الباب السابع

حامض الأبسيسيك

ABSCISIC ACID

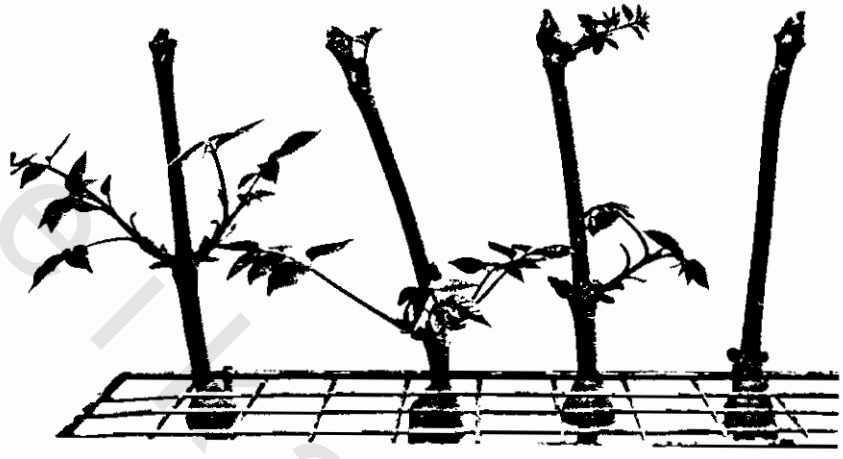
كيفية إكتشافه:

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

والمدرسة الثانية فى 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 فى الأعمار الصغيرة تسقط أيضاً فى نباتات القطن . وقد أمكن عزل مركب فى 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 سمى هذا المركب باسم abscisin I عام ١٩٦١ . أمكن أيضاً إستخلاص مركب آخر فى 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 الثانى هو الأساس ولذلك فقد أجريت البحوث بعد ذلك بإستعمال مركب abscisinII منذ إكتشافه عام ١٩٦٣ .

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



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

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

وقد إقترح تكوين مركبات مثبطة أو مركب مثبط فى الأوراق التامة البلوغ mature فى النباتين السابقين عند حلول الخريف أى فى أيام قصيرة النهار. وأن هذا المركب ينتقل فى اللحاء من الأوراق إلى أعلى حتى يصل إلى القمة النامية ويسبب منع إنقسام الخلايا والنمو ولذلك يصبح البرعم الطرفى كامن. أمكن بعد ذلك عزل مركب فى صورة نقية بلورية من أوراق نبات الإسفندان *Acer*، أثناء وجود هذا النبات فى أيام النهار القصير، وله فاعلية فى تثبيط نمو البرعم الطرفى 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 فى 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 والكيماوية . 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 جوهرى 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 والجبريللينات والسيتوكينينات والتى تعتبر activators منشطات.

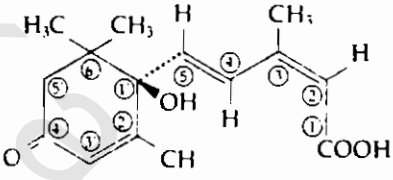
تركيب وأنواع حامض الأبسيسيك:

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).

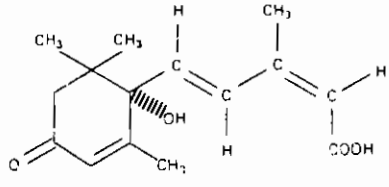
يوجد فى هذا المركب نوعين من التشابه isomerism تشابه ضوئى optical وتشابه فراغى تركيبى geometric.

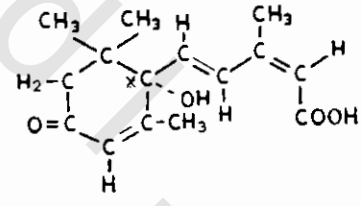
يوجد لهذا المركب نوعين من المشابهات الضوئية optical isomers حيث أن الجزيئ به ذرة كربون وهى رقم ١ غير متماثلة asymmetric . ولذلك يوجد نوعين من المشابهات الضوئية وهما dextrorotatory أى + حيث يحول الضوء المستقطب

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



S - abscisic حمض S أبسيسيك





(+)- abscisic acid

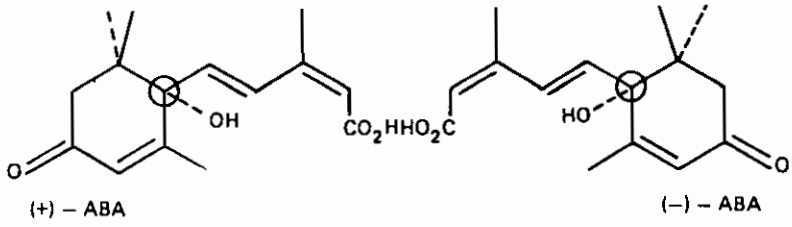
xasymmetric carbon

(شكل ١٤١) : التركيب الجزيئى لـ ABA

التركيب الجزيئى بالذرات (يمين)

التركيب الجزيئى العام (شمال)

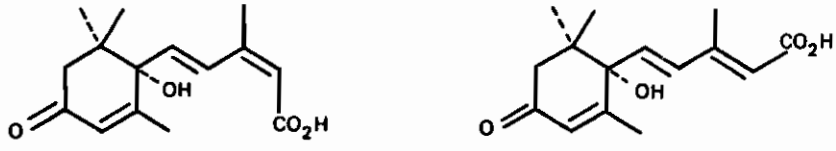
ذرة الكربون ذات علامة × فيها عدم الثبات ولذلك يحدث المشابهين الضوئيين لهذا المركب.



(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 السلسله. حيث يوجد ABA 2-*cis* والنوع الأخر هو ABA 2-*trans* . يعتبر المركب الأول فعال فسيولوجياً بينما المركب الثانى غير فعال فسيولوجياً. تحتوى النباتات على خليط من هذين المشابهين.

يعتبر حمض الأبسيسيك من مركبات سس كويتربين 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، وهـــى R ـ حمض الأبسيسيك (R) abscisic acid)) والثانـــية S ـ 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 ـ (+) (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.



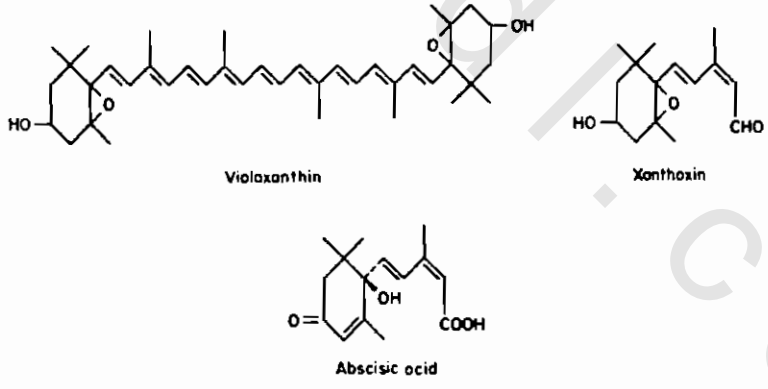
2 - cis - ABA　　2 - trans - ABA

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

كيفية تخليق ABA طبيعياً:

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

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

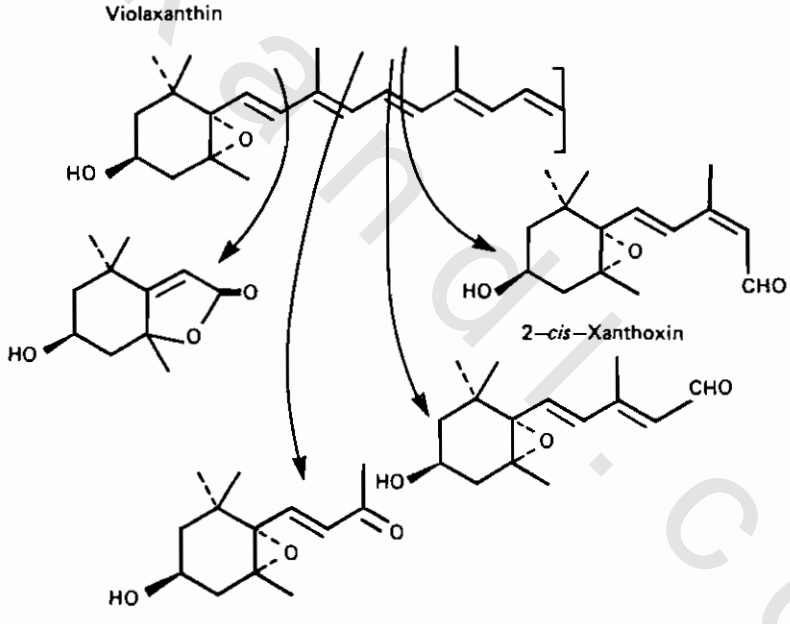


(شكل ١٤٤) : تخليق حامض الابسيسيك عن طريق أكسدة بعض الزانثوفيلات مثل فيولازانثين وزانثوكسين.

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

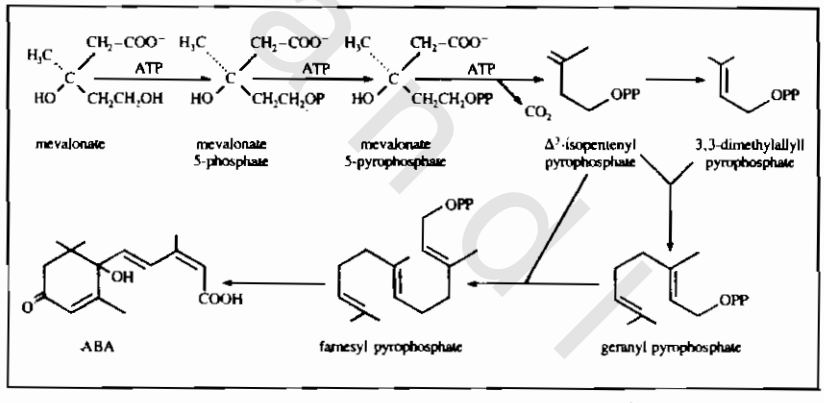
ومما يثبت ذلك أن تغذية نبات الطماطم بمركب xanthoxin يسبب زيادة فى تركيز ABA. وقد أستعمل فى هذه التجارب مركب xanthoxin معلم أى مشع بإستعمال كربون مشع ك١٤.

وجد فى تجارب أخرى أن المركبات الوسطية لتحلل فيولازانثين تحتوى بعض المركبات منها 2-cis-xanthoxin ومركبات أخرى (شكل ١٤٥). ومن المآخذ على هذه الطريقة أن بعض النباتات لاتحتوى 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.

