

УДК 543.544.45:543.51:547.9

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГИББЕРЕЛЛИНОВ В ГИББЕРЕЛЛИНЕ КРИСТАЛЛИЧЕСКОМ И ИХ АКТИВНОСТЬ В БИОТЕСТАХ

П. Б. КУРАПОВ, И. К. БЛИНОВСКИЙ, Б. Е. БУМАЖНЫЙ,
И. В. СКОРОБОГАТОВА, Е. И. САЛЬНИКОВА

(Лаборатория регуляторов роста и развития с.-х. растений)

Методами ГЖХ-МС и ВЭЖХ в гиббереллине кристаллическом идентифицирован ряд изомерных гиббереллинов; i — A_9 , A_9 , i — A_{14} , i' — A_{14} , i'' — A_{14} , A_{14} , A_{20} , i — A_4 , A_7 , A_{13} , i — A_{13} , A_{16} , i' — A_3 , i — A_3 , A_3 , A_1 , A_{42} . Изучена их биологическая активность в биотестах на гипокотылях салата и огурца.

В настоящее время для увеличения урожайности бессемянных сортов винограда и получения 2-го урожая картофеля применяются препараты гиббереллин кристаллический 80 %, гибберсиб и гибберсиб 1. Однако их качественный и количественный составы, которые могут изменяться от партии к партии, изучены недостаточно [4, 5]. В связи с этим нами исследовался состав промышленного препарата гиббереллина кристаллического 80 % с использованием методов ВЭЖХ и ГХ-МС и оценивалась активность различных гиббереллинов и их изомеров с помощью биотестирования на салате и огурце.

Известно, что различные биотесты отзывчивы на разные гиббереллины [1, 2], что обусловлено

специфическим метаболизмом (или гормональным статусом) гиббереллинов в растениях разных систематических групп. Данные об активности гиббереллинов при использовании различных биотест-систем приведены в работах [2, 3, 6].

Биологическая активность изомеров гиббереллинов ранее не изучалась. Исключение составил лишь изомер i — A_3 , который почти так же активен, как и A_3 на карликовом рисе при низких концентрациях, но его активность в 2 раза меньше, чем A_3 при более высоких концентрациях [8].

Нами с помощью ВЭЖХ и ГХ-МС определялось процентное содержание гиббереллинов в гиббереллине кристаллическом 80 %. Содержание гиббереллиноподобных веществ

(ГПВ) в нем составляло 34,9 %, а различных гибберелиновых кислот (ГК) — 65,1 % (табл. 1).

Без предварительного разделения препарата была получена масс-хроматограмма, на которой идентифицирован ряд гибберелинов (рис. 1). Используя комбинацию методов ВЭЖХ и хромато-масс-спектрометрию триметилсилильных производных метиловых эфиров ГК, нам удалось разделить изомеры гибберелинов с одинаковым или очень близким временем удерживания (Rt). Так, для A₃ было выделено 3 изомера — по 2 изомера A₄, A₉ и изомер A₁₃, для A₁₄ — 4 изомера, которые имеют практически одинаковое время удерживания, но выходят в разных фракциях при использовании ВЭЖХ.

Полученный нами порядок выхода гибберелинов соответствует литературным данным (ГЖХ с исполь-

зованием аналогичной капиллярной колонки).

Из гибберелина кристаллического также выделен гиббереллин A₂₀, который описан в литературе как растительный гиббереллин, однако ранее он был обнаружен в культуральной жидкости *Gibberella fujikuroi* [5]. Идентичность полученного масс-спектра и приведенного в работе [5] подтверждает наличие в гибберелине кристаллическом гибберелина A₂₀, который представляет собой продукт жизнедеятельности гриба.

Необходимо также отметить, что изомеры гибберелинов, вероятнее всего, являются продуктом гриба, а не артефактом, поскольку при получении, хранении и проведении анализа условия для изомеризации гибберелинов отсутствуют. На трехмерной хроматограмме ВЭЖХ-ГЖХ-МС (рис. 2) видно, что инди-

Таблица 1

Время удерживания (Rt) триметилсилильных производных метиловых эфиров и содержание гибберелинов и ГПВ в гибберелине кристаллическом 80 %

