أن هذا التغير البسيط في التركيب يسبب فقد النشاط تماما. عند إختبار 2-trans ABA في الظلام وجد أن نشاطه ٢٪ فقط من نشاط ABA.



(شكل ١٥٦) : التركيب الجزيئي لمركب hydroxymethyl glutaryl ABA (علوي).
ومركب 1,4-trans diol ABA (سفلي)

توجد إختبارات كثيرة بجهاز GC لمركب ABA أظهرت أن كمية ضئيلة من 2-trans ABA موجودة بالأوراق بالرغم من الأحتياطات الشديدة لمنع عملية حدوث التشابه في أثناء العزل (شكل ١٥٧). وفي أحد التجارب الخاصة بذلك أمكن عمل إستكشاف monitoring لدرجة تحويل ABA إلى شبيهه 2-trans ABA وذلك بإضافة racemic ABA مشع أى ABA (C14) - ± إلى بيئة الأستخلاص من النبات. ثم يتم قياس تركيز (+)t-ABA الطبيعي وهو نشط ضوئيا optical activity بواسطة ORD (optical rotatory dispersion) (شكل ١٥٨). ثم يتم قياس تركيز كمية 2-trans ABA الذى نتج من تحول جزء من racemic ABA المشع وهو غير نشط ضوئيا optically inactive وذلك أثناء الأستخلاص. وقد وجد أن تركيز هذا 2-trans ABA الذى تحول أثناء الأستخلاص من راسيميك ABA المشع هو ١.٤. وقد وجد أن ١.٤ من ABA الطبيعي أى endogenous + ABA تحول إلى trans ABA. نستنتج من ذلك أن trans ABA يوجد طبيعيا فى الأوراق قبل الأستخلاص وليست نتيجة عملية الأستخلاص. أى أن trans ABA موجود طبيعيا فى الأوراق كما أن جزء آخر يتكون أثناء الأستخلاص.

Abscisic acid



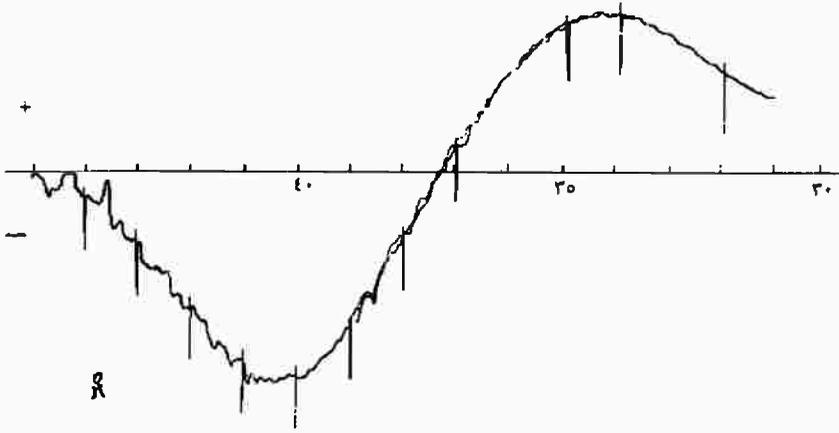
(شكل ١٥٧) : قياس حامض الأبسيسيك ABA

في مستخلص من براعم نبات brich بواسطة جهاز gas chromatography وذلك باستخدام flame ionization detector (أعلى) وبواسطة electron capture detector (أسفل). وزن العينة في القياس الأول ٠,٢٥ جم بينما وزن العينة في القياس الثاني ٠,٠٢٥ جم.

حيث أن النشاط الحيوي لمركب *trans*-ABA معدوم وأيضا فشل تحويله إلى ABA وعدم وجوده في بذور الأفوكادو وفي جذور الذرة أثناء الظلام تثبت أن *trans*-ABA لا يعتبر مركب أصل precursor يتكون منه ABA وإضافة إلى ذلك فإن *trans*-ABA لا يمكن أن يتحول إلى ABA أنزيميا.

يتضح من ذلك أن الاعتقاد قوى في أن *trans*-ABA عبارة عن ناتج تحلل لـ ABA في وجود الضوء phytochemical degradation. نقطة التوازن بين ABA و *t*-ABA هي أن تكون النسبة ١ : ١ في الأوراق ولكن لا يحدث ذلك مطلقا لأن سرعة إرتباط *t*-ABA مع السكريات وخاصة الجلوكوز تفوق سرعة إرتباط ABA عشرون

مرة. وجد أن سرعة تكوين ABA في أوراق الفاصوليا الفرنسية french beans في الأوراق الذابلة هي حوالي ثلاث إلى ستة ساعات ولذلك فإنه يوجد باستمرار إنتاج ل ABA ونقص لـ t-ABA حيث أنه يصبح مرتبط.



(شكل ١٥٨): طيف حامض الأبسيسيك باستخدام طريقة التشتت الدوراني الضوء بصري optical rotatory dispersion spectrum (ORD) وذلك في حالة ABA المستخلص من ثمار الأفوكادو. يعتبر الخط الأفقى هو درجة تشتت دوراني بصري مقدارها صفر.

يعتبر التشتت أعلى الخط الأفقى (+) وأسفل الخط الأفقى (-) وكلما زاد البعد عن الخط الأفقى كلما زاد التشتت. تمثل الأرقام على الخط الأفقى رقم الموجة حيث أن ٤٠ تكون في منطقة الأشعة فوق بنفسجية عند طول موجة ٢٥٠ نانومتر ورقم الموجة ٣٠ تقع في نهاية الضوء الأزرق للطيف الضوئي عند طول موجة ٣٣٣ نانومتر. يعتبر رقم الموجة ٤٣,٦ هو الأمثل لقياس تركيز ABA وهو عند طول موجة ٢٨٩ نانومتر. تحتوي العينة المستعملة على ٦,٤ ميكروجرام ABA+ لكل مل في محلول ميثانول حامضى.

العلاقة بين تركيب ABA ونشاطه :

وجد أن أى تغيير بسيط فى تركيب جزيئ ABA يقلل من كفاءته وعادة يمنع نشاطه نهائيا. وتعتبر من الأجزاء الهامة لنشاط الجزيئ مجموعة الكربوكسيل و tertiaryhydroxyl مع 2-cis وأيضا الرابطة المزدوجة الموجودة فى الحلقة. يوجد ثلاث نواتج تحلل لمركب ABA وهى حامض الفاسيك و ABAGE و ABAGS وهى تتكون نتيجة لفقد أحد الثلاث مجاميع السابقة.زيادة قطبية المرتبطات تساعد على تجمعها فى الفجوات العصارية.

التركيزات المختلفة لـ ABA أثناء الحالات المختلفة للنبات Turnover :

تم قياس التركيزات المختلفة للمركبات المختلفة المشعة وهى و ABA (^{14}C) و (^{14}C)PA و (^{14}C)DPA فى أوراق الفاصوليا الفرنسية french bean أثناء إنتفاخ خلايا الورقة وأيضا أثناء الذبول.وجد أن تركيز endogenous ABA أى تركيز ABA الطبيعى فى النبات هو ٤٠ ميكروجرام / كجم ثم يزداد حتى يصل ٥٠٠ ميكروجرام/كجم فى أثناء الذبول. كما وجد أن نتيجة تغذية الورقة بـ (^{14}C)ABA نتج عنه تحلل تدريجى مستمر إلى حامض الفاسيك ثم dihydrophaseic acid ومع ذلك نظل النباتات ذابلة (شكل ١٥٩). وجد أن سرعة تخليق حامض الفاسيك أى هدم ABA هى ١٥٠ ميكروجرام لكل كيلوجرام لكل ساعة.

يمكن القول ومع وجود أدلة على ذلك أن تخليق وهدم ABA يكون سريع أثناء ذبول الأوراق.

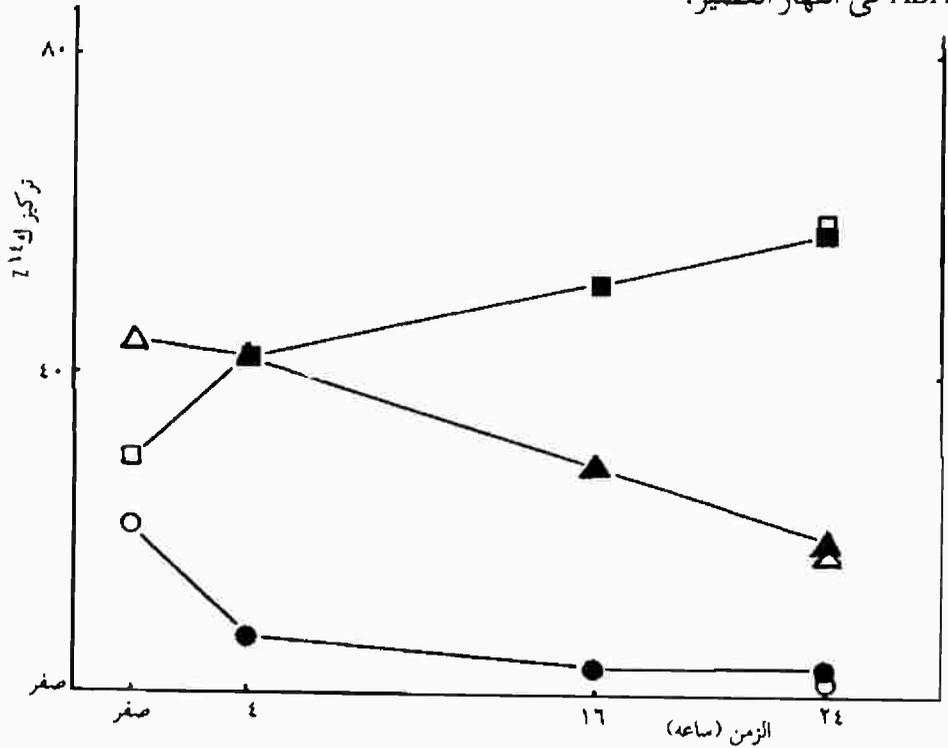
التأثيرات المختلفة لحامض ABA :

يوثر ABA تأثيرات عديده على النبات منها مايتى :

١ - سكون البراعم Bud Dormancy

يحدث سكون للبراعم فى النباتات متساقطة الأوراق وأيضا فى الأشجار الخشبية مثل و *Betula* و *Acer* و *Fraxinus* وذلك عند حلول فصل الخريف حيث يتوقف البرعم عن النمو وتصبح القمة النامية للبرعم وأيضا الجزء الخضرى من البرعم مغطاة بأوراق حرشفية وقد تبطن الأوراق الحرشفية من الداخل بشعيرات دقيقة

لتساعد على تدفئة البرعم وقد تتكون صمغ على الأوراق الحرشفية لأحكام غلقها كما تصبح السلاميات قصيرة. يتحكم في هذه النباتات طول الفترة الضوئية حيث أن النهار القصير يسبب سكون البراعم والعكس صحيح حيث أن النهار الطويل يسبب نمو البراعم ولذلك تحدث هذه التغيرات سنويا في الأشجار في الخريف والربيع. تعتبر الأوراق المكتملة النمو هي المستقبلة لتأثير النهار القصير أى أنها تشعر بالنهار القصير وتتجاوب معه. ومن الثابت الآن أن الأوراق المكتملة النمو هي مكان أساسى لتخليق ABA في النهار القصير.