فى 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 الذى يتكون منه ABA أو الجبريللين. وجد أن أوراق نبات القمح يمكن أن تخلق بسرعة كبيرة ABA عند وجود النبات فى ظروف قلة الماء water stress وأن معاملة هذا النبات بحامض mevalonic مشع يسبب ظهور الإشعاع فى ABA. كما أمكن إثبات ظهور الإشعاع فيه عند معاملة أجزاء مختلفة من النبات بحامض mevalonic مشع وهذه الأجزاء هى الأجنة أثناء تكوينها والأندوسبرم والثمار فى عدد من النباتات. يتم تحويل حامض mevalonic إلى 2-*trans* ABA وهذا المركب غير نشط فسيولوجياً وتحدث هذه الخطوة فى وجود الضوء أو الظلام.



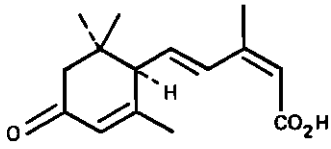
(شكل ١٤٦) : خطوات تحويل ABA من حامض الميفالونيك.

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

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

دائما زيادة فى تركيز endogenous ABA والعكس صحيح. وقد أمكن إثبات ذلك فى 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 فى البيئة ويكون أيضاً حامض ABA (شكل ١٤٧).



1 –desoxy ABA

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

مدي إنتشار ABA في النباتات المختلفة :

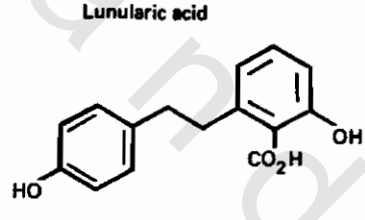
يوجد ABA فى أجزاء مختلفة لنباتات كثيرة من الفطريات والطحالب والبكتريا والتيريديات ومنها السرخسيات وعاريات وكاسيات البذور. لايوجد حتى الآن دليل على وجود هذا المركب فى الحزازيات المنبطحة أو القائمة ولازال هذا الوضع للحزازيات غامض. يوجد مركب مثبط إسمه lunularic أمكن إستخلاصه من الحزازيات المنبطحة.

أمكن إثبات وجود مركب ABA فى 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 فى جميع أنسجة النباتات الزهرية ومنها أنسجة الجذر وخشب ساق النبات وعصارة الخشب وعصارة اللحاء وحبوب اللقاح وبتلات الأزهار والثمار والبذور.

تتراوح تركيزاته بكثرة فهو يوجد بتركيز 5 - 3 ميكروجرام لكل كيلوجرام فى النباتات المائية ويوجد بتركيز ١٠ ملليجرام لكل كيلو جرام فى الجدار الثمرى الوسطى mesocarp لثمار الأفوكادو. تركيزه فى أوراق نباتات المناطق المعتدلة يتراوح عادة بين ٥٠ إلى ٥٠٠ ميكروجرام لكل كيلو جرام. وجد حديثاً نسبياً أن فطر *Botrytis cinerea* يقوم بتخليق ABA .

يوجد بديل ABA لهورمون فى الحزازيات يسمى حامض ليونيولاريك lunularic (شكل ١٤٨). يمكن تقدير تركيزه بطريقة حـــيوية بواسطة إستعمال جيمات gemmae حزاز *Lunularia cruciata* وهو حزاز منبطح وقد سمى 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 ميثيل أستر هذا الهورمون طبيعياً فى النبات وقد أمكن التعرف عليه بواسطة GLC .



(شكل ١٤٨) : التركيز الجزيئي 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 ٦٥٠ نانومتر) يقل تركيز الهورمون وتزداد سرعة نمو الحزاز والعكس صحيح فى الضوء الأحمر البعيد (طول موجه ٧٣٥ 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 التى يوجد فيها ABA .

النبات		العضو أو الجزء أو النسيج النباتي
الأسفندان	*Acer pseudoplatanus*	الأوراق
	Betula pubescens	الأوراق
البطاطس		الدرنات
سرخس	*Pteridium aquilinum*	الريزوم
الفاصوليا		الساق
زانثيم	*Xanthium strumarium*	البرعم القمى
البن		البرعم الزهرى
التفاح		الثمار
جوز الهند الخوخ		الأندوسبرم
		عصارة الخشب xylem sap

تحتوى النباتات على مركبات مشابهة بدرجة كبيرة لـ ABA فى تركيبها الكيماوى. ومن هذه المركبات phaseic acid الموجود فى *Phaseolus multiflorus* ومركب thiaspirone الموجود فى أوراق نبات الشاى ومركب 2-*trans* ABA الموجود فى ثمار الشليك ومركب (+)abscisyl B-D-glucopyranoside الموجود فى ثمار الترمس. يوجد مركب methyl ester ABA وهو ذو نشاط ضعيف يتكون تركيبياً فقط أى صناعياً ولايتكون هذا المركب طبيعيا فى النبات . ويمكن إعتباره ABA تركيبى مع ملاحظة ضعف فاعليته ونشاطه.

أماكن تخليق ABA :

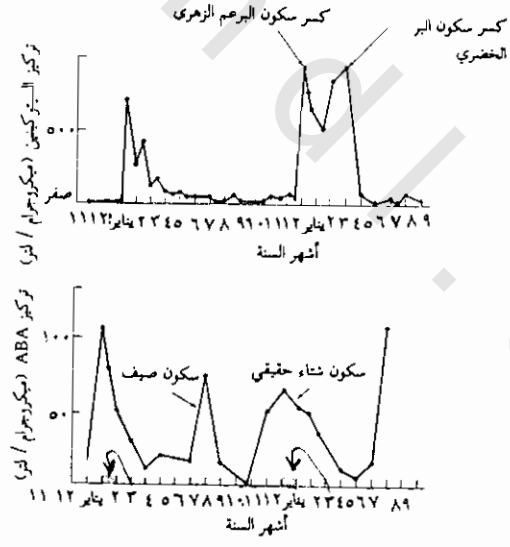
تعتبر البلاستيدات الخضراء هى مكان تخليق ABA. عند عزل بلاستيدات خضراء سليمة من أنسجة ثمار الأفوكادو فإنها تكون قادرة على تخليق ABA عند تغذيتها أو معاملتها بحامض mevalonic. وجد أيضاً أن عزل بلاستيدات خضراء سليمة صحيحة من أوراق الفاصوليا تكون قادرة على تخليق ABA. أما عن وجود

obeikandl.com

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

إنتقال ABA :

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



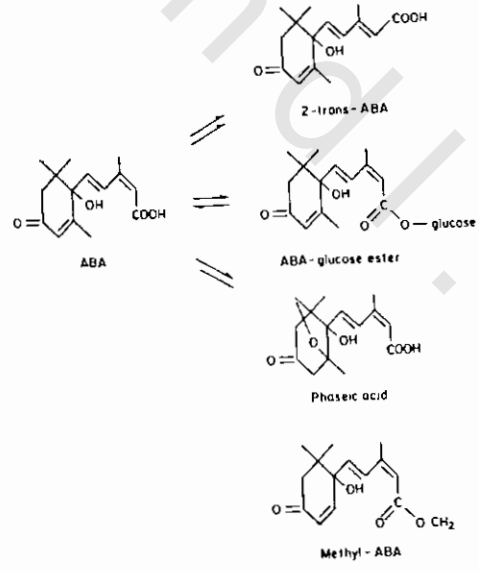
(شكل ١٤٩) : تركيز ABA والسيتوكينين فى عصارة خشب نبات الصفصاف أثناء أشهر السنة المختلفة.

ينتقل بسرعة كبيرة على وجه الخصوص فى نسيج اللحاء كما يمكن أن ينتقل فى نسيج الخشب كما أنه يمكن أن ينتقل من خلية إلى أخرى وخاصة الخلايا البارنشيمية ولذلك فإن وجوده فى أى نوع من الأنسجة أو الخلايا لايكون دليل على أن التخليق يحدث فى هذه الخلايا حيث يمكن أن ينتقل إلى هذه الخلايا دون أن يخلق فيها .

وجد أن معاملة ورقة بادرة الفاصوليا بهذا الهورمون فإنه يتنشر فى جميع أجزاء البادرة فى خلال يوم واحد ووجد ١٨ ٪ منه فى العقد الجذرية. وجد نفس الشيء فى بادرة القطن الأمريكى *(G. hirsutum)* حيث يظهر ABA فى جذور البادرة بعد ثمانية أيام من معاملة الأوراق . أستعمل فى التجربتين السابقتين ABA مشع فى ذرة الكربون ك١٤ .

طرق فقد نشاط ABA- Inactivation of ABA

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



(شكل ١٥٠) : إرتباط حامض الأبسيسك وتأثره بالضوء.

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

٢ ـ الأكسدة لتكوين phaseic acid .

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

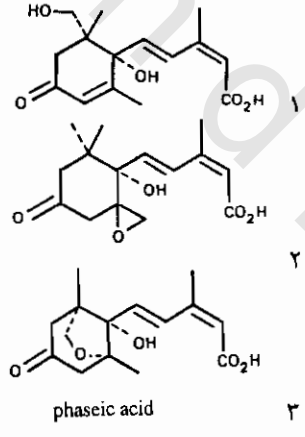
٣ ـ يمكن تحويله إلى glucoside وهو مركب ABA glucose ester حيث يرتبط الجلوكوز بمجموعة الكربوكسيل وهذا المركب أيضاً غير فعال ولكن بواسطة العصير الخلوى فى الخلايا يمكن تحويله إلى حامض الإبسيسيك بسهولة.

