

A kén szerepe a növények életében

III. Fluoreszkáló anyagok a kukorica könnyezési nedvében

N. G. POTAPOV és FEJÉR DOMOKOS

Eötvös Loránd Tudományegyetem Növényélettani Intézete, Budapest

Már az első kísérleti vizsgálataink után, amikor metionin és glutation jelenlétét láttuk valószínűnek a kukorica könnyezési nedvében, felmerült a kénanyagcserét irányító, befolyásoló és szabályozó hatású anyagok jelenlétének kérdése is. Természetesen minden előzetes támaszpont nélkül indulván el, bármilyen szerény kvalitatív, bizonyítható adat is pozitívum ezen a téren. Feladatunknak tűztük ki a kén tartalmú vegyületek közül a tiamin jelenléte vagy hiánya megállapítását, továbbá a magában nem kén tartalmú, de a kén tartalmú aminosavak bioszintézisében, továbbá a fehérje-anyagcserében jelentős szerepű B₆-vitamin kimutatását. A biotin identifikálására egyelőre nem terjedtek ki vizsgálataink. Bár növényi objektumon ilyen irányú megfigyelések csak szórványosak, állati szövetek vizsgálatából ismeretes, hogy a B₆-vitamin alakjainak az α -ketosavak, oxiaminósavak és a kén tartalmú aminosavak átalakulásainál — egyéb szerepét nem is említve — jelentős koenzim szerepe van. (Lásd pl. 1.)

A bonyolult összetételű biológiai folyadékban, mint amilyen a növény könnyezési nedve, nem könnyű rendkívül kis mennyiségben jelenlevő vegyületek identifikálása, ezért a papírkromatografiás szétválasztás után specifikus és érzékeny reakciókra, illetőleg fluoreszkáló képességük megfigyelésére dolgoztuk ki módszerünket.

Az identifikált vegyületek mennyiségének ismeretéből és mennyiségüknek a fejlődés fázisai alatt bekövetkező változásai követéséből valószínűleg nagyjelcintőségű és messzemenő következtetéseket vonhatnánk le; mégsem tűzhattük magunk elé az esetleg előforduló vegyületek mennyiségének megállapítását is. A kvantitatív meghatározások előtt álló nehézségek különösen nagyok a fluoreszcencia alapján történő mérések esetén, mert a fluoreszcencia intenzitása a fényforráson és a közeg pH-ján kívül az egyidejűleg jelenlevő közömbös sók fluoreszcenciát kioltó hatásától is függ. Különösen bonyolult a biológiai folyadék vizsgálatánál a fluoreszcenciát oltó hatás kérdése; ahhoz, hogy ezeknek a fluoreszkáló anyagokra gyakorolt hatását pontosan megismerjük és a kvantitatív mérésekben bekövetkező hibákat kiküszöbölhessük, előzetesen beható vizsgálatokra van még szükség. Ezért nem is törekedtünk egyelőre kvantitatív adatok elérésére.

Kísérleti rész

Vizsgálatainkat ugyanazzal az öt alkalommal begyűjtött kukorica könnyezési nedvvel végeztük, mint amelyekről előző közleményünkben [3] beszámoltunk.

A friss könnyezési nedv vizsgálatának kezdeti szakaszán észleltük, hogy a szintelen, víztiszta, teljesen zavarosságmentesnek látszó kukorica könnyezési nedv analitikai kvarclámpa alatt élénken, fakó kék színben fluoreszkál.

Tekintettel arra, hogy most fluoreszkáló származékokat is vizsgáltunk, olyan kromatografiás szűrőpapirost kerestünk, mely maga nem fluoreszkál. A Macherey—Nagel 619. számú papír elég erősen kéken fluoreszkál, de a Schleicher et Schüll 2043/A megfelelőnek mutatkozott.