(شكل ١٥٩) turnover حامض الأبسيسيك المعلم (المشع) $(2-C^{14})$ ABA في أوراق الفاصوليا الذابلة. تم معاملة عينات من الأوراق نضرة أو ذابلة بواسطة ABA معلم لمدة ستة ساعات. يتم تحليل ABA بسرعة بينما كمية الكربون المشع ^{14}C في DPA تزداد أثناء نقص تركيز PA. ABA في الأوراق النضرة (دائرة بيضاء) وفي الأوراق الذابلة (دائرة سوداء). PA في الأوراق النضرة (مثلث أبيض) وفي الأوراق الذابلة (مربع أسود). DPA في الأوراق النضرة (مربع أبيض) وفي الأوراق الذابلة (مربع أسود).

ثم ينتقل ABA في اللحاء أو الخشب حتى يصل إلى البرعم الطرفي ويسبب السكون.

تحتاج البراعم في هذه الحالة إلى فترة من درجة الحرارة المنخفضة لكي تنمو ويحدث ذلك في فصل الشتاء ولذلك تنمو البراعم في الربيع نتيجة لوجود نهار طويل وأيضاً نتيجة لتعرضها في فترة سابقة إلى درجة حرارة منخفضة.

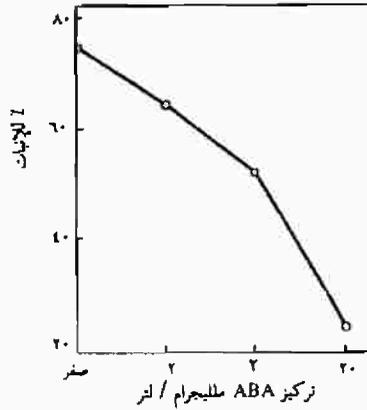
عند زراعة نبات عدس الماء *Lemna* في بيئة مائية صناعية مضاف إليها حامض ABA فإن نمو النبات يتوقف وتتكون تراكيب معينة تسمى turions وهو تعتبر براعم ساكنة.

يعتقد أيضاً أن ABA له دور في سكون براعم درنات البطاطس.

حديثاً يوجد شك كبير في أهمية ABA في أحداث سكون البراعم وقد يكون له دور في ذلك ولكنه قد لا يكون العامل الرئيسي في ذلك.

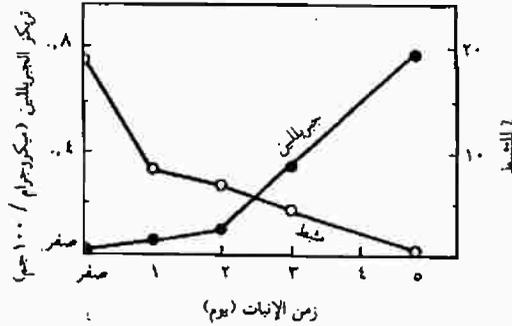
٢ - كمون البذور Seed Dormancy

يثبط ABA إنبات بذور كثيرة من النباتات مثل بذور الخس للصف Great Lakes (شكل ١٦٠). تحتوي البذور الكامنة على ABA وأيضاً جدر الثمار. تظل بذور التفاح ساكنة حتى تتعرض لدرجة حرارة منخفضة أو لعملية كمر بارد stratification. تحتوي هذه البذور الكامنة على ABA. وفي أثناء درجة الحرارة المنخفضة أو الكمر البارد ينخفض تركيز ABA ويزداد تركيز الجبريللين. أيضاً أثناء عملية الكمر البارد ينخفض تركيز ABA في بذور الورد والخوخ و *Fraxinus*. يمكن أيضاً منع بذور التفاح من الأنبات بعد عملية الكمر البارد وذلك بمعاملتها ب-ABA. يمكن أيضاً مساعدة بذور التفاح على الأنبات بدون الكمر البارد عند معاملتها بالجبريللين.



(شكل ١٦٠) : تأثير ABA على إنبات بذور الخس صنف Grand Rapids و Great Lakes

ومن ذلك يتضح أن سكون البراعم وكمون البذور يحدث نتيجة لزيادة ABA وقلة الجبريللين وعند الأنبات يكون العكس صحيح أى أن ABA والجبريللين لهما دور عكسى فى ذلك. وذلك على الأقل فى بعض النباتات (شكل ١٦١).



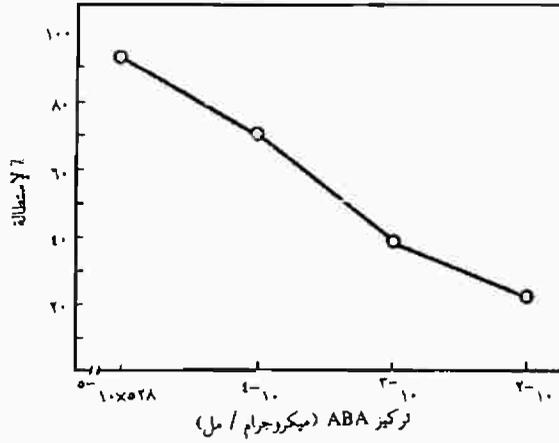
(شكل ١٦١) : تأثير تركيز الجبريللين و ABA على إنبات البذور (بذور نبات birch).

حديثا يوجد شك فى أهمية ABA فى عمل كمون للبذور وقد لا يمكن تعميم تأثيره على جميع البذور.

٣ - نمو الساق Stem Growth

تسبب المعاملة بـ ABA تثبيط نمو الساق وأيضا غمد الريشة والسويقة الجنينية السفلى hypocotyl. وبعد فترة وبعد زوال تأثير ABA فإنه يحدث نمو لهذه الأجزاء.

وفي النباتات الحولية لا تحدث عملية سكون للبراعم ولكن يسبب ABA تثبيط نمو الساق (شكل ١٦٢).



(شكل ١٦٢): تأثير ABA على نمو أجزاء من غمد الريشة لنبات القمح.

٤ - نمو الجذور Root Growth

تسبب المعاملة بـ ABA تثبيط نمو الجذور. يحدث أيضاً تثبيط في نمو الجذور عند تعريضها للضوء.

ثبت أن تأثير الضوء على تثبيط نمو الجذور نتيجة لزيادة تركيز ABA في جذور البسلة طبيعياً أى endogenous ABA.

٥ - الأزهار Flowering

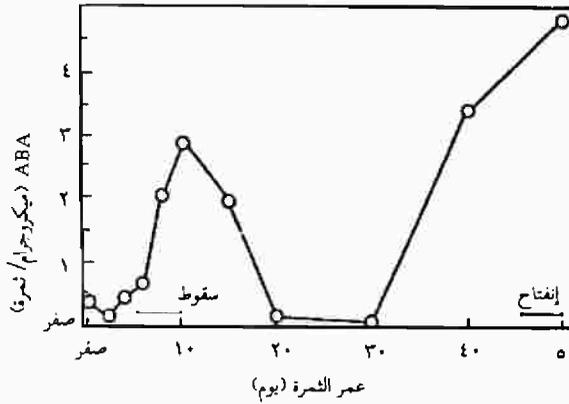
تسبب المعاملة بـ ABA أزهار نباتات الشليك و blackberry في النهار الطويل بالرغم من أن هذه النباتات لا تزهر في النهار الطويل بل تزهر في النهار القصير فقط. والعكس صحيح حيث أن المعاملة بـ ABA تمنع أزهار نبات النهار الطويل في بعض الحالات مثل السبانخ و *Lolium*. وغير معروف ميكانيكية ذلك.

٦- تكوين الثمار والبذور Fruit and Seed Development

توجد كثير من التجارب والبيانات في هذا الموضوع إلا أنها قد تكون متضاربة أو لا يمكن تعميمها . ولذلك فإنه يمكن القول بأن ABA ليس له دور واضح محدد في ذلك وأن كل نبات له حالة خاصة .

٧- سقوط الأوراق Abscission

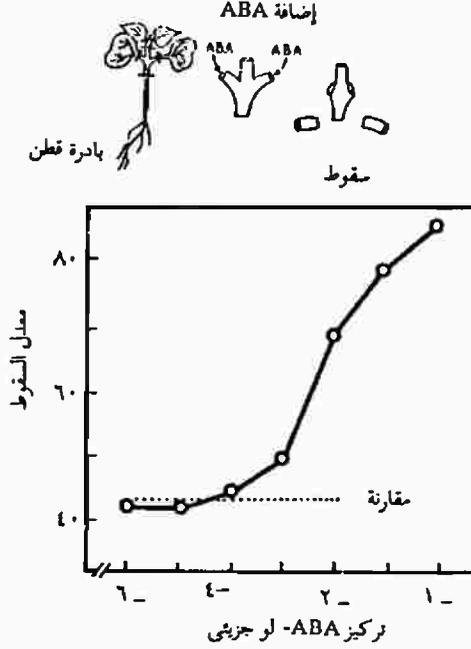
في حالة نبات القطن يزداد تركيز ABA إلى الضعف أثناء نمو وتكوين اللوز . يوجد فترتين يزداد فيهما تركيز ABA أثناء نمو ونضج الثمرة . تحدث الفترة الأولى أثناء سقوط الثمار الصغيرة السن immature fruit shedding وتحدث الفترة الثانية أثناء تفتح اللوز (شكل ١٦٣) .