ТМС-Ме-ГК	Номер фракции ВЭЖХ	Rt, мин		Содержание гибберелинов, %	
		наши данные	данные работы [7]	в смеси ГПВ	относительное
i—A ₉	8	13,17		Сл.	Сл.
A ₉	13	13,44	4,8	0,3	0,4
i—A ₁₄	8	15,09		Сл.	Сл.
i'—A ₁₄	12, 13	15,11		0,2	0,2
i''—A ₁₄	8	15,38		Сл.	0,1
A ₁₄	12	15,44	8,1	0,2	0,3
A ₂₀	10	15,35	8,1	0,1	0,1
i—A ₄	8, 9	15,58	8,7	0,1	0,1
A ₄	12, 13	15,59		1,7	2,6
A ₇	12 — 14	16,17		0,4	0,6
A ₁₃	8—11	16,44	11,4	2,5	3,9
i—A ₁₃	8	17,29		0,3	0,4
A ₁₆	10, 11	17,25	13,4	0,9	1,4
i'—A ₃	4—9	18,08		20,0	30,7
i—A ₃	4—10	18,50		14,3	21,9
A ₃	4, 5	18,58	16,5	10,6	16,2
A ₁	4—12	18,30	14,9	13,5	20,7
A ₄₂	9	19,01	17,7	Сл.	Сл.

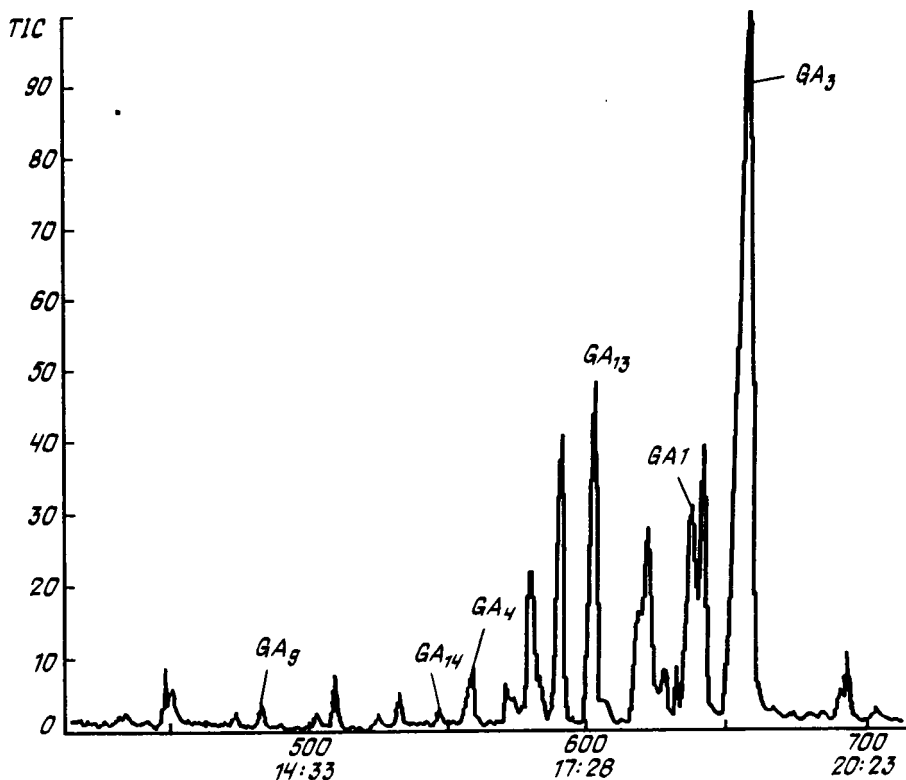


Рис. 1. Масс-хроматограмма триметилсилильных производных метиловых эфиров гиббереллинов гиббереллина кристаллического 80 %

видуальные гиббереллины в ВЭЖХ выходят не в одной, а в нескольких фракциях. Это прежде всего относится к гиббереллинам А₃, i—А₃ и А₁, содержание которых в препарате достаточно большое.

Нами проведено биотестирование на гиббереллиновую активность фракций, полученных после разделения препарата методом ВЭЖХ на двух объектах: гипокотили огурца и гипокотили салата.

Из данных, представленных на рис. 3, видно, что биотесты поразному реагируют на присутствующую

во фракциях гиббереллины. Это свидетельствует о разном гормональном статусе Chenopodiaceae (салат) и Cucurbitaceae (огурец).