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 رابطه تعاونية covalent link مثل رابطة الجلوكسيد glucoside أو رابطة الأستر. بينما يعتبر القيد أن يصبح الهورمون مقيد bound ABA أى يرتبط بجزئيات كبيرة ويكون الإرتباط برابطة غير تعاونية non covalent bond ولا يمكن إستخلاصة بعملية الغسيل بواسطة بيئة مائية .يمكن فقد نشاط حامض الأبسيسيك بطرق عديدة وهى ما يأتى:

١ ـ فقد التنشيط بالأكسدة Oxidative inactivation of ABA:

أول المحاولات لعزل ناتج تحول غذائى لهذا الهورمونABA metabolite of نتج عنها مركب S-hydroxymethyl ABA (شكل ١٥١أ) .يوجد مشابه لهذا المركب وهو عبارة عن phaseic acid .وقد تم عزله من الفاصوليا .ولكن أتضح فيما بعد أن هذا التركيب خاطئ (شكل ١٥١ب) .وقد أمكن بإستعمال NMR nuclear magnetic resonance spectrum التعرف على التركيب الصحيح لهذا المركب (شكل١٥١ ج) .فى حالة أستر ميثيل ABA فأنه 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 أزالة مجموعة الميثيل على الذرة رقم٢ وأن يحل محلها ذرة إيدروجين مشع عبارة عن الديوتيريم 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 رقم٢ . عند تغذية نباتات طماطم بواسطة المركب السابق أى 2-Me-deuteriatid ABA فإنه يتم تحويله داخل النبات إلى phaseic . بأستخلاص الحامض الأخير من الطماطم والكشف عنه بواسطة NMR فأنه يتكون قمتين signals لمجموعتين ميثيل أذا كان التركيب الأول صحيح وتتكون قمة واحدة فقط أذا كان التركيب الثانى صحيح وذلك فى حالة إستبدال مجموعة الميثيل على ذرة الكربون رقم ٢ بذره إيدروجين مشع ديوتيريم. وجد أنه تتكون قمة واحدة فقط دليل على أن المركب الثانى صحيح والمركب الأول خاطىء.يتكون حامض الفاسيك وذلك بإستبدال مجموعة هيدروكسى ميثيل 6-hydroxmethyl على ذرة الكربون رقم ٦ وتكوين قنطرة أو رابطة إيثير an ether bridge وأيضاً عمل تشبيع للرابطة المزدوجة الموجودة بين ذرة كربون رقم ٢ وذرة كربون رقم٣ .

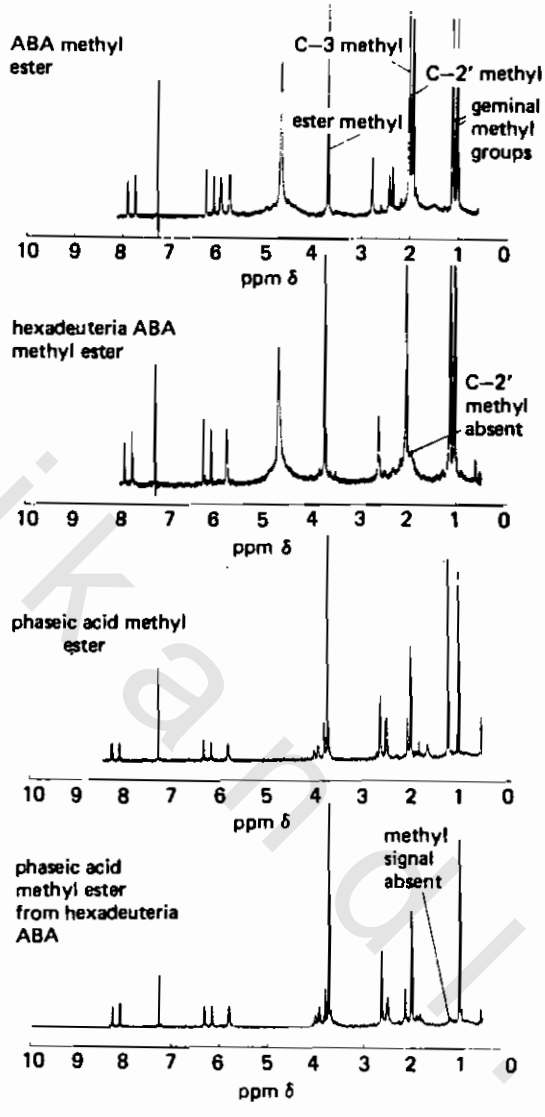


(شكل ١٥١) : حامض الفاسيك ومشتقاته

١ ـ 6,S hydroxymethyl ABA = MetaboliteC

٢ ـ تركيب خاطيء لحامض الفاسيك.

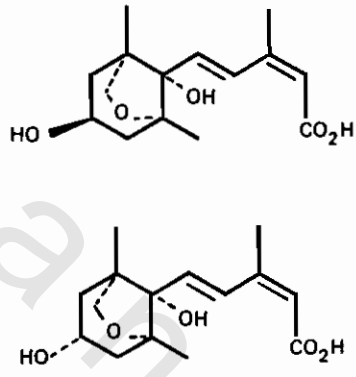
٣ ـ تركيب صحيح لحامض الفاسيك.



(شكل ١٥٢) : أطياف ميثيل أستر حامض الفاسيك وميثيل أستر ABA بأستعمال جهاز NMR.

مجموعة الميثيل على ذرة الكربون ٢ فى الحلقة واضحة فى ABA عند ١,٩ δ(١) ولكنها غائبة فى حالة hexadeuteria ABA (٢). وعند أستعمال hexadeuteria ABA فى تغذية نبات الطماطم فإن حامض الفاسيك المتكون ينقصه مجموعة ميثيل عند ١,٢ δ(٤) بالمقارنة بحامض الفاسيك العادى (٣).يثبت ذلك أن مجموعة الميثيل فى حامض الفاسيك تنشأ من مجموعة الميثيل الموجودة على ذرة الكربون رقم ٢ فى حامض الأبسيسيك ABA.

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



(شكل ١٥٣) : التركيب الجزيئي لمشابهين dihydrophaseic acid.

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

يحدث تجمع للمرتبطات القطبية polar conjugates فى الفجوة العصارية للخلية.يمكن أن يحدث تحرر للهورمون من هذه المرتبطات وذلك بواسطة تحلل قلوى alkaline hydrolysis . يعتبر ABA glucose ester وأيضاً ABA glucoside من المرتبطات والتى نتيجة لتحللها قلوياً ينتج ABA. تركيز ABA فى البروتوبلازم وفى

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

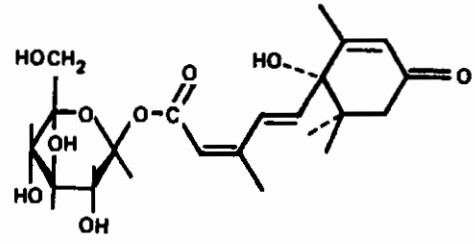
يعتبر كل من phaseic acid و dihydrophaseic acid ليس لهما أى تأثير على النمو أى عديما النشاط. وجد أنphaseic acid يثبط عملية البناء الضوئى بينما ABA لا يؤثر.

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.

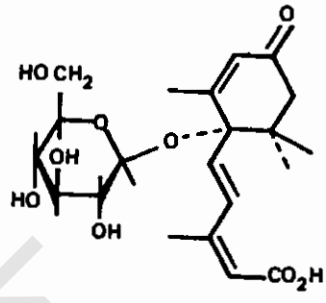
٢ - الأرتباط في Conjugation of ABA-ABA :

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 تحررABA 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 والمرتبط مشكوك فى صحتها ومن أمثلة ذلك أهمية ABA فى سكون البراعم أصبحت مثار الجدل.



ABA glucose ester



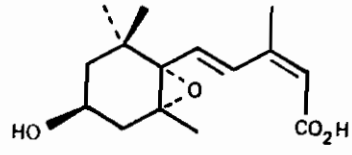
ABA glucoside

(شكل ١٥٤) : التركيب الجزيئي لمرتبطات ABA.

أجريت كثير من التجارب على نباتات ذابلة ووجد أن تركيز ABA أرتفع إلى أربعون مره بينما تركيز ABA المرتبط ظل ثابتاً. يدل ذلك على أن ABA المرتبط لا يعتبر مصدر لـ ABA الحر. وفى أحد التجارب لأكتشاف مدى التحلل المباشر ل ABA المرتبط إلى ABA حر على نبات البنجر وعند تغذية النبات على ABA مشع فى الكربون ك ^{14} 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 فى 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 ـ يتحول بضعف أو بصعوبة كما وجد أيضاً أن ABA (+) 2-trans يتحول بصعوبة

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



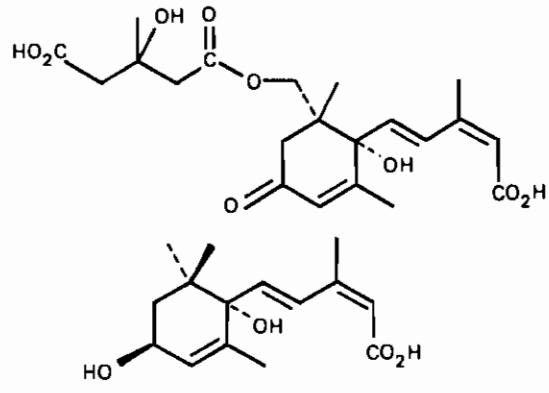
(شكل ١٥٥): التركيب الجزيئى لحامض xanthoxin.

يتضح مما سبق أن الأكسدة عبارة عن تثبيط متخصص (specific inactivatiom) لـ ABA بينما يعتبر الأرتباط 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 الأستكشاف لنواتج الفصل لـ HPLC (monitorimg HPLC elution profiles) وجد أيضاً أنه يتكون من hydroxymethyl ABA مركب هو عبارة عن hydroxymethyl glutoryl ABA (شكل ١٥٦) فى بذور الأكاسيا الكاذبة false acacia (*Robinia pseudacacia*). و وجد أيضاً أن ABA يتحول إلى1,4 trans diol ABA- فى 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 .

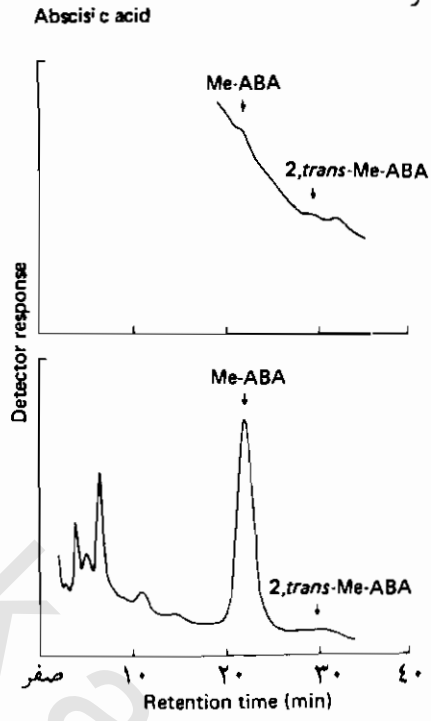
٣- إحداث التشابه Isomerization :

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



(شكل ١٥٦) : التركيب الجزيئى لمركب hydroxymethyl glutaryl ABA (علوى).
ومركب *1,4-trans diol ABA* (سفلى)

توجد إختبارات كثيرة بجهاز GC لمركبABA أظهرت أن كمية ضئيلة من 2-*trans* ABA موجودة بالأوراق بالرغم من الأحتياطات الشديدة لمنع عملية حدوث التشابه فى أثناء العزل (شكل ١٥٧) .وفى أحد التجارب الخاصة بذلك أمكن عمل إستكشاف monitoring لدرجة تحويل ABA إلى شبيهه 2-*trans* ABA وذلك بإضافة racemic ABA مشع أى (C14) ABA – ± إلى بيئة الأستخلاص من النبات.ثم يتم قياس تركيز t-ABA(+) الطبيعى 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 ٪.وقد وجد أن ٤ ٪ من ABA الطبيعى 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.