(شكل ١٦٣) تركيز ABA أثناء نمو لوز القطن .

تسبب المعاملة بـ ABA سقوط أعناق أوراق بادرات القطن (شكل ١٦٤) وأيضاً الفاصوليا و Coleus وغيرها. يلاحظ أن المعاملة على أعناق الأوراق المنزوع نصلها deblated petiole stumps وليست على الأوراق العادية. وجد أن تركيز ١٠-٤ جزيئي من ABA كافية لسقوط أعناق الأوراق الفلقية في بادرة القطن وأنه بزيادة التركيز يزداد سقوط الأعناق (شكل ١٦٤) . ووجد أن هذه المعاملة أو حتى تكرارها

لعدة مرات على أوراق بادرة أو نبات القطن العادية لا تسبب سقوطها وتعليل ذلك غير معروف. تأثير هذا الهرمون على سقوط الأوراق من النبات السليم ضعيف ويرجع الأساس في سقوط الأوراق إلى الإيثيلين والأوكسين.



(شكل ١٦٤) تأثير ABA على سقوط الأوراق الفلقية لبادرة القطن (أعلى)

– تأثير تركيز ABA على سقوط الأوراق الفلقية لبادرة القطن (أسفل)

٨ - الشيخوخة Senescence

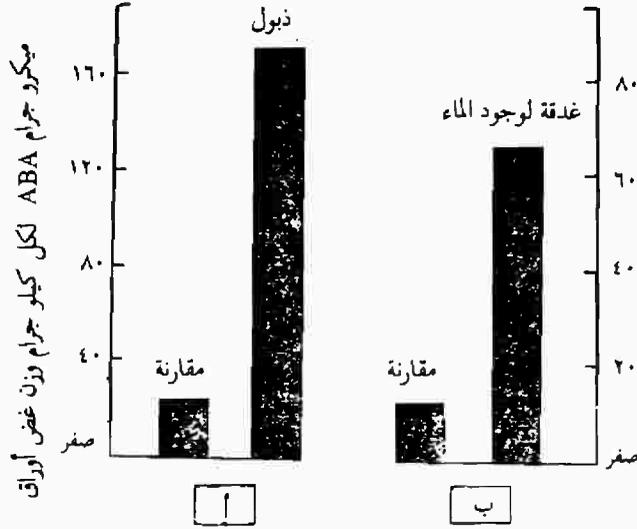
وجد أن تعويم أوراق نبات أبو خنجر على الماء يسبب الشيخوخة لهذه الأوراق ومن مظاهر الشيخوخة فقد في الكلوروفيل وانخفاض تركيز البروتين و RNA. وجد أن تعويم أوراق هذا النبات على محلول مائي يحتوي ABA فإن هذه المعاملة تسرع من أعراض الشيخوخة. يكون النقص في تركيز البروتين في هذه الحالة راجع

إلى إنخفاض معدل تخليق البروتين عنه عن هدم البروتين protein degradation

٩ - الظروف البيئية القاسية Environmental Stress وتركيز ABA

عند تعريض البادرة لظروف جفاف الماء أو بغمر الجذور في محلول carbowax فإن الأوراق تبدأ في الذبول. وبعد دقائق معدودة يزداد تركيز ABA في الأوراق الذابلة كما توجد علاقة تناسب طردية بين تركيز ABA ودرجة الذبول. ونتيجة لذلك يزداد تخليق ABA ولا تكون الزيادة في التركيز نتيجة لتحرير ABA من الجلوكوز أى من صور ABA المقيدة والمرتبطة أى أن زيادة التركيز نتيجة لتخليق جزيئات جديدة وليست لتحرير ABA من glucoside. وقد أمكن إثبات ذلك في تجارب كثيرة باستعمال mevalonic مشع به ك^{١٤} حيث ظهر الإشعاع في ABA.

أجريت هذه التجارب على بادرات قمح وقد حدث نفس التأثير في الطماطم والسبانخ وقصب السكر وخلافه (شكل ١٦٥).



(شكل ١٦٥) أ - تركيز ABA في أوراق بادرة القمح ذابلة في محلول carbowax.

ب - تأثير التربة الغدقة المحتوية على الماء لمدة خمسة أيام على تركيز ABA في نباتات فاصوليا قرمية.

يحدث نفس التأثير عند تعريض البادرات والنباتات لظروف قاسية حيث أن التربة غدقة waterlogging حيث يزداد تركيز ABA فى داخل النبات endogenous ABA ويحدث الذبول (شكل ١٦٥).

يحدث نفس التأثير عند تعريض البادرات والنباتات للملوحة زائدة salinity stress أو عواصف حيث يزداد تركيز ABA.

أيضا عند نقل النباتات من المشتل إلى الحقل أى شتلها فإنها تتوقف عن النمو فترة وتظهر درجة بسيطة من الذبول وفى هذه الأثناء يزداد تركيز ABA ثم يستعيد النبات نموه بعد فترة ويصبح عاد غير ذابل ولذلك يقل تركيز ABA.

زيادة تركيز ABA تسبب غلق الثغور ويحدث ذلك لصالح النبات حيث يقلل من النتح وبذلك تمنع فقد الماء من النبات وبالتالي فإن النبات يمكن أن يقاوم الظروف البيئية غير الملائمة.

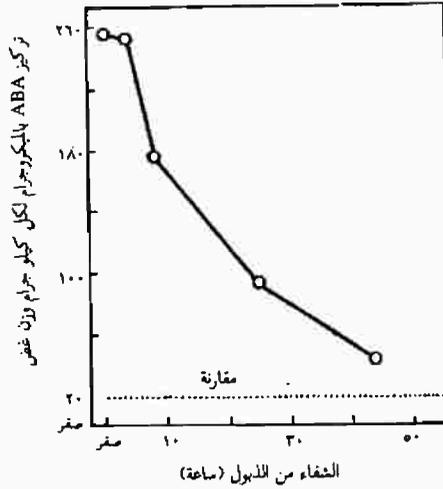
فى جميع الحالات السابقة يسبب الأعتدال فى الرى إن يصبح النبات عاد وغير ذابل وتصبح الخلايا turgid منتفخة ويقل فى هذه الأثناء تركيز ABA (شكل ١٦٦).

يحتاج فتح الثغور إلى فترة لكى تتخلص من التركيز الزائد لـ ABA .

١٠ - فتح وغلق الثغور Opening and Closing of Stomata

تسبب المعاملة بـ ABA غلق الثغور. أمكن إثبات ذلك فى سلخ أى نسيج البشرة من ورقة *Commelina communis* . زيادة تركيز ABA تسبب زيادة تدريجية فى غلق الثغور وخاصة فى التركيزات بين ١٠-٩ إلى ١٠-٤ جزيئى. أمكن إثبات ذلك أيضا على ثغور أوراق نبات *Xanthium* وذلك على الأوراق العادية وأيضا على نباتات أخرى.

وجد أن سم أحد الفطريات وهو fusicoccin يسبب فتح الثغور أى أن تأثيره عكسى لحامض ABA.



(شكل ١٦٦) : تأثير إعادة الري على نقص تركيز ABA في نموات نباتات brussel والتي كانت تعاني من الذبول.

وجدت طفرة في نبات الطماطم تسمى flacca حيث أن نباتات هذه الطفرة تعاني من ذبول مستمر ودائم حيث أنها غير قادرة على غلق الثغور وقد فسر ذلك هو نتيجة لنقص تركيز ABA. وقياس تركيز ABA في هذه النباتات الطفرة أتضح أن هذه النباتات تعاني من نقص في ABA. وبمعاملة هذه النباتات بهذا المركب أي ABA تم غلق الثغور. ومما هو جدير بالذكر أن تطعيم نباتات طماطم عادية على أصل من نبات طفرة flacca ينتج عنه نبات ذو ذبول مستمر ودائم.

١١ . ضغط الانتفاخ للخلايا Turgor pressur of cells

وجد أن زيادة ضغط الانتفاخ تقلل من وجود ABA والعكس صحيح فعند الذبول يزداد تركيز ABA. عند تعريض نبات القطن لظروف بيئية شبه جافة قليلة الماء فإن ضغط الانتفاخ يقل وينعدم ويحدث تجمع لـ ABA.

١٢ . مقاومة الضرر للنبات Resistance to injury

وجد أن معاملة النباتات العادية (الوسطية mesophytic plants) بـ ABA يسبب تحمل النباتات للجفاف أي مقاومة الجفاف. وجد أن السويقة الجنينية الوسطية

mesocotyl في الزمير يمكن أن تتحمل تركيزات عالية من إندول حامض الخليك. حيث وجد أن معاملة أجزاء أى قطع من السويقة الجينية الوسطى بتركيز من إندول حامض الخليك ٥٠ ملليجرام لكل لتر يسبب موتها. ولكن في وجود ABA بتركيز ٢ ملليجرام/ لتر تصبح هذه القطع سليمة عادية وحتى في تركيزات أعلى من إندول حامض الخليك تصل إلى مائة ملليجرام لكل لتر. وجد أن معاملة النبات الكامل في الأسفندان *Acer negundo* والتفاح والبرسيم الحجازى والخيار بهذا الهرمون تزيد من مقاومتهم لضرر البرد القارص chilling injury .

١٣ - التأثير علي التفاعلات السريعة والبطيئة Fast and Slow reactions

وجد أنه بعد تخليق racemic ABA حيث أنه يحتوي علي كميات متساوية من (+)، (-) وقد أمكن فصل هذين النوعين عن بعضهما. وجد أن كلا المشابهين لهما نفس التأثير والنشاط في اختبار الجنين embryo bioassay. تعتبر هذه النتيجة فريدة حيث أنه من المعتاد أن يكون أحد المشابهين فعال ونشط والآخر يكون ضعيف أو غير فعال. وجد أن المشابهين ينفذان إلي داخل الخلايا ويدخلان في خطوات التحول الغذائي. ولكن تختلف سرعة حدوث ذلك في كل مشابه. وجد أن ABA الطبيعي وهو المشابه (+) يسبب غلق الثغور بسرعة بعد عدة دقائق من المعاملة بينما المشابه غير الطبيعي (-) له تأثير ضعيف في ذلك. وجد أن كلا المشابهين يسببان تثبيط إنبات البذور وأيضاً تثبيط تخليق البروتين. لذلك فإن المشابه (+) له تأثير مثبط سريع وبطيء slow reaction and fast reaction بينما المشابه (-) له تأثير مثبط بطيء فقط .