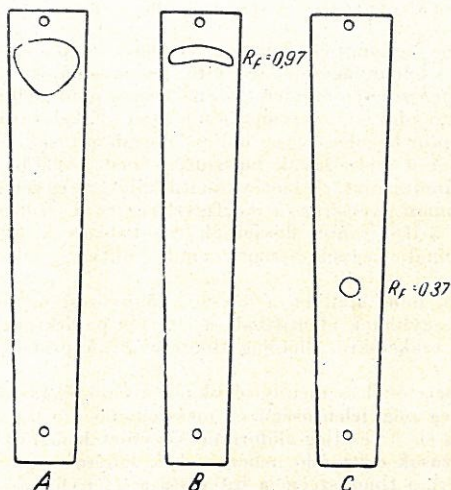
A várható igen kis mennyiségekre való tekintettel a szétválasztást Williams és Kirby [7] módosítása szerint kémcsőbe helyezett papírsáv-kromatografiás módszerrel kellett végeznünk. Ez a módszer a jelenlevő anyagok szétválasztása szempontjából nem olyan előnyös, mint a körkromatografia, viszont sokkal kisebb anyagmennyiséget igényel.

A futtató oldószerek kiválasztása után ezeket is gondosan fluoreszcencia-mentesséig tisztítottuk. A szétválasztáshoz 70%-os etilalkoholt, illetőleg ecetsav: n-butanol : víz (10 : 40 : 50) térfogatszázalékos elegyét használtuk. Sajnos egyik

futtató sem volt teljesen megfelelő céljainknak, az észlelt foltok szétválasztása nem volt tökéletes.

Minden előzetes kezelés, tehát besűrítés, kémiai kezelés, hőkezelés, stb. nélküli 10—10 csepp friss könnyezési nedvet cseppentettünk a kromatografiás papírra oly módon, hogy minden felcseppentés után óvatosan légfördön beszárítottuk az anyagot a papíron. Mintegy 0,5 ml friss könnyezési nedv került ily módon a papírosra.

A futtatást erős fénytől védett fülkében végeztük; ez kb. 2—2,5 órán át tartott, majd sötét szobában szobahőmérsékleten megszárazítottuk a kromatogramokat.



1. ábra

Könnyezési nedv kromatogramok ecetsav: n-butanol: víz (10:40:50) eleggyel futtatás A: analitikai kvarc lámpa alatt zöldeskéken után. fluoreszkáló folt. B: B₆-vitaminra utaló folt helye. C: B₁-vitamint jelző folt.

A borát-puffer Scudi, Bastedo és Webb [5] szerint a B₆-vitaminnal olyan komplexet létesít, mely megakadályozza a 2,6-diklorokinonmonoklórímides színreakciót. Ha tehát mindkét esetben megkapjuk a kék színfoltot, akkor nem B₆-vitamin a folt anyaga, ha azonban a borát-pufferes közegben a színreakció elmarad, akkor B₆-vitamin valamelyik formájára következtethetünk. Minthogy Heyl és munkatársai [2] szerint a B₆-vitamin foszforsav-származékai nem adják a 2,6-diklorokinonmonoklórímides színreakciót, valószínűleg nem foszforilált származékában fordul elő a B₆-vitamin a kukorica könnyezési nedvében. Ezzel a technikával mindhárom begyűjtésű könnyezési nedvből sikerült a B₆-vitamint, illetőleg egyelőre identifikálatlan származékát kimutatni. (1. ábra.)

Ezt az észlelésünket némileg megerősítik a friss könnyezési nedv spektrofotométeres vizsgálata, melyet Molnárné [4] végzett és melyek minden esetben mutattak 324—326 m μ -nál inflexiót. Természetesen a bonyolult összetételű könnyezési nedv spektrofotométeres vizsgálata egymagában nem tekinthető döntőnek.

A kezelés előtt kékeszöld színű fluoreszkáló foltot azonban nem találtuk egysegesnek. Ezen a folton belül mutatkozott a B₆-vitamin reakcióját adó anyag is,

A megszárazított kromatogramokat Hanau-i analitikai kvarclámpa alatt megvizsgáltuk és a fluoreszkáló foltokat grafit-ceruzával körülrajzoltuk. Ekkor, tehát előzetes kezelés nélkül, kékeszöld színben fluoreszkáló, kissé megnyúlt, szabálytalan alakú foltot láttunk közvetlenül a frontvonal alatt (1. l. ábra A.).