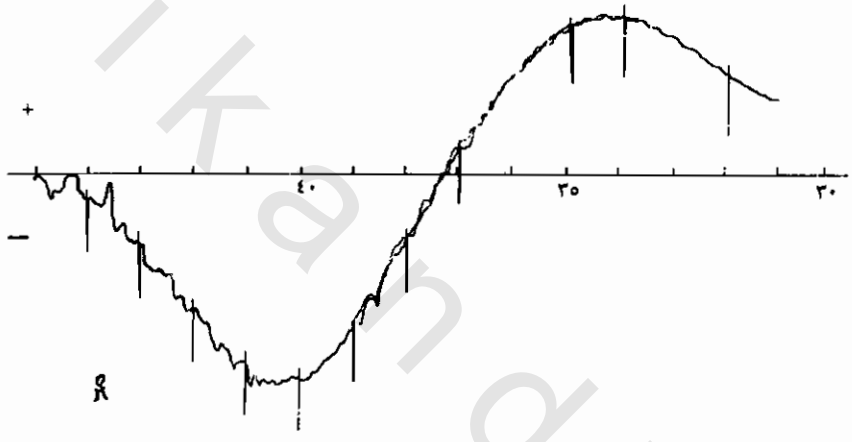
(شكل ١٥٧) : قياس حامض الأبسيسيك ABA

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

حيث أن النشاط الحيوى لمركب *trans*-ABA معدوم وأيضا فشل تحويله إلى ABA وعدم وجوده فى بذور الأفوكادو وفى 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 فى أن *trans*-ABA عبارة عن ناتج تحلل لـ ABA فى وجود الضوء phytolytic degradatiom. نقطة التوازن بين ABA و t-ABA هى أن تكون النسبة ١ : ١ فى 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 فى أوراق الفاصوليا الفرنساوى french beans فى الأوراق الذابلة هى حوالى ثلاث إلى ستة ساعات ولذلك فإنه يوجد بإستمرار إنتاج ل ABA ونقص لـ t-ABA حيث أنه يصبح مرتبط.



(شكل ١٥٨) : طيف حامض الأبسيسيك بأستخدام طريقة التشتت الدورانى الضوء بصرى optical rotatory dipersion spectrum (ORD) وذلك فى حالة ABA المستخلص من ثمار الأفوكادو.يعتبرالخط الأفقى هو درجة تشتت دورانى بصرى 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 فى منطقة الأشعة الفوق بنفسجية عند طول موجة ٢٥٠ نانومتر ورقم الموجة ٣٠ تقع فى نهاية الضوء الأزرق للطيف الضوئى عند طول موجة ٣٣٣ نانومتر.يعتبر رقم الموجة ٤٣,٦ هو الأمثل لقياس تركيز ABA وهو عند طول موجة ٢٨٩ نانومتر.تحتوى العينة المستعمة على ٦,٤ ميكروجرام ABA+ لكل مل فى محلول ميثانول حامضى.

obeikandl.com

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 وtertiaryhydroxyl مع 2-cis وأيضا الرابطة المزدوجة الموجودة فى الحلقة. يوجد ثلاث نواتج تحلل لمركب ABA وهى حامض الفاسيك وABAGE وABAGS 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 ABA (^{14}c) و PA(C^{14})و DPA (C^{14}) فى أوراق الفاصوليا الفرنساوى french bean أثناء إنتفاخ خلايا الورقة وأيضا أثناء الذبول.وجد أن تركيز endogenous ABA أى تركيزABA الطبيعى فى النبات هو ٤٠ ميكروجرام / كجم ثم يزداد حتى يصل ٥٠٠ ميكروجرام/كجم فى أثناء الذبول.كما وجد أن نتيجة تغذية الورقة بـ ABA(C^{14}) نتج عنه تحلل تدريجى مستمر إلى حامض الفاسيك ثم dihydrophaseic acid ومع ذلك تظل 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.

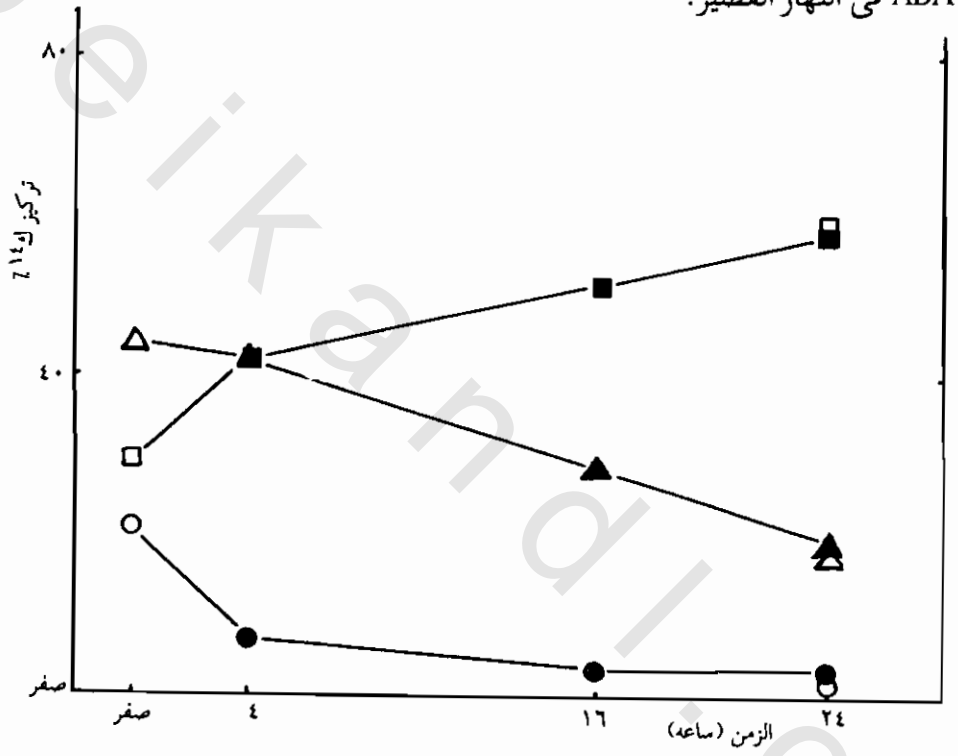
التأثيرات المختلفة لحامض ABA :

يوثر ABA تأثيرات عديده على النبات منها مايأتى :

١ ـ سكون البراعم Bud Dormancy

يحدث سكون للبراعم فى النباتات متساقطة الأوراق وأيضا فى الأشجار الخشبية مثل *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 صموغ على الأوراق الحرشفية لأحكام غلقها كما تصبح السلاميات قصيرة.يتحكم فى 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 فى الأشجار فى الخريف والربيع.تعتبر الأوراق المكتملة النمو هى المستقبلة لتاثير النهار القصير أى أنها تشعر بالنهار القصير وتتجاوب معه.ومن الثابت الآن أن الأوراق المكتملة النمو هى مكان أساسى لتخليق ABA فى النهار القصير.



(شكل ١٥٩) : turnover حامض الأبسيسيك المعلم (المشع) ABA(2-C^{14})+ فى أوراق الفاصوليا الذابلة.تم معاملة عينات من الأوراق نضرة أو ذابلة بواسطة ABA معلم لمدة ستة ساعات.يتم تحلل ABA بسرعة بينما كمية الكربون المشع ^{14}C فى DPA تزداد أثناء نقص تركيز PA.

ABA فى الأوراق النضرة (دائرة بيضاء) وفى الأوراق الذابلة (دائرة سوداء).PA فى الأوراق النضرة (مثلث أبيض) وفى الأوراق الذابلة (مثلث أسود).DPA فى الأوراق النضرة (مربع أبيض) وفى الأوراق الذابلة (مربع أسود).

ثم ينتقل ABA فى اللحاء أو الخشب حتى يصل إلى البرعم الطرفى ويسبب السكون.

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

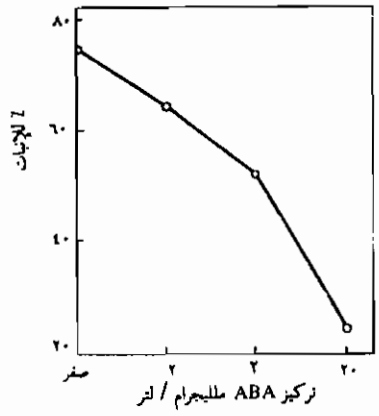
عند زراعة نبات عدس الماء *Lemna* فى بيئة مائية صناعية مضاف إليها حامض ABA فإن نمو النبات يتوقف وتتكون تراكيب معينة تسمى turions وهو تعتبر براعم ساكنة.

يعتقد أيضا أن ABA له دور فى سكون براعم درنات البطاطس.

حديثا يوجد شك كبير فى أهمية ABA فى أحداث سكون البراعم وقد يكون له دور فى ذلك ولكنه قد لا يكون العامل الرئيسى فى ذلك.

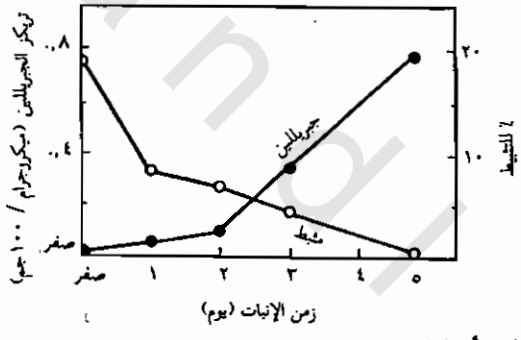
٢ ـ كمون البذور Seed Dormancy

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



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

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).



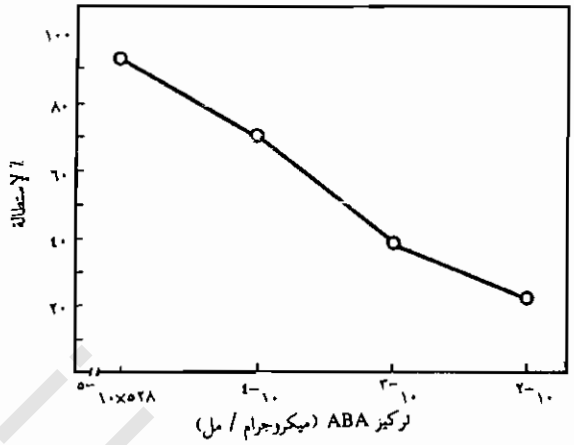
(شكل ١٦١) : تأثير تركيز الجبريللين و ABA على إنبات البذور (بذور نبات birch).