١٤- تخليق وانتقال وتوزيع الهرمون داخل الخلية

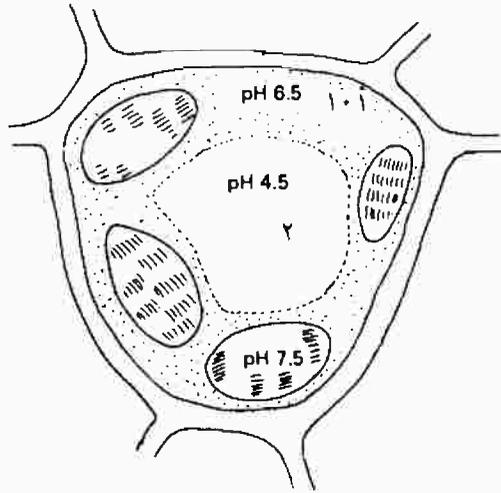
Intracellular compartmentation, synthesis, transportation and distribution

وجد Heilmann وزملاؤه عام ١٩٧٩ أن تخليق ABA لا يحدث في البلاستيدات الخضراء وهو العكس تماماً لما هو معروف. فأن تخليق ABA يحدث في سيتوبلازم الخلية ثم ينتقل إلي عضيات ومكونات الخلية المختلفة وكان ذلك في

خلايا أوراق نبات السبانخ. وجد أن تركيز ABA يكون عال في البلاستيدات الخضراء لأن رقم pH ستروما البلاستيدات الخضراء يكون أعلي من أي مكان آخر في الخلية وخاصة في وجود الضوء.

يحدث تجمع لـ ABA في صورته أيونية ionized form حيث أنه كلما قل رقم pH كلما قل تجمع وتركيز الهرمون. ففي السيتوبلازم يكون تركيزه أقل من البلاستيدات الخضراء حيث أن رقم pH في الأستروما ٧,٥ وفي السيتوبلازم ٦,٥ وفي الفجوة العصارية يكون تركيزه منخفض جداً لأن pH هو ٤,٥ (شكل ١٦٧). يعتبر ذلك التوزيع خاص بـ ABA الحر. وجد أن بعض جزيئات ABA توجد في صورة غير مرتبطة unconjugated ولكن في صورة مقيدة bound form (يوجد فرق كبير بين ABA المرتبط وبين ABA المقيد حيث أن المقيد يكون مرتبط بجزيء كبير بطريقة ما).

bound form =not conjugated but attached to a macromolecule in some way



(شكل ١٦٧): توزيع ABA في خلايا ميزوفيل الورقة. يعتبر ABA حامض ضعيف وتدل الأرقام على التركيز النسبي للحامض في كل جزء أو عضيه من الخلية.

وذلك فى داخل البلاستيدات الخضراء. حيث أن البلاستيدات الخضراء المعزولة من الأوراق الذابلة تحتوى على كمية قليلة جدا من المقيد بالمقارنة بالبلاستيدات الخضراء المعزولة من الأنسجة والأوراق النضرة. حيث وجد أن تركيز ABA المقيد فى البلاستيدات الخضراء للأوراق العادية ٩٥ ٪ بينما تركيزه فى الأوراق الذابلة ١٥ ٪.

١٥ - نفاذية الخلايا Cell permeability

وجد أن ABA يقلل نفاذية أعناق أوراق الخروع لأيون البوتاسيوم وأيضا يقلل من تجمع السكروز داخل الأنابيب الغربالية (اللحاء). يسبب ABA خفض نفاذية الخلايا فى بعض الحالات.

١٦ - التأثير على تخليق الأنزيمات ونشاطها

Effect on enzyme activity and synthesis

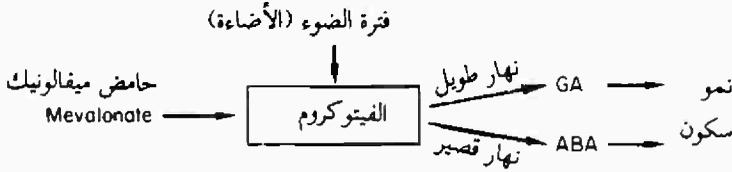
وجد أن ABA لا يؤثر على نشاط الأنزيمات بل يؤثر على تخليقها. ومن أفضل الأمثلة المدروسة فى ذلك تكوين أنزيم ألفا أميليز فى طبقة أليرون حبوب الشعير حيث وجد أن تشجيع تخليق هذا الأنزيم بواسطة إضافة الجبريللين وتثبيط تخليق هذا الأنزيم بإضافة ABA.

يعتقد أن تأثير ABA هو تأثير جزئى على الأقل فى منع أو إختلال أو ضعف عملية الترجمة translation فى تخليق البروتين. حيث وجد أن ABA يثبط تكوين بروتين أنزيم ألفا أميليز حتى ١٢ ساعة من المعاملة وفى هذه المدة يعتبر cordycepin (سم ينتج بواسطة فطر بازيدى ويمنع تخليق RNA) غير قادر على القيام بعملية التثبيط أى يفقد تأثيره. أى أن ABA له تأثير مانع لتخليق البروتين لمدة أطول بالمقارنة بـ cordycepin.

الفيتوكروم وحامض الأبسيسيك

عندما تعامل القمم النامية لنبات *Betula* أو نباتات خشبية أخرى فإنها تنتج أعراض تشابة حالات السكون على هذه القمم مثل تقصير طول السلامة وإنتاج أوراق

حرفية صغيرة بدلا من الأوراق الخضراء العادية كما أن الانقسام الغير مباشر للقمم النامية يقل بدرجة كبيرة جدا مع ملاحظة سقوط بعض الأوراق القريبة من القمم النامية كما أنها تسبب كمون البراعم وعدم نموها وقد وجد علاوة على ذلك أنها تسبب كمون البذور حيث أنه عند معاملة بذور قابلة للأنبات بهذا المركب فإنها لا تنبت إلا بعد غسل البذور جيدا أو معاملة بالجيريلين أو الكينتين لتساعد في إنباتها ومن ذلك يتضح أن حامض الجيريليك وحامض الأبسيسيك يمكن أن يشتق كل منهما من mevalonic acid وأيضا كل من المركبين له تأثير فسيولوجي مختلف عن الآخر ولكنهما يتكونا أيضا وإلى حد كبير من نفس metabolic pathway ولذلك يمكن للنبات أن يتحكم في إنتاج واحد دون الآخر عن طريق switching وحيث أن الجيريلينات تتكون في أيام ذات النهار الطويل وحامض الأبسيسيك يتكون في الأيام ذات النهار القصير. فمن المعتقد أن يكون التحكم عن طريق الفيتوكروم قفى النهار القصير يتأثر الفيتوكروم وينتج حامض الأبسيسيك وفي النهار الطويل يتأثر الفيتوكروم وينتج الجيريلينات (شكل ١٦٨).



(شكل ١٦٨): علاقة الفيتوكروم بطول وقصر النهار وتخليق الجيريلينات وحامض الأبسيسيك وحدوث النمو والسكون. يلاحظ أن كلا من الجيريلينات وحامض الأبسيسيك تشتق من حامض الميفالونيك.

وجد أيضا أن نقص العناصر الغذائية وقلة المياه للنبات كلها تسبب زيادة تركيز ABA وزيادة ABA تسبب قفل الثغور لتقليل النتح.

ميكانيكية فتح وغلق الثغور وحامض الأبسيسيك

يتكون ABA في ظروف من water stress أى في وجود قلة من الماء أو عدم توفر الماء. وقد وجد في حالة نقص الماء أن حامض الأبسيسيك يزداد تركيزه في

الأوراق وأن هذا الحامض يساعد على سرعة غلق الثغور عن طريق تحكمه في الخلايا الحارسة.

من المعروف أن أيون البوتاسيوم في الليل ينتقل من العصير الخلوي للخلايا الحارسة إلى خلايا البشرة المجاورة ولذلك يقل الضغط الأسموزي لهذه الخلايا فتترهل وتغلق الثغور أما في النهار فأن أيون البوتاسيوم ينتقل من الخلايا المجاورة للخلايا الحارسة إلى الخلايا الحارسة حيث ينتقل الماء إلى الخلايا الحارسة وتسبب فتح الثغر نتيجة لانتفاخ الخلايا الحارسة ونجد أن الخلايا المساعدة وغيرها من الخلايا المحيطة بالخلايا الحارسة في البشرة تعمل كمخزن حيث يخزن فيها أيون البوتاسيوم عندما تغلق الثغور.

وقد وجد أن حامض ABA يساعد أيون البوتاسيوم على ترك الخلايا الحارسة فتترهل ويغلق الثغر وبذلك يقل فقد الماء من النبات وبذلك يتحمل النبات فترات نقص الماء water stress. وعند وضع الماء للنبات فأن الخلايا الحارسة لا تفتح مباشرة بل تأخذ أولاً وقت معين قبل الانفتاح لكي ينخفض تركيز حامض ABA في الخلايا الحارسة ثم بعد ذلك ينتقل إلى الخلايا الحارسة أيون البوتاسيوم من الخلايا المجاورة وتمتص الخلايا الحارسة الماء وتفتح الثغور. أي أن ABA يعمل على خروج أي طرد أيون البوتاسيوم من الخلايا الحارسة.

طرق تقدير حامض الأبسيسيك

توجد طرق مختلفة لتقدير تركيز ABA ومنها طرق حيوية وطرق كيميائية.

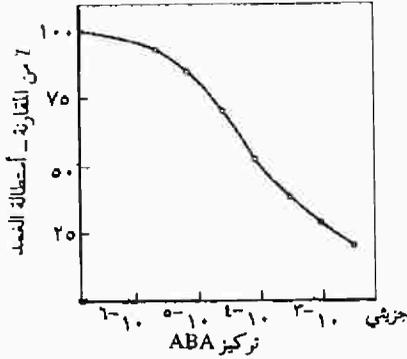
أولاً : طرق حيوية تستخدم فيها النباتات Bioassay

توجد طرق كثيرة منها ما يأتي :-

١ - تثبيط نمو غمد الريشة في نبات القمح :

عند معاملة غمد الريشة بتركيزات مختلفه من هذا الحامض فأن سرعة النمو تقل

بزيادة التركيز. كلما زاد تركيز ABA كلما قل نمو غمد الريشة كما في standard curve المنحني القياسى (شكل ١٦٩).