Az ily módon előállított kromatogramok egy sorozatát B₆-vitamin jelenlétére vizsgáltuk Scudi, Koones és Keresztessy [6] módszerével, a 2,6-diklorokinon-monoklórímid butilalkoholos oldatával. Nátriumhidrokarbonáttal gyengén lúgosított közegben ezzel a reagenssel a B₆-vitamin egyes származékai kék színű vegyületet képeznek. Ez a színreakció azonban nem specifikus a B₆-vitaminszármazékokra, a polifenolok is adják. Specifikussága nagyrészt növelhető azáltal, hogy a reakciót egyszer nátriumhidrokarbonátos, másszor pedig borátpuffer jelenlétében végezzük.

de a folt más alkotórészeket is tartalmaz. Ezt a másik alkotórészt nem sikerült identifikálnunk; a rendelkezésre álló anyag kevés volt hozzá. Eddig végzett előzetes vizsgálataink szerint valószínű, hogy valamely telítetlen laktón vagy ennek valamilyen származékáról van itt szó.

A megszártott kromatogrammok egy másik sorozatát tiamin jelenlétére vizsgáltuk. A vizsgálathoz 2%-os nátriumhidroxiddal előzetesen bepermetezett, majd még nedvesen 0,5%-os káliumferricianid-oldattal kezelt kromatogramokat használtunk. Ez a kezelés az esetleg jelenlevő tiamint tiokrómmá, egy intenzív kék színben fluoreszkáló vegyületté alakítja. Ezzel a technikával csak az első begyűjtésű, tehát még a vegetatív fázisban levő kukorica könnyezési nedvéből sikerült tiaminra utaló kék színben fluoreszkáló foltot kapnunk. (1. ábra C.) A másik két könnyezési nedv-mintából még a legkisebb tiamin-nyomokat sem sikerült megállapítanunk.

A vizsgálat eredményeinek megtárgyalása

Vizsgálataink eddig elért, előzetes eredményei a kukorica könnyezési nedvében a B₆-vitamin közelebről nem identifikált alakban való előfordulását, a tiaminnak a vegetatív fázisban levő kukorica könnyezési nedvében való jelenlétét bizonyítják; egyelőre meg nem határozott, fluoreszkáló származékot is kimutattunk.

Ezek az anyagok nyilvánvalóan a gyökérben szintetizálódtak és onnan áramlottak a könnyezési nedv útján a növény felső szerveibe. Jelentőségükre és szerepükre vonatkozóan csak akkor vonhatunk le messzebbmenő következtetéseket, ha a B₆-vitamin előforduló alakjának és a telítetlen laktónnak tekintett származékának identifikálása sikerült.

Már most is megállapíthatjuk azonban, hogy a gyökér szintetikus működésére vonatkozó ismereteink bővültek vizsgálataink eredményeképpen.

Vizsgálatainkat a Magyar Tudományos Akadémia Agrártudományok osztálya anyagi támogatása tette lehetővé, amiért ezen a helyen is köszönetünket fejezzük ki.

Összefoglalás

A friss könnyezési nedv kromatografálásával (Schleicher et Schüll 2043/A ecetsav:n-butanol:víz 10 : 40 : 50 tf. arányú elegye) a frontvonal alatt közvetlenül, kékeszöld színben fluoreszkáló, szabálytalan alakú folt jelentkezik. A folt egyik alkotórésze 2,6-diklorlorkinon-monoklorimid butanolos oldatával gyengén alkalikus közegben kék színt adott, míg ez a kék színeződés borát-puffer jelenlétében elmaradt. Ebből az U. V. spektrofotométerrel észlelt 324–326 m μ -nál mutatózó maximumból B₆-vitamin valamelyik származéka jelenlétét állapítják meg. A kromatogramok egy másik sorozatát lúgos közegben káliumferricianiddal oxidáltuk. A vegetatív fejlődési szakaszban levő kukorica könnyezési nedvében ily módon kék színnel fluoreszkáló, tiokrómnak tartható folt tűnt elő.

A frontvonal alatt jelentkező, kezelés nélkül kékeszöld színben fluoreszkáló származék identifikálása még nem történt meg, kumarin származéknak látszik.

Érkezett : 1955. március 1.