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

٣ ـ 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.

وفى 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 ـ نمو الجذور Root Growth

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

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

٥ - الأزهار Flowering

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

وغير معروف ميكانيكية ذلك.

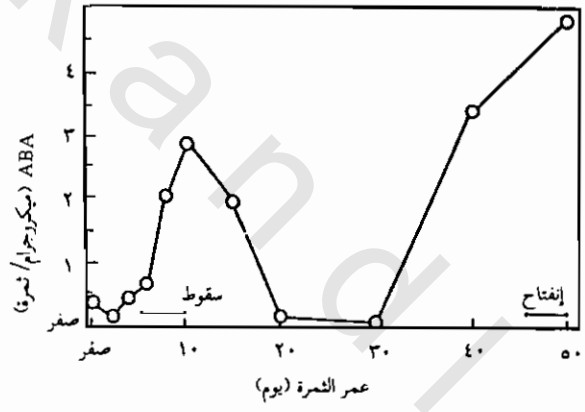
٦- تكوين الثمار والبذور Fruit and Seed Development

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

٧- سقوط الأوراق Abscission

فى حالة نبات القطن يزداد تركيز ABA إلى الضعف أثناء نمو وتكوين اللوزه.

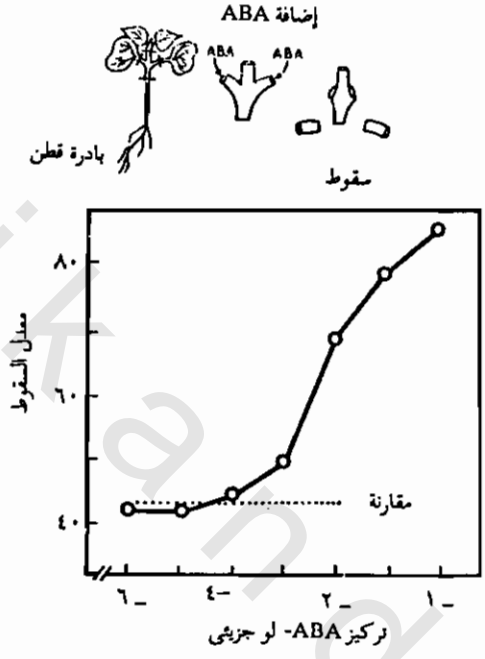
يوجد فترتين يزداد فيهما تركيز ABA أثناء نمو ونضج الثمرة. تحدث الفترة الأولى أثناء سقوط الثمار الصغيرة السن immature fruit shedding وتحدث الفترة الثانية أثناء تفتح اللوز (شكل ١٦٣).



(شكل ١٦٣) : تركيز ABA أثناء نمو لوز القطن.

تسبب المعاملة بـ ABA سقوط أعناق أوراق بادرات القطن (شكل ١٦٤) وأيضا الفاصوليا و *Coleus* وغيرها.يلاحظ أن المعاملة على أعناق الأوراق المنزوع نصلها debladed petiole stumps وليست على الأوراق العادية.وجد أن تركيز ١٠-٤ جزيئى من ABA كافية لسقوط أعناق الأوراق الفلقية فى 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 الهورمون علي سقوط الأوراق من النبات السليم ضعيف ويرجع الأساس في سقوط الأوراق إلي الإيثيلين والأوكسين.



(شكل ١٦٤) : تأثير ABA على سقوط الأوراق الفلقية لبادرة القطن (أعلى)
ـ تأثير تركيز ABA على سقوط الأوراق الفلقية لبادرة القطن (أسفل)

٨ ـ الشيخوخة Senescence

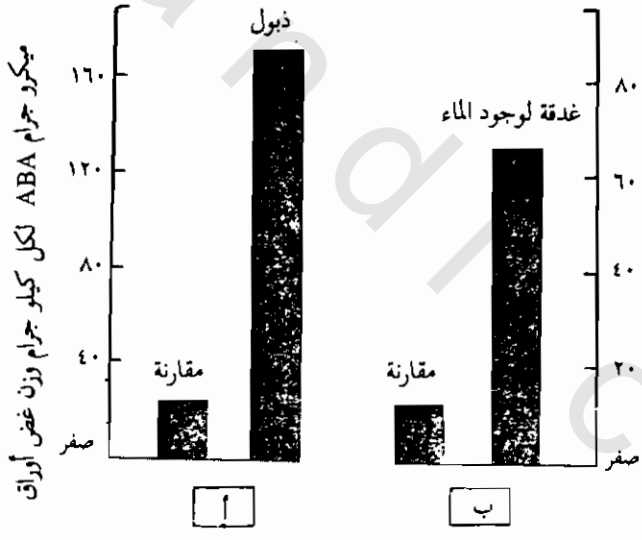
وجد أن تعويم أواراق نبات أبو خنجر علي الماء يسبب الشيخوخة لهذه الأوراق ومن مظاهر الشيخوخة فقد في الكلوروفيل وإنخفاض تركيز البروتين وRNA. وجد أن تعويم floating أوراق هذا النبات علي محلول مائي يحتوي ABA فإن هذه المعاملة تسرع من أعراض الشيخوخة.يكون النقص في تركيز البروتين في هذه الحالة راجع

إلى إنخفاض معدل تخليق البروتين عنه عن هدم البروتين protein degradation

٩ ـ الظروف البيئية القاسية Environmental Stress وتركيز ABA

عند تعريض البادرة لظروف جفاف الماء أو بغمر الجذور فى محلول carbowax فإن الأوراق تبدأ فى الذبول. وبعد دقائق معدودة يزداد تركيزABA فى الأوراق الذابلة كما توجد علاقة تناسب طردية بين تركيز ABA ودرجة الذبول. ونتيجة لذلك يزداد تخليق ABA ولا تكون الزيادة فى التركيز نتيجة لتحررABA من الجلوكوز أى من صور ABA المقيدة والمرتبطة أى أن زيادة التركيز نتيجة لتخليق جزيئات جديدة وليست لتحرر ABA من glucoside. وقد أمكن إثبات ذلك فى تجارب كثيرة بإستعمال mevalonic مشع به ك^{14} حيث ظهر الإشعاع فى ABA.

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



(شكل ١٦٥) : أ ـ تركيز ABA فى أوراق بادرة القمح ذابلة فى محلول carbowax.

ب ـ تأثير التربة الغدقة المحتوية على الماء لمده خمسة أيام على تركيز ABA فى نباتات فاصوليا قزمية.

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 لملوحة 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 وبالتالى فإن النبات يمكن أن يقاوم الظروف البيئية غير الملائمة.

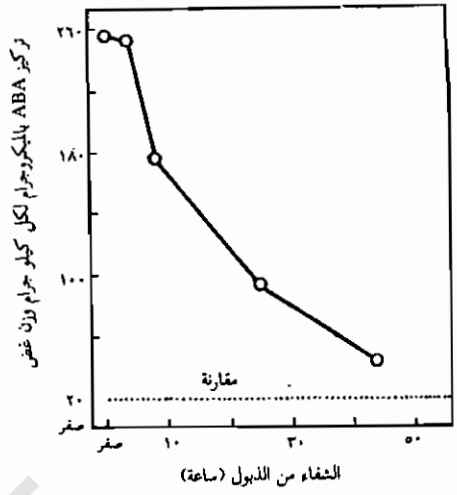
فى جميع الحالات السابقة يسبب الأعتدال فى الرى إن يصبح النبات عاد وغير ذابل وتصبح الخلايا turgid منتفخة ويقل فى هذه الأثناء تركيز ABA (شكل ١٦٦).

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 الرى على نقص تركيز ABA في نموات نباتات brussel والتى كانت تعانى من الذبول.

وجدت طفرة فى نبات الطماطم تسمى flacca حيث أن نباتات هذه الطفرة تعانى من ذبول مستمر ودائم حيث أنها غير قادرة على غلق الثغور وقد فسر ذلك هو نتيجة لنقص تركيز ABA. وبقياس تركيز ABA فى هذه النباتات الطفرة أتضح أن هذه النباتات تعانى من نقص فى ABA. وبمعاملة هذه النباتات بهذا المركب أىABA 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 ـ ضغط الأنتفاخ للخلايا Turgor pressur of cells

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

١٢ ـ مقاومة الضرر للنبات Resistance to injury

وجد أن معاملة النباتات العادية (الوسطية mesophytic plants) بـ ABA يسبب تحمل النباتات للجفاف أى 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 الجنينية الوسطى بتركيز من إندول حامض الخليك ٥٠ ملليجرام لكل لتر يسبب موتها. ولكن فى وجودABA بتركيز ٢ ملليجرام/ لتر تصبح هذه القطع سليمة عادية وحتى فى تركيزات أعلى من أندول حامض الخليك تصل إلى مائة ملليجرام لكل لتر. وجد أن معاملة النبات الكامل فى الأسفندان *Acer negundo* والتفاح والبرسيم الحجازى والخيار بهذا الهورمون تزيد من مقاومتهم لضرر البرد القارص chilling injury .

١٣ ـ 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 أختبار الجنين embryo bioassay. تعتبر هذه النتيجة فريدة حيث أنه من المعتاد أن يكون أحد المشابهين فعال ونشط والآخر يكون ضعيف أو غير فعال.وجد آن 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 المشابة (+) له تأثير مثبط سريع وبطئ slow reaction and fast reaction بينما المشابه (−) له تأثير مثبط بطئ فقط.

١٤ـ تخليق وأنتقال وتوزيع الهورمون داخل الخلية

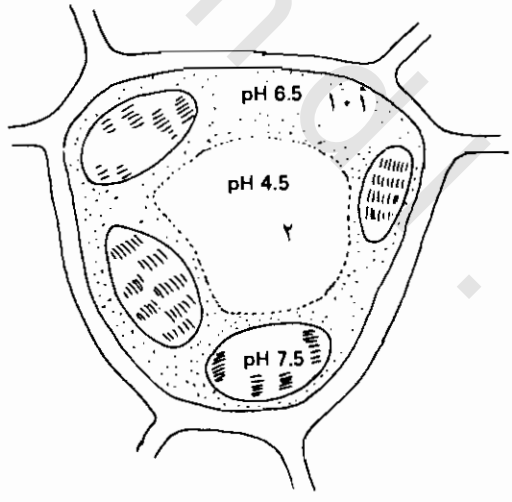
Intracellular compartmentation, synthesis, transportation and distribution

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 صوره أيونية ionized form حيث أنه كلما قل رقم pH كلما قل تجمع وتركيز الهورمون. 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 فى صورة مقيدة bound form (يوجد فرق كبير بين ABA المرتبط وبين ABA المقيد حيث أن المقيد يكون مرتبط بجزيئ كبير بطريقة ما).