(شكل ١٦٩): العلاقة بين تركيز حامض ABA وأستطالة غمد الريشة للقمح.

٢ - انبات البذور:

في حالة المقارنة تكون نسبة الانبات كبيرة أما البذور المعاملة تقل نسبة الانبات. وكلما زاد تركيز الحامض كلما قلت نسبة الانبات. تستخدم في ذلك بذور الخس صنف Grand rapids (شكل ١٦٠).

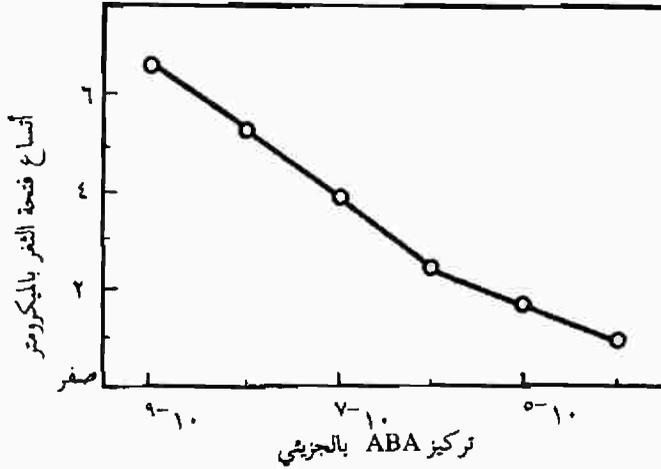
٣ - معاملة الذرة العادية:

عند معاملة نباتات الذرة العادية بهذا المركب فإنه يسبب تضاد لعمل مركبات الجبريللين في النبات ذو الطول العادى مما ينتج عنه قصر طول النبات. بإستعمال تركيزات مختلفة وحساب درجة النقص فى الطول ورسم منحنى قياسى. من هذا المنحنى يمكن استنتاج تركيز حامض ABA المجهول. كلما زاد تركيز ABA كلما أزداد قصر النبات.

٤ - طريقة غلق الثغور:

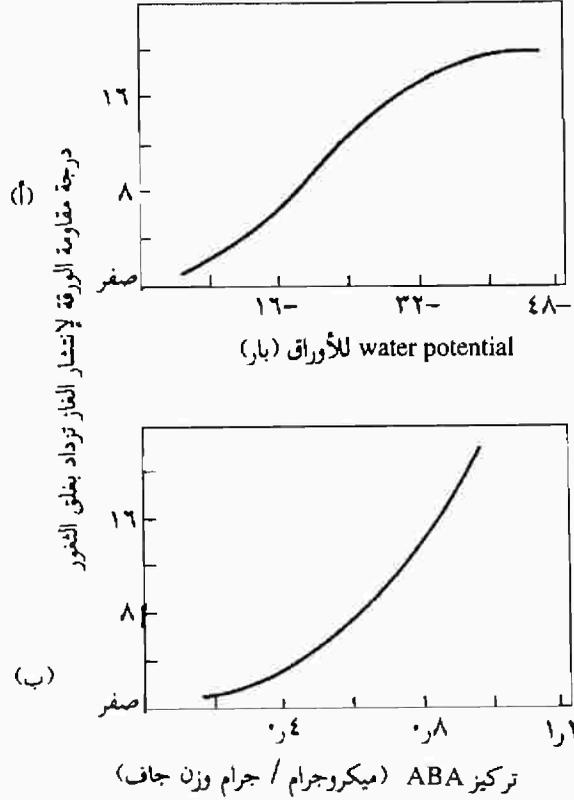
باستخدام أجزاء من أوراق نبات *Commelina communis* وتعويم هذه الاجزاء على محلول من ABA فى عدم وجود ك ٢أ أو تعامل أجزاء الورقة بقطرات من

حامض ABA في عدم وجود ك ٢١ فأن الثغور ستقفل بزيادة تركيز حامض الابسيسيك. مدة التجربة هي ٣ ساعات. بعد أنتهاء التجربة يمكن رسم منحنى يوضح العلاقة بين التركيز وفتحة الثغر. وتوضح درجة فتح الثغور على المحلول المصادى وتركيز ABA على المحور السيني (شكل ١٧٠).



(شكل ١٧٠) : تأثير تركيز ABA على إتساع فتحة الثغر في
بشرة أوراق *Commelina communis*

يمكن عمل ذلك أيضاً في حالة نبات *Heliathus decapetalus* حيث يمكن قياس سعة أو مساحة فتحة الثغر عن طريق إمرار تيار غاز. كلما زادت المقاومة لإنسياب الغاز خلال الثغور كان ذلك دليلاً على ضيق فتحة الثغر والعكس صحيح. يمكن رسم منحنى يوضح العلاقة بين تركيز ABA ودرجة مقاومة إنسياب الغاز (شكل ١٧١).



(نكل ١٧١) : العلاقة بين water potential للأوراق وإتساع فتحة الثغر وتركيز ABA في الأوراق في نبات عباد الشمس *Helianthus decapetalus*. تقاس فتحة الثغر بدرجة مقاومة الثغر لأنسياب الغاز خلاله وكلما زادت درجة المقاومة كان ذلك دليل على ضيق مساحة فتحة الثغر. أ - كلما زادت سالبية water potential في خلايا الأوراق كلما صفرت مساحة فتحة الثغر. ب - تتناسب درجة غلق الثغر مع تركيز ABA طردياً.

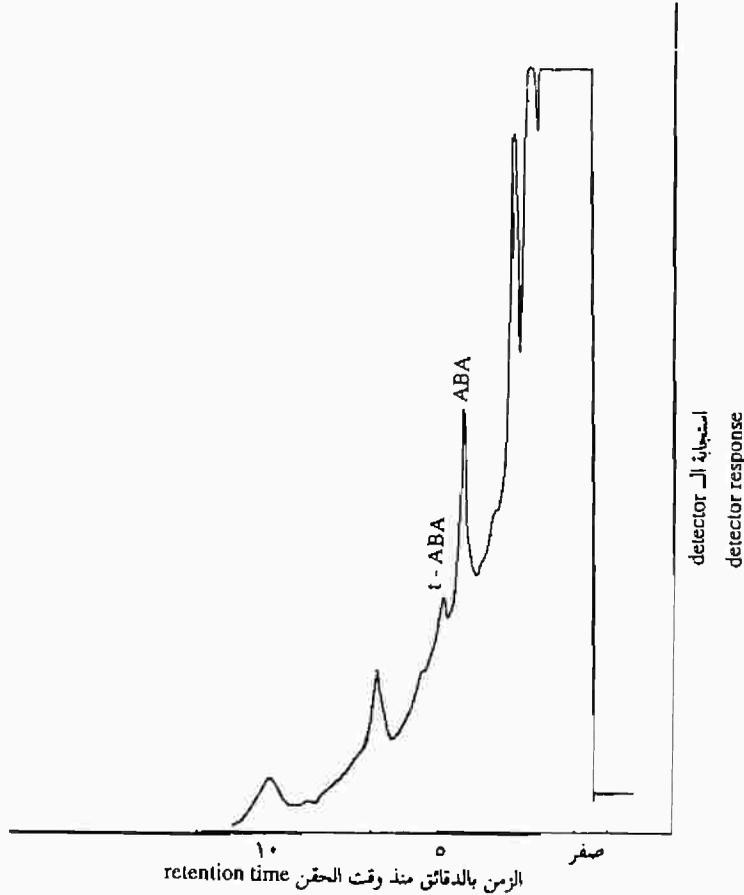
ثانياً : طرق كيمائية

يتم إستخلاص ABA بواسطة كحول الإيثيل أو الميثيل.

١ - طريقة Gas Chromatography

يتم حقن العينة في الجهاز ومن المنحنى الناتج من الجهاز يمكن الإستدلال على وجود الحامض أو عدم وجوده كما يمكن تقدير وحساب تركيزه في العينة.

لتقدير ABA بهذه الطريقة لابد من تحويله إلى مركب methyl ester of ABA ثم يحقن هذا المركب الأخير في الجهاز. تعتبر هذه الطريقة حساسة حيث يمكن أن تقيس تركيزات منخفضة جداً مائة femtogram fg ($10^{10} \times 1$ جرام). يفضل إستعمال EC (electron capture detector) (شكل ١٧٢) حيث أنه أكثر حساسية بدرجة كبيرة آلاف المرات (٦٠٠٠ مره) لقياس ABA بالمقارنة بـ flame ionization detector.



(شكل ١٧٢): كروماتوجرام يوضح وجود كميات ضئيلة من 2-trans-ABA في مستخلص من أوراق طماطم في الظلام. تم حقن ١ جرام مستخلص أوراق الطماطم في جهاز التحليل الكروماتوجرامى الغازى.

٢ - الطريقة (GLC) Gas Liquid Chromatography

تعتمد طريقة التحليل الكروماتوجرافي الغازي السائل gas liquid chromatography (GLC) على تحضير وتطاير مشتقات الحمض المختلفة مثل مشتقات ثلاثي الميثيل سيليل (ABA trimethyl silyl)، وتنقى العينة في العادة بالكربون النشط وتخلط بمواد مثل بس - تراى ميثيل سيليل أسيتاميد bis-trimethylsilyl acetamide لكي ينتج مشتق حمض الأبيسيك تراى ميثيل سيليل trimethylsilyl derivative of ABA وتقاس المشتقات المختلفة بعد ذلك بطريقة التحليل الكروماتوجرافي الغازي السائل (GLC) وتنسب إلى كمية معلومة من محلول الحمض المعامل بنفس الطريقة، وهذه الطريقة حساسة جداً ولها المقدرة على تقدير كمية من حمض الأبيسيك في حدود ٠.٣٠ ر. ميكروجرام من المواد المشابهة جداً للحامض - ويجب أخذ الحذر في تحضير مشتقات تراى ميثيل سيليل trimethyl silyl واستعمال أعمدة (GLC) ومعايرة calibration الجهاز.