Из-за высокой избирательности биотеста на гипокотили огурца гиббереллиновая активность проявляется только в 5, 11, 12 и 13-й фракциях. Причем наибольший эффект удлинения гипокотилей (152 и 106 %) наблюдается в 12-й и 13-й фракциях, содержащих гиббереллины А₄, А₇ и А₉, тогда как в 5-й фракции, несмотря на наличие 75 % препарата, активность со-

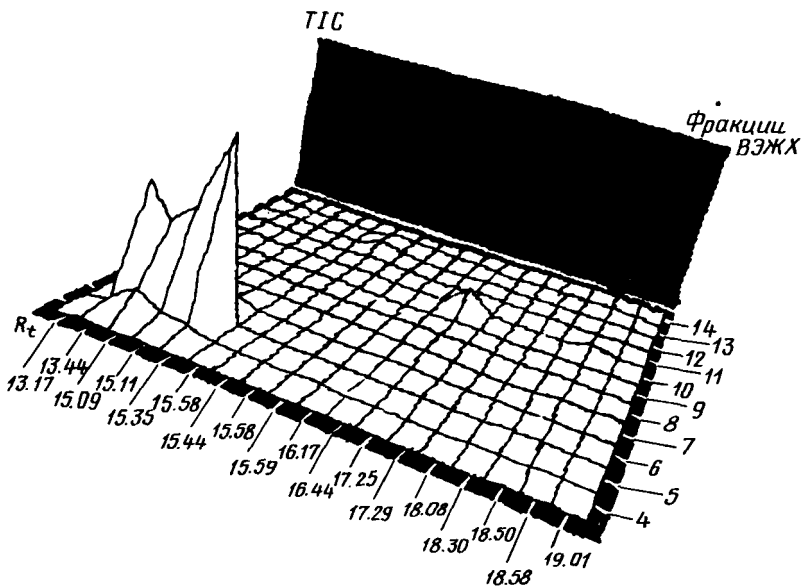


Рис. 2. Трехмерная хроматограмма фракций ВЭЖХ-ГЖХ-МС гиббереллина кристаллического 80 %.

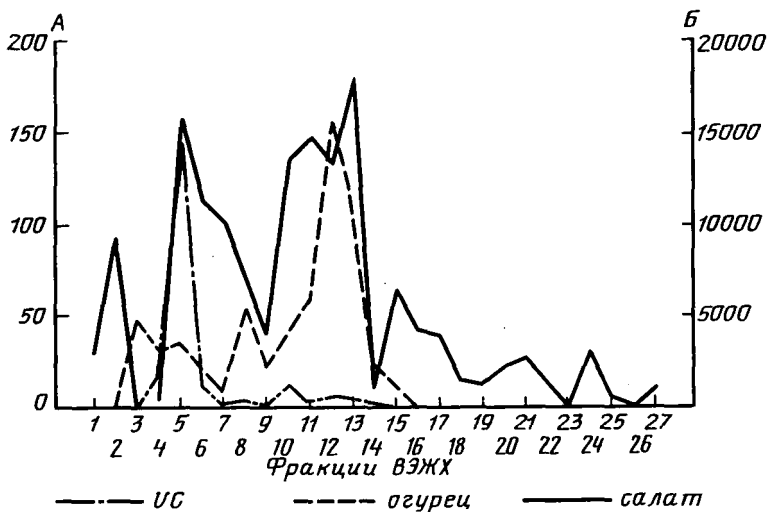


Рис. 3. Зависимость между активностью фракции (А) гиббереллина кристаллического 80 % в биотестах и содержанием ГК (Б) (данные ГЖХ-МС).

ставляет всего 34 %. Это может быть связано как с низкой отзывчивостью огурца на A_3 и A_1 , так и с высокой концентрацией препарата, поскольку зависимость доза — эффект биотеста для гиббереллинов имеет S-образный характер. Кроме того, по мере увеличения концентрации препарата биологический ответ возрастает нелинейно.

Салат в отличие от огурца реагирует на более широкий спектр гиббереллинов, с чем связано проявление активности у большего числа фракций.

В 4—7-й фракциях содержатся одни и те же гиббереллины, но количество их разное. В этом случае прослеживается четкая зависимость доза — эффект. Наибольший эффект (157 % активности) наблюдается у 5-й фракции, где содержится 75 % гиббереллинов, активных применительно к салату, таких, как A_3 , A_1 и $i-A_3$. Активность следующих фракций постепенно снижается (до 9-й фракции). Несмотря на то что в 8-й и 9-й фракциях появляются такие гиббереллины, как A_{13} , $i-A_{13}$, A_{20} , $i-A_4$, $i-A_9$, $i-A_{14}$, $i'-A_{14}$, их активность в биотесте снижается. Это может быть связано с отсутствием биологической активности указанных гиббереллинов в данном биотесте. Активность возрастает в 11-й фракции, что обусловлено возросшим количеством A_{13} и появлением A_{16} и A_{20} . Активность, проявляемая в 12-й и 13-й фракциях, объясняется присутствием A_4 , A_7 , A_{14} , $i-A_{14}$ и A_9 , причем разница в активности (соответственно 132 и 180 %) может быть объяснена наличием активного A_9 только в 13-й фракции.