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



(شكل ١٦٧) : توزيع ABA فى خلايا ميزوفيل الورقة.يعتبر ABA حامض ضعيف وتدل الأرقام على التركيز النسبى للحامض فى 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 تركيزABA المقيد فى البلاستيدات الخضراء للأوراق العادية ٩٥ ٪ بينما تركيزه فى الأوراق الذابلة ١٥ ٪.

١٥ ـ 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 ـ التأثير علي تخليق الأنزيمات ونشاطها

Effect on enzyme activity and synthesis

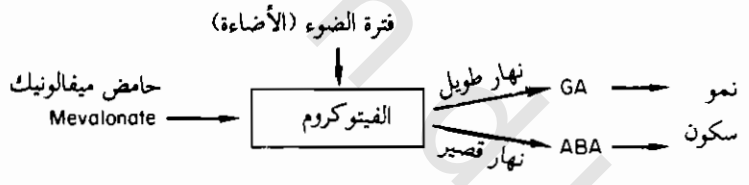
وجد أن ABA لا يؤثر على نشاط الأنزيمات بل يؤثر على تخليقها.ومن أفضل الأمثلة المدروسة فى ذلك تكوين أنزيم ألفا أميليز فى طبقة أليرون حبوب الشعير حيث وجد أن تشجيع تخليق هذا الأنزيم بواسطة إضافة الجبريللين وتثبيط تخليق هذا الأنزيم بإضافة ABA.

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 يعتبرcordycepin (سم ينتج بواسطة فطر بازيدى ويمنع تخليق RNA) غير قادرعلى القيام بعملية التثبيط أى يفقد تأثيره.أى أن ABA له تأثير مانع لتخليق البروتين لمدة أطول بالمقارنه 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 السلامية وإنتاج أوراق

حرشفية صغيرة بدلا من الأوراق الخضراء العادية كما أن الأنقسام 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 غسيل البذور جيدا أو معاملتها بالجبريللين أو الكينتين لتساعد فى إنباتها ومن ذلك يتضح أن حامض الجبريلليك وحامض الأبسيسيك يمكن أن يشتق كل منهما من mevalonic acid وأيضا كل من المركبين له تأثير فسيولوجى مختلف عن الآخر ولكنهما يتكونا أيضا وإلى حد كبير من نفس metabolic pathway ولذلك يمكن للنبات أن يتحكم فى انتاج واحد دون الآخر عن طريق switching وحيث أن الجبريللينات تتكون فى أيام ذات النهار الطويل وحامض الأبسيسيك يتكون فى الأيام ذات النهار القصير.فمن المعتقد أن يكون التحكم عن طريق الفيتوكروم ففى النهار القصير يتأثر الفيتوكروم وينتج حامض الأبسيسيك وفى النهار الطويل يتأثر الفيتوكروم وينتج الجبريللينات (شكل ١٦٨).



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

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

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

من المعروف أن أيون البوتاسيوم فى الليل ينتقل من العصير الخلوى للخلايا الحارسة إلى خلايا البشرة المجاورة ولذلك يقل الضغط الأسموزى لهذه الخلايا فتترهل وتغلق الثغور أما فى 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 فى البشرة تعمل كمخزن حيث يختزن 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 لكى ينخفض تركيز حامض ABA فى الخلايا الحارسة ثم بعد ذلك ينتقل إلى الخلايا الحارسة أيون البوتاسيوم من الخلايا المجاورة وتمتص الخلايا الحارسة الماء وتفتح الثغور.أى أن ABA يعمل على خروج أى طرد أيون البوتاسيوم من الخلايا الحارسة.

طرق تقدير حامض الأبسيسيك

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

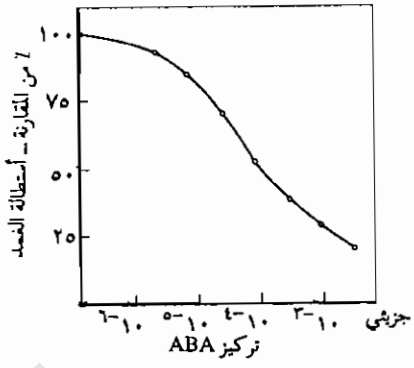
أولاً : طرق حيوية تستخدم فيها النباتات Bioassay

توجد طرق كثيرة منها ما يأتى:ـ

١ ـ 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 فى standard curve المنحنى القياسى (شكل ١٦٩).



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

٢ ـ انبات البذور:

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

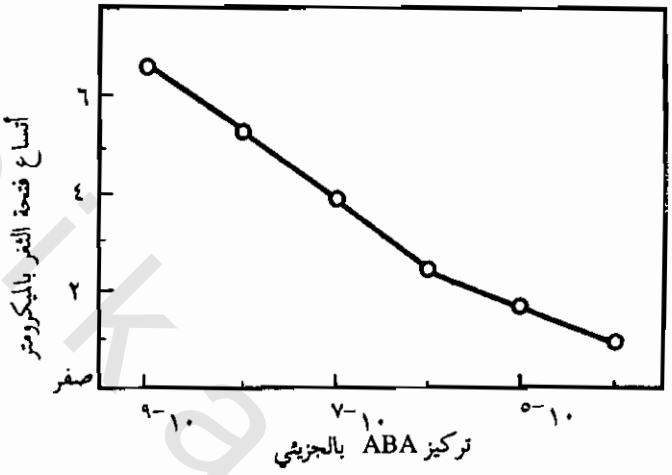
٣ ـ معاملة الذرة العادية:

عند معاملة نباتات الذرة العادية بهذا المركب فإنه يسبب تضاد لعمل مركبات الجبريللين فى 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 ـ طريقة غلق الثغور:

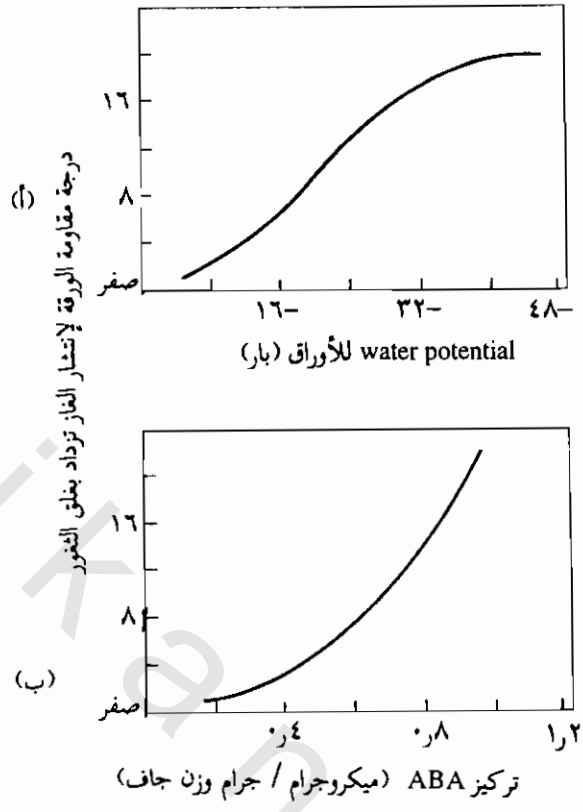
باستخدام أجزاء من أوراق نبات *Commelina communis* وتعويم هذه الاجزاء على محلول من ABA فى عدم وجود ك أ٢ أوتعامل أجزاء الورقة بقطرات من

حامض ABA فى عدم وجود ك أ٢ فأن الثغور ستقفل بزيادة تركيز حامض الابسيسيك.مده التجربة هى ٣ ساعات. بعد أنتهاء التجربة يمكن رسم منحنى يوضح العلاقة بين التركيز وفتحة الثغر. وتوضح درجة فتح الثغور على المحلول الصادى وتركيز ABA على المحور السينى (شكل ١٧٠).



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

يمكن عمل ذلك أيضاً فى 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).



(شكل ١٧١) : العلاقة بين water potential للأوراق وإتساع فتحة الثغر وتركيز ABA فى الأوراق فى 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 فى خلايا الأوراق كلما صغرت مساحة فتحة الثغر.

ب ـ تتناسب درجة غلق الثغر مع تركيز ABA طردياً.

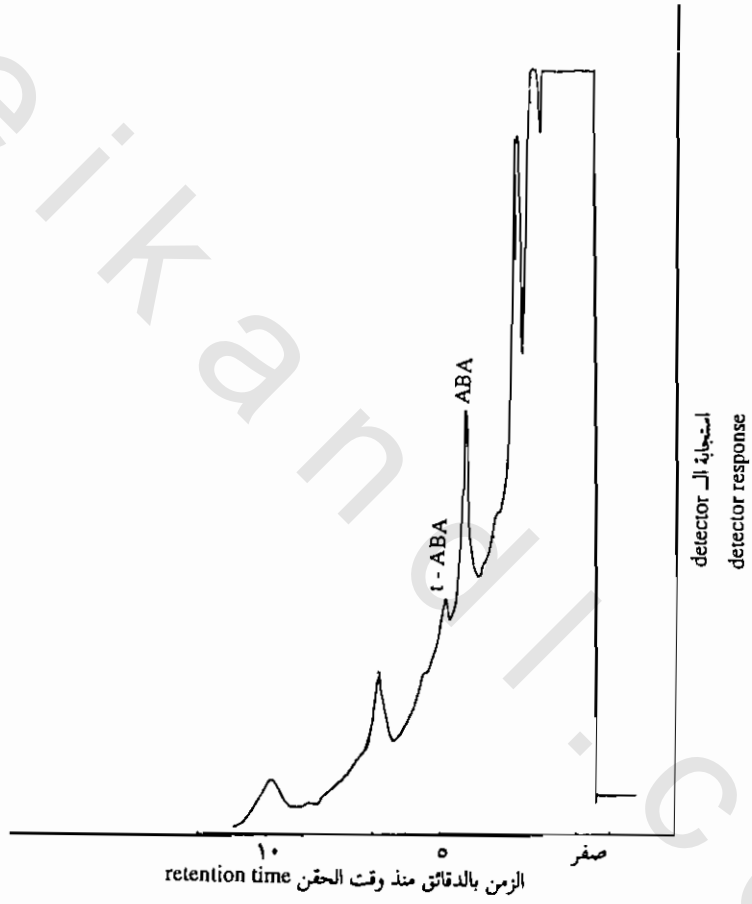
ثانياً : طرق كيماوية

يتم إستخلاص ABA بواسطة كحول الإيثيل أو الميثيل.