٤ - طريقة Optical Rotary Dispersion Spectrum-ORD

طرق التحليل الطيف مقطابية Spectropolarimetric Analysis

يعتبر حامض الأبيسيك فريداً في تركيبه حيث أن ذرة الكربون الأولى الغير متناظرة في الحلقة (اليد المركزية a chiral center) تقدم لنا وسيلة للكشف عن الحمض باستخدام التشتت الدوراني الضوء بصري optical rotary dispersion (ORD) الخاصة بالحمض واستغلت هذه الخاصية لعمل التقديرات الكمية والنوعية لحمض الأبيسيك في مستخلصات على درجة معتدلة من النقاوة (شكل ١٥٨).

وتحسين طريقة (ORD) يستلزم استخدام كل من طريقة (ORD) أى التشتت الدوراني الضوئي وامتصاص الأشعة فوق البنفسجية بالحامض (ABA) وهذا مهم على وجه الخصوص في حالة تقدير كميات الحمض (ABA) بعد عمليات العزل الابتدائية والتنقية الجزئية وبعد التنقية النهائية. إلا أن هذه الطريقة لم تعد أكثر شيوعاً منذ أن حلت محلها طرق التحليل الكروماتوجرافي الغازي والسائل.

ملحوظة: تعتبر جميع الطرق الكيماوية أدق من الطرق الحيوية، ولكن من عيوب الطرق الكيماوية السابقة أنها تحتاج إلى تنقية أو حتى تنقية جزئية وفي أثناء خطوات التنقية يفقد جزء من الهرمون وبذلك يكون التقدير أقل من الواقع، ولذلك فقد تم عمل بعض المحاولات لتقليل أو تلافي الفقد وفيما يلي وصف لبعض هذه المحاولات.

يمكن إضافة المشابه 2-trans ABA إلى المستخلص النباتي وعند رصد جهاز GLC لقمة ميثيل أستر حامض الأبسيسيك Me ABA (Me ABA peak) فإنه يلي ذلك رصد الجهاز لقمة ميثيل أستر ترانس حامض الأبسيسيك Me trans ABA. peak ومن القمة الأخيرة للمركب الأخير يمكن حساب تركيز المركب الأخير وحيث أن تركيزه المضاف إلى المستخلص النباتي معروف فيمكن حساب كمية الفقد أثناء الاستخلاص. وبالمقارنة بذلك وبنفس النسبة يمكن تقدير الفقد في الأستخلاص لهورمون ABA، ومن عيوب هذا الطريقة أن 2trans-ABA يمكن أن يوجد طبيعياً في النبات كما أنه يمكن أن يتحول ABA الطبيعي في النبات في وجود الضوء إلى مخلوط بنسبة 1 : 1 من المشابه 2trans- ABA أي تكون النسبة واحد هورمون طبيعي إلى واحد 2trans-ABA ولذلك فإن أي تعريض لمحلول الهرمون للضوء يسبب إختلال النتائج وفقد صحتها ومصداقيتها. حديثاً يضاف إلى المستخلص إيثيل أستر حامض الأبسيسيك ethyl ester ABA بدلاً من ميثيل أستر وبذلك يستعمل كمحلول قياسي داخلي an internal standard. يتم أيضاً فصل إيثيل أستر الهرمون عن ميثيل أستر الهرمون بواسطة GLC. يمكن حساب نسبة الفقد في الهرمون أثناء الأستخلاص وهي نفس نسبة الفقد في إيثيل أستر الهرمون.

يمكن إستعمال طريقة ORD في ذلك الصدد بأستعمال إختبار تخفيف المخلوط الراسيمي racemate dilution method. يتم في هذه الطريقة أستخدام تركيز معين من racemic ABA غير نشط ضوئياً حيث يتم إضافته إلى مستخلص النبات. يتم

عمل تنقيه تامة تقريباً للمستخلص النباتي وقياس تركيز ABA الكلى فى العينة بواسطة درجة أمتصاص الأشعة فوق البنفسجية يمكن أن يكون ذلك بأجهزة مثل u.v.spectropolarimeter. وبعد ذلك يتم قياس ABA الطبيعى فقط وهو نشط ضوئياً بواسطة ORD.

ومن هذين القياسين يمكن حساب تركيز ABA الطبيعى فى المستخلص النباتي. لا تستعمل هذه الطريقة الآن إلا قليلاً حيث أنها تحتاج إلى كميات كبيرة من النبات لعملية الأستخلاص كما أنها تحتاج إلى عملية أستخلاص دقيقة كما أنها تحتاج إلى spectropolarimeter فائق الحساسية.

أمكن أيضاً أستخلاص ABA مشع فيه الأشعاع فى ذرة الكربون ك¹⁴ أو ذرة الإيدروجين H³ حيث يوضع فى المستخلص النباتي ABA مشع بتركيز معين وبعد تمام التنقيه يتم قياس تركيز ABA المشع وبذلك يمكن حساب درجة الفقد أثناء التنقيه وتكون هى نفس درجة الفقد فى ABA الطبيعى وبذلك يمكن حساب تركيز ABA فى مستخلص النبات أى النبات.

تعتبر طريقة قياس ABA بواسطة GLC فى صورة ميثيل ABA أدق من طريقة القياس بواسطة ABA المشع.

٥ . طريقة Gas Ghromatography-Mass spectrometry - GC / MS

يمكن فى هذه الحالة لجهاز GLC أن يفصل ويقيس تركيز ميثيل أستر ABA فى عينات نقية جزئياً صغيرة الحجم. يستخدم MS فى وجود ABA مشع فيه الأشعاع فى ذرة الإيدروجين (ديوتيريم) وبذلك يمكن حساب تركيز ABA فى المستخلص والنبات. تضاف كمية معلومة من ABA به إيدروجين مشع إلى المستخلص ثم يتم إدخال مجموعة ميثيل methylation لكل من ABA المشع وغير المشع يعطى مركب ABA 3-trideuteriomethyl قمة أكبر بدرجة ثلاث وحدات كتلة mass units بالمقارنة بقمة ABA غير المشع أى الطبيعى. تحسب النسبة بين نوعى الأيونين الأيون ومنها يمكن حساب تركيز ABA فى العينة والنبات أى endogenous ABA.

تسمى هذه الطريقة GC/MS-SIM حيث يستخدم فيها جزء إضافي عبارة عن (SIM)selected ion monitoring.

تعتبر هذه الطريقة من أفضل الطرق حيث أنها دقيقة وذات حساسية لدرجة كبيرة حيث أنها يمكن أن تقيس حتى تركيز 10^{-10} جرام.

ومن أحسن الوسائل التحليلية الشائعة لدراسة حمض الأبسيسيك ABA في مستخلصات النبات هي استعمال الطرق المشتركة بين التحليل الكروماتوجرافي الغازي وطريقة المطياف الكتلي Gas Chromatography-mass spectrometry (GC-MS). وأساس هذه الطريقة هو فصل مكونات العينة إلى ذروات كروماتوجرافية Chromatographic peaks والتي يمكن تقديرها والتحقق منها مباشرة من خلال أطياها الكتلية mass spectra والطيف الكتلي لمركب ما mass spectrum يعتمد على أن الجزيئات أو الأجزاء المشحونة fragments (أى ذوات الشحنة) تكون من الخصائص التشخيصية لتكوين المركب.

طرق تنقية ABA.

توجد طرق عديدة لتنقية ABA ولكن أفضل هذه الطرق هي عزل الهرمون بواسطة thin layer chromatography.

وأيضاً استخدم العلماء على درجة كبيرة من الأداء التحليل الكروماتوجرافي السائل وأجهزة الكشف بواسطة الأشعة فوق البنفسجية liquid chromatography and UV detectors باستمرار وتتقدم وذلك لتنقية والتحقق من وجود حمض الأبسيسيك والهرمونات النباتية الأخرى. وهكذا فإن عدد الطرق التحليلية وأجهزتها قد تقدم بدرجة ملحوظة منذ زمن العالم فينت Went ودراساته الرائدة في مجال الأوكسينات.

علاقة حامض الأبسيسيك بالبروتين و RNA

بعد كسر طور كمون البذور يحدث الأنبات، وفي فصل الربيع حيث يتوفر الماء ودرجة الحرارة المعتدلة والأكسجين يزداد نشاط التحول الغذائي. عند إضافة الماء إلى بذور كامنة جافة فإن تخليق البروتين يبدأ في الجنين في مدى ربع ساعة. يحدث أيضاً تخليق وتكوين mRNA لتكوين البروتين، ولكن في بعض البذور مثل القطن يتم تخليق بروتين جديد قبل تخليق mRNA جديد. حيث أن هذه البذور تحتوى على mRNA مختزن أو ساكن dormant mRNA حيث يتكون هذا mRNA أثناء تكوين جنين البذور ويختزن في الجنين أثناء فترات الجفاف أو البرودة أى في الشتاء ولذلك ينشط بسرعة كبيرة عند نقع البذور في الماء أى أثناء الأنبات. أى أن هذا mRNA لا يحتاج إلى تخليق لأنه مختزن ويحتاج فقط إلى تبليل البذور hydration. ثم ينشط هذا mRNA ليكون البروتين. ينتج من هذا mRNA المختزن بروتين أنزيمات protease و isocitratase في حالة بذور القطن. وبالطبع فإن هذه الأنزيمات تساعد في عملية الهدم وتحليل البروتينات. وجد في حالة القطن أنه أثناء فترات تكوين الجنين وفي المراحل الأولى والوسطية من نمو الجنين أى أن درجة نمو الجنين 60٪ يتم أستهلاك وأستعمال mRNA المتكون أما في المراحل الأخيرة من نمو الجنين فإن نسبة كبيرة من mRNA المتكون يتم تخزينها على هيئة mRNA ساكن ويبقى كذلك حتى مرحلة الأنبات حيث ينشط ويكون البروتين.