Таким образом, из всего изложенного выше можно сделать следующие выводы:

1) методом ВЭЖХ удастся разделить такие изомеры гибберелли-

нов, как A_4 и $i-A_4$; A_9 и $i-A_9$; $i'-A_{14}$, A_{14} и $i-A_{14}$, $i''-A_{14}$;

2) сочетание методов ГЖХ-МС позволило идентифицировать в гиббереллине кристаллическом, выделяемом из культуральной жидкости *Gibberella fujikuroi*, гиббереллин A_{20} , ранее относимый к растительным гиббереллинам;

3) использование биотестирования показало, что на огурце наиболее активны гиббереллины A_4 , A_7 , A_9 , наименее — A_3 ; салат реагирует на все гиббереллины, кроме A_{12} , $i-A_{13}$, $i-A_{14}$, $i''-A_{14}$;

4) содержание гиббереллина A_3 и его изомеров в препарате составляет 44,9 %, A_1 — 13,5, A_4 — 1,7, A_{13} — 2,5, A_{16} — 0,9 %, остальные гиббереллины обнаружены в следовых количествах.

Экспериментальная часть

Контроль гиббереллиновой активности. Биотестирование. Биологическую активность гиббереллинов определяют по интенсивности роста гипокотилей огурца (модификация Г. С. Муромцева и В. Н. Агнестиковой [3]). Нами был использован огурец сорта Вязниковский, который отличается довольно высокой чувствительностью к гиббереллинам. Семена огурца проращивали в кюветах на влажной фильтровальной бумаге при температуре 25 °С. Проросшие семена с длиной корешка 7—10 мм через 72 ч отбирали для постановки биотеста. Проросшие семена освобождали от семенной оболочки и раскладывали в чашки Петри на 0,75 % агар и наносили по 5 мкл испытуемого ацетонитрильного раствора. Контролем служили проростки, обработанные 5 мкл ацетонитрила. Проростки огурца выращивали при непрерывном освещении, 100 % влажности и температуре

25 °С в течение 72 ч. Замеры гипокотилей огурца проводили с точностью до 1 мм.

Интенсивность роста гипокотилей салата определяли по методу Фрэнкленда и Уоринга. Использовали салат сорта Московский парниковый. Этот сорт довольно чувствителен к гиббереллинам. Семена салата также проращивали в кюветах на влажной фильтровальной бумаге при температуре 25 °С. Проросшие семена с длиной корешка 4—5 мм через 36 ч отбирали для постановки биотеста. Проросшие семена раскладывали по 10 шт. в стаканы (объем раствора 10 мл), контроль — дистиллированная вода. Проростки салата выращивали при непрерывном освещении 72 ч и температуре 28 °С. Гипокотили салата до листочков измеряли с точностью до 1 мм. Результаты биопроб хроматографических фракций представлены на рис. 3.

В Э Ж Х. Сухой остаток растворяли в 3 мл начальной подвижной фазы и по 1 мл раствора вводили в инжектор жидкостного хромато-

графа фирмы Biotronik. В качестве неподвижной фазы использовали Lichrosorb ODC 18 той же фирмы (10 мкм). Хроматографирование проводили на препаративной колонке 12,5×0,8 см в градиентном режиме: в резервуар с начальной подвижной фазой (40 мл H₂O+10 мл ацетонитрила + 0,25 мл уксусной кислоты) через 10 мин после начала анализа подавали смесь (2 мл/мин) ацетонитрила и уксусной кислоты (100 мл+0,5 мл). Скорость подачи подвижной фазы 2 мл/мин. Фракции на выходе из колонки отбирали каждые 2 мин, всего собрано 27 фракций по 4 мл. Одинаковые по времени выхода фракции объединяли и по 2 мл от каждой фракции подвергали биотестированию.