١ ـ طريقة Gas Chromatgraphy :

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

لتقدير ABA بهذه الطريقة لابد من تحويله إلى مركب methyl ester of ABA ثم يحقن هذا المركب الأخير فى الجهاز. تعتبر هذه الطريقة حساسة حيث يمكن أن تقيس تركيزات منخفضة جداً مائة femtogram fg (١٠×١^{10} 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 فى مستخلص من أوراق طماطم فى الظلام.

تم حقن ١ , جرام مستخلص أوراق الطماطم فى جهاز التحليل الكروماتوجرامى الغازى.

obeikandl.com

٢ ـ الطريقة Gas Liquid Chromatography (GLC)

تعتمد طريقة التحليل الكروماتوجرافى الغازى السائل gas liquid chromatography (GLC) على تحضير وتطاير مشتقات الحمض المختلفة مثل مشتقات ثلاثى الميثيل سيليل (ABA trimethyl silyl)، وتنقى العينة فى العادة بالكربون النشط وتخلط بمواد مثل بس ـ ترای ميثيل سيليل أسيتاميد bis-trimethylsilyl acetamide لكى ينتج مشتق حمض الأبسيسيك ترای ميثيل سيليل trimethylsilyl derivative of ABA وتقاس المشتقات المختلفة بعد ذلك بطريقة التحليل الكروماتوجرافى الغازى السائل (GLC) وتنسب إلى كمية معلومة من محلول الحمض المعامل بنفس الطريقة، وهذه الطريقة حساسة جداً ولها المقدرة على تقدير كمية من حمض الأبسيسيك فى حدود ٠٫٠٣٠ ميكروجرام من المواد المشابهة جداً للحامض ـ ويجب أخذ الحذر فى تحضير مشتقات ترای ميثيل سيليل trimethyl silyl واستعمال أعمدة (GLC) ومعايرة calibration الجهاز.

٤ ـ طريقة Optical Rotary Dispersion Spectrum-ORD.

طرق التحليل الطيف مقطابية Spectropolarimetric Analysis

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

وتحسين طريقة (ORD) يستلزم استخدام كل من طريقة (ORD) أى التشتت الدورانى الضوئى وامتصاص الأشعة فوق البنفسجية بالحامض (ABA) وهذا مهم على وجه الخصوص فى 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 الكروماتوجرافى الغازى والسائل.

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

يمكن إضافة المشابه 2-trans ABA إلى المستخلص النباتى وعند رصد جهاز GLC لقمة ميثيل أستر حامض الأبسيسيك Me ABA (Me ABA peak) فإنه يلى 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 تركيزة المضاف إلى المستخلص النباتى معروف فيمكن حساب كمية الفقد أثناء الأستخلاص. وبالمقارنة بذلك وبنفس النسبة يمكن تقدير الفقد فى الأستخلاص لهورمون ABA، ومن عيوب هذا الطريقة أن 2trans-ABA يمكن أن يوجد طبيعيا فى النبات كما أنه يمكن أن يتحول ABA الطبيعى فى النبات فى وجود الضوء إلى مخلوط بنسبة ١ : ١ من المشابه 2trans- ABA أى تكون النسبة واحد هورمون طبيعى إلى واحد 2trans-ABA ولذلك فأن أى تعريض لمحلول الهورمون للضوء يسبب إختلال النتائج وفقد صحتها ومصداقيتها.حديثاً يضاف إلى المستخلص أيثيل أستر حامض الأبسيسك ethyl esterABA بدلاً من ميثيل أستر وبذلك يستعمل كمحلول قياسى داخلى an internal standard. يتم أيضاً فصل إيثيل أستر الهورمون عن ميثيل أستر الهورمون بواسطة GLC. يمكن حساب نسبة الفقد فى الهورمون أثناء الأستخلاص وهى نفس نسبة الفقد فى إيثيل أستر الهورمون.

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

عمل تنقيه تامة تقريباً للمستخلص النباتى 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 النباتى. 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 ك^{14} أو ذرة الإيدروجين H^3 حيث يوضع فى المستخلص النباتى 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 ـ 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 أدخال مجموعة ميثيل methylation لكل من ABA المشع وغير المشع.يعطى مركب 3-trideuteriomethyl ABA قمة peak أكبر بدرجة ثلاث وحدات كتلة mass units بالمقارنة بقمة ABA غير المشع أى الطبيعى.تحسب النسبة بين نوعى الأيونين الأبوين ومنها يمكن حساب تركيز ABAفى العينة والنبات أى endogenous ABA.

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

تعتبر هذه الطريقة من أفضل الطرق حيث أنها دقيقة وذات حساسية لدرجة كبيرة حيث أنها يمكن أن تقيس حتى تركيز ١×١٠$^{-١٠}$جرام.

ومن أحسن الوسائل التحليلية الشائعة لدراسة حمض الأبسيسيكABA فى مستخلصات النبات هى أستعمال الطرق المشتركة بين التحليل الكروماتوجرافى الغازى وطريقة المطياف الكتلى Gas Chromatography-mass spectrometry (GC-MS). وأساس هذه الطريقة هو فصل مكونات العينة إلى ذروات كروماتوجرافية Chromatographic peaks والتى يمكن تقديرها والتحقق منها مباشرة من خلال أطيافها الكتلية mass spectra والطيف الكتلى لمركب ما mass spectrum يعتمد على أن الجزيئات أو الأجزاء المشحونة fragments (أى ذوات الشحنة) تكون من الخصائص التشخيصية لتركيب المركب.

طرق تنقية ABA.

توجد طرق عديدة لتنقية ABA ولكن أفضل هذه الطرق هى عزل الهورمون بواسطة thin layer chromatography .

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

علاقة حامض الأبسيسيك بالبروتين و RNA

بعد كسر طور كمون البذور يحدث الأنبات، وفى فصل الربيع حيث يتوفر الماء ودرجة الحرارة المعتدلة والأكسجين يزداد نشاط التحول الغذائى. عند إضافة الماء إلى بذور كامنة جافة فإن تخلق البروتين يبدأ فى الجنين فى مدى ربع ساعة.يحدث أيضاً تخليق وتكوين mRNA لتكوين البروتين، ولكن فى 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 فى الجنين أثناء فترات الجفاف أو البرودة أى فى الشتاء ولذلك ينشط بسرعة كبيرة عند نقع البذور فى 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 وisocitratase فى حالة بذور القطن. وبالطبع فإن هذه الأنزيمات تساعد فى عملية الهدم وتحليل البروتينات. وجد فى حالة القطن أنه أثناء فترات تكوين الجنين وفى المراحل الأولى والوسطية من نمو الجنين أى أن درجة نمو الجنين ٦٠٪ يتم أستهلاك وأستعمال mRNA المتكون أما فى 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.

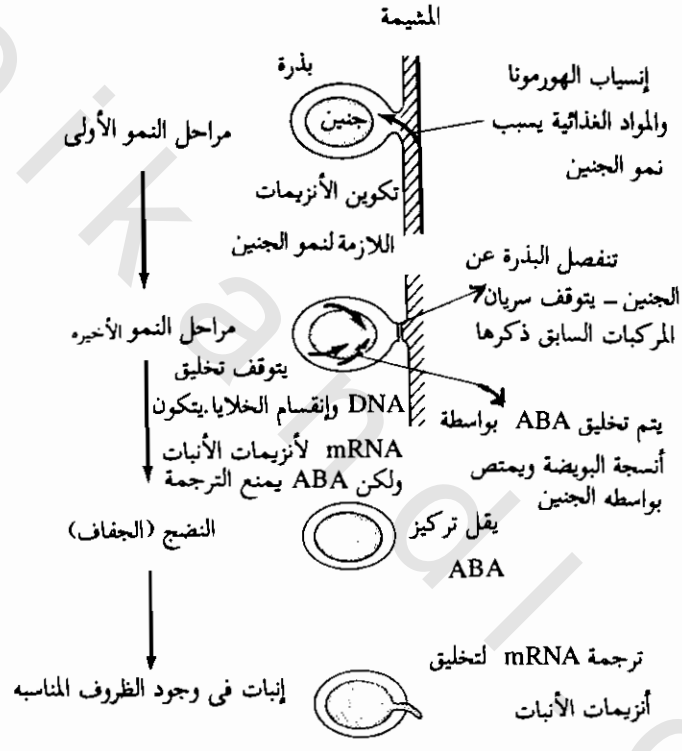
نتيجة لذلك قد يتطرق إلى الذهن سؤال هام هو كيف يحدث تغيير أثناء نمو جنين بذرة القطن فى mRNA حيث يستهلك جميعه فى المراحل الأولى من نمو الجنين وفى المراحل المتأخرة من نمو الجنين يختزن بعض منه. وماهو الذى يمنع mRNA من الإستهلاك والإستعمال المباشر ويصبح غير قابل للأختزان وغير قابل للإستعمال فى المراحل الأخيرة من نمو الجنين. أحد المداخل لتفسير ذلك هو أن الماء يغسل ويزيل عملية التثبيط فى ترجمة 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. تحتوى البذور الناضجة للقطن على ABA وبالتالى يسبب تثبيط عملية الترجمة على mRNA وبالتالى يثبط تكوين الأنزيمات وبالتالى 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 يتنقل 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. وففى 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 يسبب إنقسام الخلايا فى البويضة وينشط عملية نسخ mRNA من DNA ويعتقد أن هذا المركب هو السيتوكينين. بعد إنفصال الأنسجة الوعائية للبويضة عن الثمرة يتوقف إنسياب المركب الأخير ويتوقف إنقسام الخلايا كما يتوقف تخليق DNA نسبيا وينشط تكوين ABA ويتم نسخ mRNA من DNA ولكن تتوقف عملية الترجمة أى ترجمة mRNA إلى بروتينات ومنهَا الأنزيمات.يتوقف تخليق ABA ويقل تركيزه تدريجيا 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 يسبب نشاط mRNA الساكن وتتم عملية الترجمة لتخليق البروتين ومنه الأنزيمات لتحدث 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 وأيضا تثبيط mRNA حيث تتوقف عملية الترجمة.

عادة يزداد تركيز ABA فى الأوراق الهرمه senescing leaves. ولكن محاولات زيادة تركيز ABA فى 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.