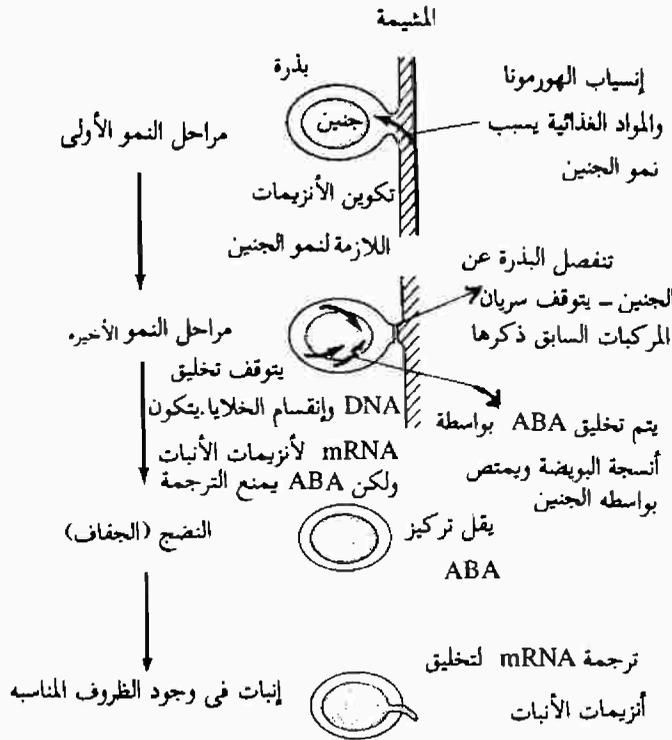
نتيجة لذلك قد يتطرق إلى الذهن سؤال هام هو كيف يحدث تغيير أثناء نمو جنين بذرة القطن في mRNA حيث يستهلك جميعه في المراحل الأولى من نمو الجنين وفي المراحل المتأخرة من نمو الجنين يختزن بعض منه. وماهو الذى يمنع mRNA من الإستهلاك والإستعمال المباشر ويصبح غير قابل للأختزان وغير قابل للإستعمال في المراحل الأخيرة من نمو الجنين. أحد المداخل لتفسير ذلك هو أن الماء يغسل ويزيل عملية التثبيط في ترجمة mRNA removes the inhibition of mRNA translation of the dormant m RNA.

ووجد أن المعاملة بـ ABA تسبب تثبيط عملية الترجمة من جديد ويصبح mRNA ساكن. تحتوي البذور الناضجة للقطن على ABA وبالتالي يسبب تثبيط عملية الترجمة على mRNA وبالتالي يثبط تكوين الأنزيمات وبالتالي يؤخر الإنبات. ومما يدعم ذلك الرأى أنه فى حالة جنين القطن لايتكون ABA إلا بعد المراحل الأولى والوسطية من نمو الجنين أى حوالى ٦٠٪ من نمو الجنين أى ٦٠٪ من حجمه النهائى. يتكون هذا المركب فى أنسجة البويضة المحتوية على الجنين ثم ينتقل من أنسجة البويضة إلى الجنين فى التوقيت السابق ذكره.

أى أن البويضة لاتكون ABA إلا بعد أن يصل الجنين الموجود بداخلها إلى ٦٠٪ من حجمه. وفى هذا التوقيت أيضاً يحدث كسر أو فصل أو عدم إتصال بين الأنسجة الوعائية التى تغذى البويضة وبين الأنسجة الوعائية المغذية للثمرة. وقبل هذا التوقيت أى قبل إنفصال الأنسجة الوعائية فإنه يوجد مركب ينساب من النبات إلى البويضة بسبب إنقسام الخلايا فى البويضة وينشط عملية نسخ mRNA من DNA ويعتقد أن هذا المركب هو السيستوكينين. بعد إنفصال الأنسجة الوعائية للبويضة عن الثمرة يتوقف إنسياب المركب الأخير ويتوقف إنقسام الخلايا كما يتوقف تخليق DNA نسبياً وينشط تكوين ABA ويتم نسخ mRNA من DNA ولكن تتوقف عملية الترجمة أى ترجمة mRNA إلى بروتينات ومنها الأنزيمات. يتوقف تخليق ABA ويقل تركيزه تدريجياً أثناء نضج بذور القطن وقد يكون ذلك نتيجة للغسيل بماء الأمطار أو بواسطة التحلل عن طريق الأنزيمات. ولذلك تصبح البذور بعد فترة خالية من ABA وبها mRNA مختزن ساكن وتشرب بذرة القطن للماء بسبب نشاط mRNA الساكن وتتم عملية الترجمة لتخليق البروتين ومنه الأنزيمات لتحداث أول خطوة فى عملية الإنبات على مستوى البيولوجيا الجزيئية molecular biology (شكل ١٧٣).

ولذلك يتضح أن ميكانيكية عمل ABA فى هذه الحالة هو تثبيط عملية تخليق البروتين وأيضاً تثبيط mRNA حيث تتوقف عملية الترجمة.

عادة يزداد تركيز ABA في الأوراق الهرمه senescing leaves. ولكن محاولات زيادة تركيز ABA في النبات وموته قد باءت جميعها بالفشل. ولذلك فإن ABA لايسبب موت النبات. ولا زلنا ننتظر الكثير لتفسير كيفية موت النباتات الحولية أو ذات الحولين خاصة على مستوى البيولوجيا الجزيئية.



(شكل ١٧٣): التغيرات في ميكانيكية تخليق الهرمونات والبروتين أثناء نمو وبلوغ ونضج وإنبات

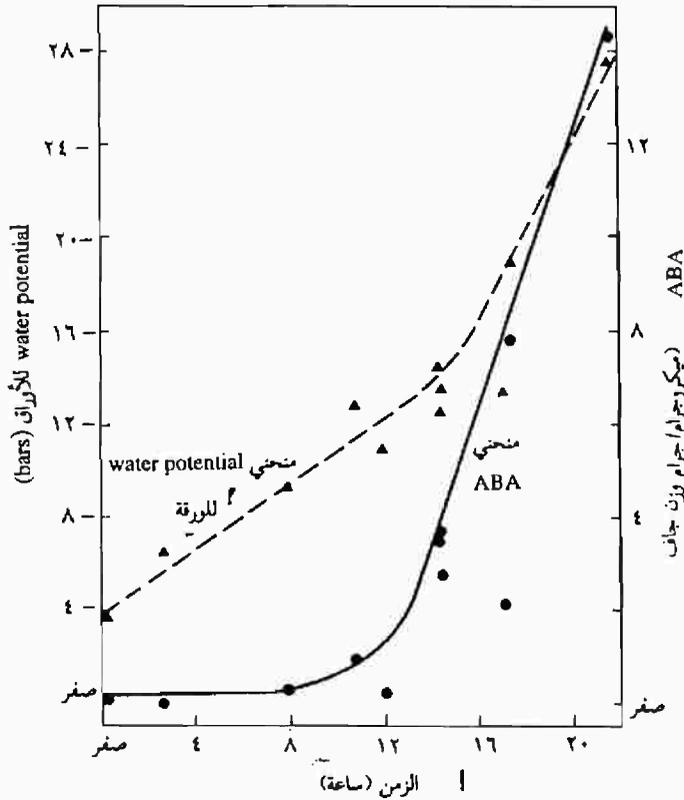
جنين بذرة القطن.

حامض الأبسيسيك وفقد الماء

يمكن وصف حامض الأبسيسيك بأنه stress hormone . يتكون هذا الهرمون نتيجة لأي ظروف غير طبيعية غير ملائمة للنبات ونتيجة لتكون هذا الهرمون فإن النبات يصبح قادر علي مقاومة أي ضغط stress نتيجة للظروف البيئية الغير طبيعية. ومن أفضل الامثلة لذلك هو الأستجابة السريعة للنبات لضغط نقص الماء . water stress

يزداد تركيز حامض الأبسيسيك بسرعة نتيجة لنقص الماء في الخلايا الحارسة . يسبب هذا الهرمون غلق الثغور بسرعة كبيرة في هذه الحالة وذلك بالمقارنة عند غلق الثغور نتيجة للنقص الكلي للماء في النبات. يحدث هذا التأثير نتيجة للتأثير علي حركة أيون البوتاسيوم من وإلى الخلايا الحارسة للنبات. حيث من المعروف أن هذا الهرمون يسبب سرعة طرد أيون البوتاسيوم من الخلايا الحارسة ونتيجة لذلك تغلق الثغور. نتيجة لغلق الثغور يقل فقد الماء من النبات وبالتالي فإنه بذلك يمكن أن يقاوم الجفاف. يمكن أن تسبب أنواع أخرى من الضغوط علي النبات نفس التأثير ومثال ذلك إنخفاض درجة الحرارة حيث يسبب تخليق هذا الهرمون غلق الثغور. وفي حالة إضافة الماء للنبات فإن الثغور لا تفتح مباشرة بل محتاج إلي وقت طويل نسبيا لكي تفتح حيث لا بد أن يقل تركيز هذا الهرمون في الخلايا الحارسة. ولذلك فإن الوقت اللازم لفتح الثغور هو عبارة عن الزمن لخفض تركيز الهرمون في الثغور. نتيجة لذلك فإن أيون البوتاسيوم ينتقل إلي الخلايا الحارسة وحيث يزداد تركيزه وتمتص الخلايا الحارسة الماء وتنتفخ فتفتح الثغور ومثال ذلك نبات *Ambrosia trifida* (شكل ١٧٤) .

أما عن التأثيرات الأخرى لهذا الهرمون علي النبات فهي لا تتبع نظام معين عدا بعض الحالات. ومن هذه الحالات أن صنف من الفاصوليا من أنواع معينة من الفاصوليا bush beans يزهر في النهار القصير ولكن تسقط براعمه الزهرية في النهار الطويل. يعتقد أن السبب في ذلك أن النهار الطويل يسبب تكوين تركيز عال من هذا الهرمون ينتج عنه تكوين طبقة إنفصال أسفل البرعم وبذلك يسهل سقوطه .



(شكل ١٧٤) : التغير في water potential لخلايا الورقة وفي تركيز ABA في أوراق *Ambrosia trifida* عندما يفقد النبات ماء في الجو الجاف. يلاحظ عدم زيادة تركيز ABA إلا بعد زيادة water potential إلى حد معين كبير نسبياً.

ميكانيكية عمل حامض الأبسيسيك

يعتبر غلق الثغور أحد الوظائف الرئيسية لهذا الهرمون. يعتبر تأثير هذا الهرمون على غلق الثغور تأثير سريع بينما تأثير هذا الهرمون على سكون النبات يعتبر تأثير بطيء يحتاج إلى تغيير في خطوات التحول الغذائي. يؤثر هذا الهرمون على عمليات عديدة ولكل منها ميكانيكية معينة ومن أمثلة ذلك أن غلق الثغور نتيجة لطرد أيون البوتاسيوم خارج الخلايا الحارسة أما عن السكون الذي يطرأ على النبات نتيجة لعمل هذا الهرمون فإنه يكون نتيجة لمنع تخليق RNA والبروتينات.