Irodalom

- [1] Braunstejn, A. Je. : Úszp. szovr. biol. **35**. 27. 1953.
- [2] Heyl, D., Luz R., Harris, St. A. & Folkers, K. : J. Amer. Chem. Soc. **73**. 3434. 1951.
- [3] Potapov, N. G. & Fejér D. : Agrokémia és Talajtan **5**. 47. 1956.

- [4] Potapov, N. G. & Molnár-Keresztes I.: Acta Botanica Hung. 2. 171. 1955.
 [5] Scudi, J. V., Bastedo, W. A. & Webb, T. J.: J. Biol. Chem. 136. 399. 1940.
 [6] Scudi, J. V., Koones, H. F. & Keresztesy J. C.: Proc. Soc. for Exp. Biol. and Medicine. 43. 118. 1940.
 [7] Williams, R. J. & Kirby, H. M.: Science. 107. 481. 1948.

РОЛЬ СЕРЫ В ЖИЗНИ РАСТЕНИЙ III. ФЛЮОРЕСЦИРУЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА В ПАСОКЕ КУКУРУЗЫ

Н. Г. Потапов и Д. Фейер

Кафедра физиологии растений Университета им. Л. Этвеша, Будапешт (Венгрия)

Резюме

При хроматографировании свежей пасоки [(бумага марки Schleicher-Schüll 2043A, растворитель: смесь уксусной кислоты-бутанола-воды (10:40:50)], непосредственно под линией фронта растворителя обнаруживается флюоресцирующее синезеленым цветом пятно неправильной формы. После обработки хроматограммы бутилово-спиртовым раствором 2,6-дихлор-хинон-монохлоримида в слабо щелочной среде, часть этого пятна окрашивалась в синий цвет, но в присутствии боратного буфера эта окраска отсутствовала. Из этих фактов, а также на основании максимума поглощения света в ультрафиолетовом диапазоне спектрофотометра при 324–326 мμ, установлено наличие некоторого производного витамина B₆.

Часть хроматограмм окислялась раствором железосинеродистого калия в щелочной среде. После такой обработки пасоки кукурузы в вегетативной фазе давала пятно, флюоресцирующее яркосиним цветом, характерным для тиохрома.

Идентификация второй части появляющегося под линией фронта пятна, флюоресцирующего без предварительной обработки синезеленым цветом, пока не проведена; имеются основания считать, что это вещество является производным кумарина.

Рисунок 1.: Хроматограммы пасоки кукурузы [растворитель: уксусная кислота-н-бутанол-вода (10:40:40)]. А) Пятно, флюоресцирующее под аналитической кварцевой лампой синезеленым цветом; В) Пятно витамина B₆; С) Пятно витамина B₁.

Sulphur in the Life of Plants

III. Fluorescent Substances in the Bleeding Sap of Maize

N. G. POTAPOV and D. FEJÉR

Institute for Plant Physiology, L. Eötvös University, Budapest (Hungary)

Summary

In chromatographing fresh bleeding sap (Schleicher & Schüll 2043 A; acetic acid: n-butanol water 10:40:50) a bluish-green fluorescent spot in irregular shape appears immediately below the frontline. One of the ingredients of the spot yielded a blue colour in a slightly alkaline medium with 2,6-dichloroquinone-monochlorimide, but this blue discolouration failed to show in the presence of a borate buffer. From this, and from the maximum at 324–324 mμ observed with the UV spectrophotometer, authors infer the presence of one of the derivatives of vitamin B₆. Another series of chromatograms was oxidised in an alkaline medium with potassium ferricyanide, whereupon in the bleeding sap of the maize in the vegetative phase of development there appeared a blue fluorescent spot, probably identifiable as thiochrome.

The derivative appearing below the frontline and, if untreated, giving a bluish-green fluorescence, has not as yet been identified; it looks as if it were a coumarin derivative.

Fig. 1.: One dimensional chromatograms of the bleeding sap of maize, developed with acetic acid: n-butanol: water (10:40:50) A) greenish-blue fluorescent spot under U. V. lamp, B) spot indicate to Vitamin B₆ C) spot indicate to Vitamin B₁.