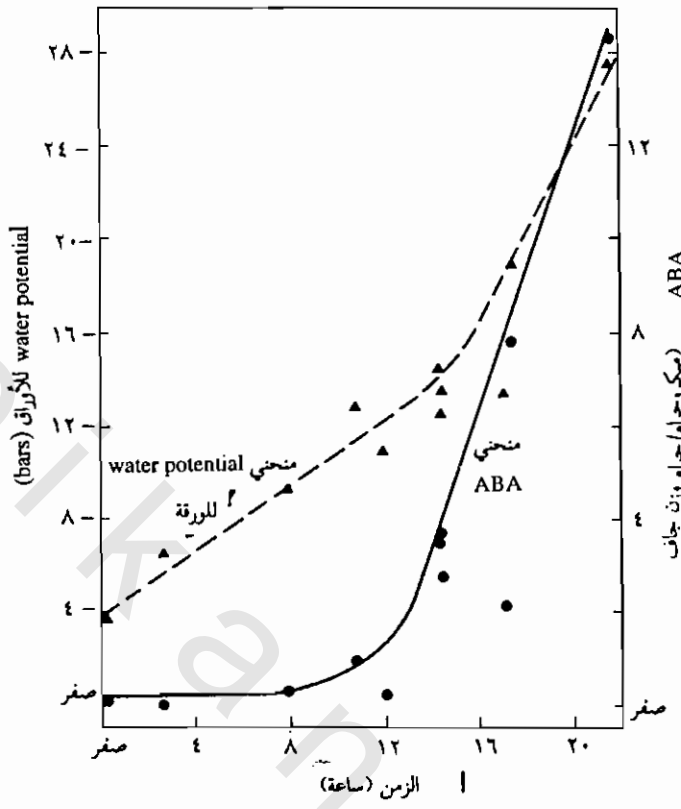
(شكل ١٧٣) : التغيرات فى ميكانيكية تخليق الهورمونات والبروتين أثناء نمو وبلوغ ونضج وإنبات جنين بذرة القطن.

حامض الأبسيسيك وفقد الماء

يمكن وصف حامض الأبسيسيك بأنه stress hormone. يتكون هذا الهورمون نتيجة لأي ظروف غير طبيعية غير ملائمة للنبات ونتيجة لتكون هذا الهورمون 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 الحارسه. يسبب هذا الهورمون 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 وإلي الخلايا الحارسة للنبات.حيث من المعروف أن هذا الهورمون 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 أخري من الضغوط علي النبات نفس التأثير ومثال ذلك إنخفاض درجة الحرارة حيث يسبب تخليق هذا الهورمون غلق الثغور.وفي حالة إضافة الماء للنبات فإن الثغور لا تفتح مباشرة بل تحتاج إلي وقت طويل نسبيا لكي تفتح حيث لابد أن يقل تركيز هذا الهورمون في الخلايا الحارسة. ولذلك فإن الوقت اللازم لفتح الثغور هو عبارة عن الزمن لخفض تركيز الهورمون في الثغور.نتيجة لذلك فإن أيون البوتاسيوم ينتقل إلي الخلايا الحارسة وحيث يزداد تركيزة وتمتص الخلايا الحارسة الماء وتنتفخ فتفتح الثغور ومثال ذلك نبات *Ambrosia trifeda* (شكل ١٧٤).

أما عن التأثيرات الأخري لهذا الهورمون 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 الهورمون 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 إلي حد معين كبير نسبيا.

ميكانيكية عمل حامض الأبسيسيك

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

وجد أن معاملة السيقان وأغماد الريشة بهذا الهورمون تسبب نقص سريع فى سرعة نمو هذه الأجزاء وأما عن ميكانيكية تأثير الهورمون فى حدوث ذلك فإنها غير معروفة.وجد أيضا أن هذا الهورمون 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 الهورمون.

ولذلك فإنه لازال أمامنا الكثير لكى نتعرف على كيفية وميكانيكية تحكم هذا الهورمون فى العمليات الحيوية للنبات.

مركبات شبيهة بحامض الأبسيسيك

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

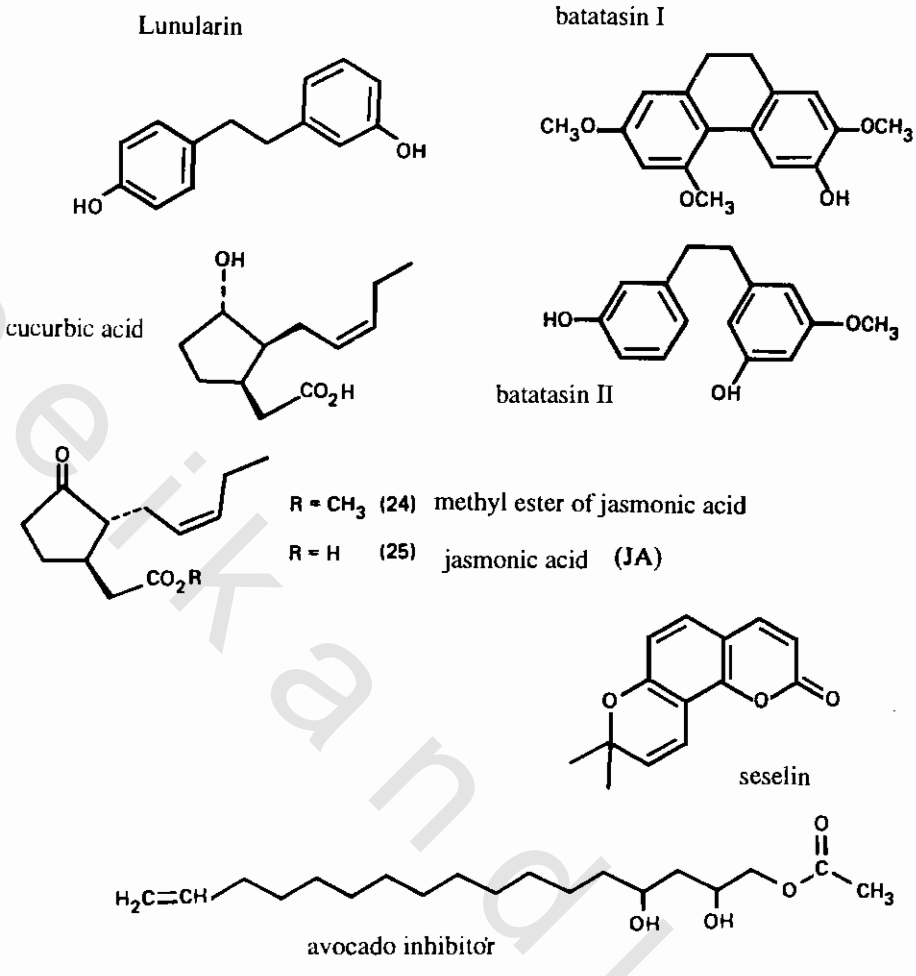
١ ـ حامض ليونيولاريك Lunularic acid :

سبق الحديث عنه (شكل ١٤٨)، يمكن نزع ك أ٢ ليتحول حامض ليونيولاريك بواسطة النبات الحزازى المنبطح *Lunularia cruciata* إلى lunularin (شكل ١٧٥).

٢ ـ مركبات Batatasins :

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

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



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

٣ ـ حامض الجاسمونيك Jasmonic acid:

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

وجد أن Me JA يسبب حدوث الشيخوخة فى 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 فى هذه

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

وجد أنMeJA أكثر نشاطا من ABA فى تحليل أى هدم الكلوروفيل حيث يكون تركيزه حوالى ٠ر٥٠ ملليجرام لكل لتر. وجد أن المركب الطبيعى من MeJA نشط ضوئيا ويكون نوع المشابه (−) بينما التركيبى synthetic MeGA يكون racemic أى خليط من + و ـ بنسبة متساوية . وجد أن درجة نشاط المركب التركيبى تتراوح بين ٠,٢ إلى ٢/١ درجة كفاءة المركب الطبيعى. يعنى ذلك أن المشابه (+) يتداخل ويقلل من كفاءة المشابه الطبيعى (−). 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 cucurbic acid (شكل ١٧٥). وأيضا جلوكوسيد حامض القرعيك 5-0-glucoside cucurbic acid وأيضا أستر ميثيل جلوكوسيد حامض القرعيك 5-0-glucoside methyl ester. أمكن عزل حامض القرعيك من pumpkin *(Cucurbita pepo)* . وجد أيضا أن المركب الأخير هو الأكثر كفاءة فى تثبيط إستطالة غمد الورقة الثانية فى الأرز.

حتى ألآن يحتاج الأمر إلى تجارب كثيرة ليوضح هل المركبات السابقة هورمونات نباتية phytohormones أو أنها سموم.حيث أن تركيز MeJA المحلل للكلوروفيل وهو حوالى ٠,٥٠ 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 حوالى٠,٥ ملليجرام لكل كيلو جرام. يعتبر هذا التركيز أعلى من تركيز الهورمون.

٤ – مثبط الأفوكادو Avocado inhibitor :

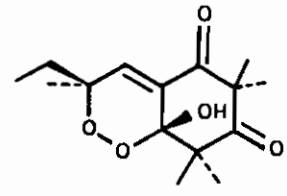
وجد مركب مثبط فى ثمار الأفوكادو يسبب تثبيط إستطالة غمد الريشة للقمح وتثبيط نمو كالس فول الصويا. وجد أن تركيزه يزداد فى الجنين والجدار الثمرى الأوسط mesocarp أثناء إنخفاض درجة نمو الثمار.لم يوجد هذا المثبط فى أى نوع آخر من الثمار (شكل١٧٥).

٥ – مثبطات الكافور *Eucalyptus* inhibtiors :

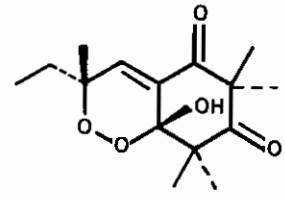
وجد أن مستخلصات أوراق وقلف الكافور *Eucalyptus grandis* تحتوى على مجموعة متشابهة من المركبات والتى تثبط نمو الكافور وعلى وجة الخصوص تمنع عملية التجذير فى العقل (تسمى هذه المركبات المثبطات G أى Ginhibitors) فى النوعين *E.grandis* و *E.glupta* وأيضا الفاصوليا mung beans *(Phaseolus mungo)* حيث وجد أن العقل 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 في 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 وG2 وG3 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.

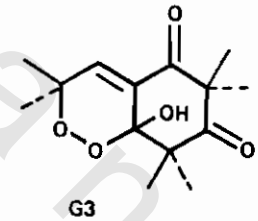
Eucalyptus inhibitors



G1



G2



G3

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

obeikandl.com