وجد أن معاملة السيقان وأغصان الريشة بهذا الهرمون تسبب نقص سريع في سرعة نمو هذه الأجزاء وأما عن ميكانيكية تأثير الهرمون في حدوث ذلك فإنها غير معروفة. وجد أيضا أن هذا الهرمون يزيد من شيخوخة أوراق النبات ولكن لا يؤثر على موت النبات، حيث باءت جميع المحاولات والتجارب بالفشل وحيث أتضح أنه لا يوجد علاقة بين موت النبات الكامل whole plant وهذا الهرمون.

ولذلك فإنه لازال أماننا الكثير لكي نتعرف على كيفية وميكانيكية تحكم هذا الهرمون في العمليات الحيوية للنبات.

مركبات شبيهة بحامض الأبسيسيك

توجد مركبات شبيهة بحامض الأبسيسيك في بعض النباتات وكل مركب أو مجموعة من المركبات خاصة بنبات معين أو مجموعة من النباتات وفيما يلي أمثلة لذلك:

١ - حامض ليونولاريك Lunularic acid :

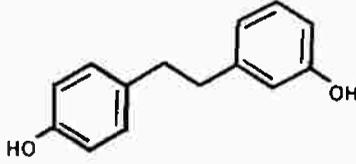
سبق الحديث عنه (شكل ١٤٨)، يمكن نزع ك أم ليتحول حامض ليونولاريك بواسطة النبات الحزازي المنبسط *Lunularia cruciata* إلى lunularin (شكل ١٧٥).

٢ - مركبات Batatasins :

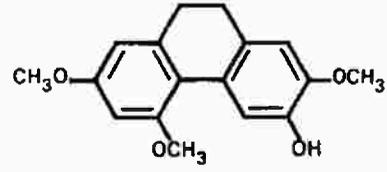
وهي مركبات أهمها Batatasin I و Batatasin III وقد وجد أن Batatasin I يسبب سكون البلبابل bulbils في نبات *yam plant* (*Dioscorea batatus*) حيث يزداد تركيزه داخل البلبابل حتى يصبح أكبر ما يمكن عند تمام النضج. وقد وجد أن البلبابل لا ينمو مباشرة بعد تمام النضج بل يحتاج إلى فترة ما بعد النضج afterripening (stratification) وفي أثناء هذه الفترة يقل تركيز batatasin I.

وجد أن batatasin I تركيبه hydroxy, trimethoxyphenanthrene بينما batatasin III عبارة عن تركيب مقارب bibenzyl analogue (شكل ١٧٥).

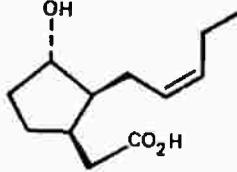
Lunularin



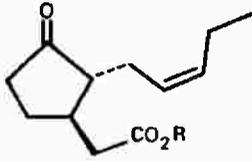
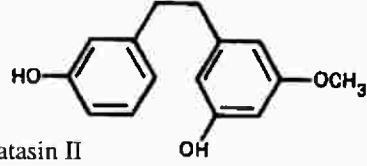
batatasin I



cucurbitic acid

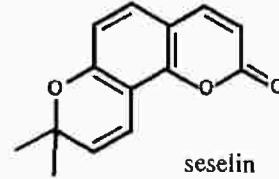


batatasin II

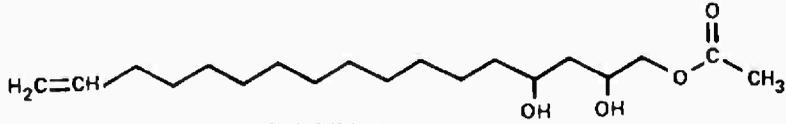


R = CH₃ (24) methyl ester of jasmonic acid

R = H (25) jasmonic acid (JA)



seselin



avocado inhibitor

(شكل ١٧٥) : التركيب الجزيئي لبعض المثبطات الطبيعية في النباتات المختلفة.

٣ - حامض الجاسمونيك Jasmonic acid :

يستخلص كل من methyl ester of jasmonic acid (Me JA) وأيضاً حامض الجاسمونيك (JA) من أوراق wormwood (*Artemisia absinthium*).

وجد أن Me JA يسبب حدوث الشيخوخة في الأختبارات الحيوية bioassay بإستعمال أجزاء من ورقة الزمير oat leaf segment. وجد أن MeJA يسبب سرعة فقد الكلوروفيل كما أنه وجد أن تأثير الكينيتين عكس تأثير المركب MeJA في هذه

الحالة كما أنه يصاد تأثيره. أمكن عزل MeJA وحامض الجاسمونيك ومركبات مشابهة لها من زيت نبات الياسمين (شكل ١٧٥) كما أنها تنتشر في بعض نباتات أخرى.

وجد أن MeJA أكثر نشاطا من ABA في تحليل أى هدم الكلوروفيل حيث يكون تركيزه حوالي ٥٠ ر. ملليجرام لكل لتر. وجد أن المركب الطبيعي من MeJA نشط ضوئيا ويكون نوع المشابه (-) بينما التركيبي synthetic MeGA يكون racemic أى خليط من + و - بنسبة متساوية . وجد أن درجة نشاط المركب التركيبي تتراوح بين ٠,٢ إلى ٢/١ درجة كفاءة المركب الطبيعي. يعنى ذلك أن المشابه (+) يتداخل ويقلل من كفاءة المشابه الطبيعي (-). يعتبر Me JA متطاير بدرجة منخفضة أى أنه قليل التطاير.

وجد أن JA أى حامض الجاسمونك يثبط إستطالة غمد الورقة الثانية لنبات الأرز وبنفس الدرجة التى يحدثها ABA. وجد أيضا أن JA يثبط إنبات حبة لقاح نبات الكاميليا. يعتبر JA قريب فى تركيبه من حامض القرعيك cucurbitic acid (شكل ١٧٥). وأيضا جلو كوسيد حامض القرعيك 5-0-glucoside cucurbitic acid وأيضا أستر ميثيل جلو كوسيد حامض القرعيك 5-0-glucoside methyl ester. أمكن عزل حامض القرعيك من Cucurbita pepo pumpkin). وجد أيضا أن المركب الأخير هو الأكثر كفاءة فى تثبيط إستطالة غمد الورقة الثانية فى الأرز.

حتى الآن يحتاج الأمر إلى تجارب كثيرة ليوضح هل المركبات السابقة هورمونات نباتية phytohormones أو أنها سموم. حيث أن تركيز MeJA المحلل للكلوروفيل وهو حوالي ٥٠,٥٠ ملليجرام لكل لتر يعتبر تركيز قليل وفى حدود تركيزات الهورمون. أما فى حالة JA فإنه يستخلص بتركيز ٤,٤ ملليجرام من كل ٩,٨ كجم من النبات أى حوالي ٥,٥ ملليجرام لكل كيلو جرام. يعتبر هذا التركيز أعلى من تركيز الهورمون.

٤ - مثبط الأفوكادو Avocado inhibitor :

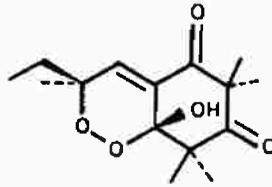
وجد مركب مثبط فى ثمار الأفوكادو يسبب تثبيط إستطالة غمد الريشة للقمح وتثبيط نمو كالس فول الصويا. وجد أن تركيزه يزداد فى الجنين والجدار الثمرى الأوسط mesocarp أثناء إنخفاض درجة نمو الثمار. لم يوجد هذا المثبط فى أى نوع آخر من الثمار (شكل ١٧٥).

٥ - مثبطات الكافور Eucalyptus inhibitiors :

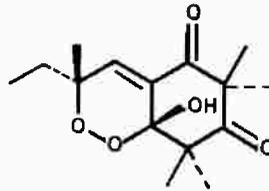
وجد أن مستخلصات أوراق وقلف الكافور *Eucalyptus grandis* تحتوى على مجموعة متشابهة من المركبات التى تثبط نمو الكافور وعلى وجة الخصوص تمنع عملية التجذير فى العقل (تسمى هذه المركبات المثبطات G أى Ginhibitors) فى النوعين *E. grandis* و *E. glupta* وأيضا الفاصوليا (*Phaseolus mung beans* (mungo) حيث وجد أن العقل من الأنسجة الغير ناضجة juvenile tissues لنوع الكافور *E. grandis* تكون جذور بسهولة وبسرعة بينما العقل الناضجة لنفس النبات لا تكون جذور حيث أن الأخيرة تحتوى على تركيز عال من هذه المركبات المثبطة. وجد أن الأوراق الصغيرة السن لهذا النوع من الكافور تتأثر بسرعة بظروف الجفاف ويظهر عليها الذبول بينما لا تتأثر الأوراق البالغة وقد علل ذلك أن تركيز المثبطات G فى الأوراق البالغة يكون مرتفع وبذلك تقاوم الجفاف والذبول والعكس صحيح فى الأوراق الصغيرة السن. ومما يدعم ذلك أيضا أنه لم يمكن العثور على أى آثار من ABA فى هذه الأوراق ومع ذلك لا يفضل القول أن هذه المثبطات تحل محل ABA فى هذه الحالات.

تتكون المثبطات من ثلاثة مركبات وهى G1 و G2 و G3 إثنان منهما متشابهان epimers at one position والثالث ينقصه مجموعة ميثيلين فى نفس المكان (شكل ١٧٦). تعتبر وظيفة هذه المثبطات غامضة وغير معروفة حتى الآن. وهى غير قابلة للإنتقال وتتأثر تركيزاتها بدرجة بسيطة نتيجة للتغير فى الظروف البيئية. وجد أن مخلوط من هذه الثلاثة مركبات له تأثير بسيط.

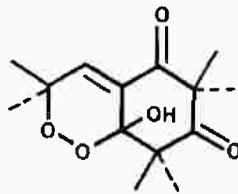
Eucalyptus inhibitors



G1



G2



G3

(شكل ١٧٦) : التركيب الجزيئي لمركبات المثبطات G أى Ginhibitors فى الكافور.