Фракции, в которых присутствуют гиббереллины, упаривали досуха и обрабатывали раствором диазометана в сухом эфире, эфир упаривали и обработку повторяли дважды. Полученные таким образом метилловые эфиры обрабатывали силилирующим агентом (0,1 мл раствора

Таблица 2

Масс-спектры метиловых эфиров триметилсилильных производных гиббереллинов

Me-TMC-ГК	m/z (I, %)
i — A ₉	330 (11), 298 (100), 270 (66), 243 (45), 227 (65), 226 (56)
A ₉	330 (18), 298 (100), 270 (80), 243 (50), 227 (64), 226 (73)
i — A ₁₄	448 (23), 433 (9), 416 (100), 401 (8), 388 (6), 298 (13), 287 (37)
i' — A ₁₄	448 (32), 433 (9), 416 (100), 401 (9), 388 (8), 298 (11), 287 (30)
i'' — A ₁₄	448 (8), 433 (23), 416 (100), 401 (5), 388 (58), 298 (94), 287 (86)
A ₁₄	448 (9), 433 (22), 416 (100), 401 (5), 388 (43), 298 (62), 287 (59)
A ₂₀	418 (100), 403 (10), 375 (25), 359 (6), 301 (13)
i — A ₄	418 (36), 289 (42), 284 (100), 225 (64), 224 (60)
A ₄	418 (58), 289 (47), 284 (100), 225 (51), 224 (53)
A ₇	416 (53), 384 (10), 356 (12), 223 (58), 222 (100)
A ₁₃	492 (12), 477 (28), 460 (55), 436 (58), 400 (100), 310 (62), 282 (55)
i — A ₁₃	492 (13), 477 (28), 460 (56), 436 (52), 400 (100), 310 (52), 282 (43)
A ₁₆	506 (44), 416 (16), 390 (100), 375 (23), 360 (25), 340 (14), 300 (17)
i' — A ₃	504 (100), 489 (9), 370 (8), 347 (5), 208 (7)
i — A ₃	504 (100), 489 (9), 370 (13), 347 (9), 208 (23)
A ₃	504 (100), 489 (9), 370 (11), 347 (8), 208 (8)
A ₁	506 (100), 491 (10), 448 (16), 377 (10), 313 (7), 207 (18)
A ₄₂	523 (45), 416 (18), 376 (100), 297 (44), 259 (31)

BSTFA в ацетонитриле). Объем пробы 40 мкл.

ГХ-МС. 25 мкл полученного раствора вводили в инжектор хромато-масс-спектрометра (KRATOS MS-25-RFA). Режим работы масс-спектрометра стандартный: ионизирующее напряжение — 50 эВ, ток эмиссии катода — 400 мкА, ускоряющее напряжение — 4 кВ, температура источника — 250 °С. Хроматографирование проводили на капиллярной колонке CP — SIL 8 CB 25 м, вн. d=0,32 мм. Программа температур: 120 °С→10 град/мин→210 °С (1 мин)→5 град/мин→250 °С (5 мин)→45 град/мин→270 °С. Температура инжектора — 220 °С, газ-носитель — He.

Масс-спектры метиловых эфиров триметилсилильных производных гиббереллинов приведены в табл. 2.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Агнестикова В. Н.* Определение гибберелловой кислоты по ростовой реакции проростков.— В кн.: Методы

определения регуляторов роста и гербицидов.— М.: Наука, 1966, с. 93—99.— 2. *Муромцев Г. С., Агнестикова В. Н.* Гиббереллины.— М.: Наука, 1973.— 3. *Муромцев Г. С., Агнестикова В. Н.* Зависимость физиологической активности гиббереллинов от структуры молекул.— С.-х. биология, 1966, т. 1, № 2, с. 260—264.— 4. *Серебряков Э. П., Суслова Л. М., Богданова И. А., Розынов Б. В.* Применение капиллярной газожидкостной хроматографии и капиллярной ГЖХ-масс-спектрометрии для анализа продуктов микробиологического производства гиббереллинов.— Изв. АН СССР, сер. хим., 1984, № 5, с. 1061—1068.— 5. *Суслова Л. М., Серебряков Э. П.* Газожидкостная хроматография гиббереллинов на стеклянных капиллярных колонках.— Изв. АН СССР, сер. хим., 1981, № 3, с. 807—810.— 6. *Bowen D. H., Crozier A., MacMillan J., Reid D. M.*— *Phytochemistry*, 1973, vol. 12, N 12, p. 2935—2941.— 7. *Crozier A., Durley R. C.*— *The biochem. a physiol. of gibberellins*, 1983, vol. 1, p. 568.— 8. *Moore P. H., Pharis R. P., Koshioka M.*— *Plant Growth Regulation*, 1986, vol. 4, p. 101—109.

Статья поступила 10 декабря 1989 г.

SUMMARY

Gibberellins from «Gibberellin cristallichesky» were studied on lattuce and cucumber using combined methods of HPLC, gas chromatography-mass spectrometry (GO-MS) and bioassay. We identified in «Gibberellin cristallichesky» a number of gibberellins and their isomers (i — A₉, A₉, i — A₁₄, i' — A₁₄, A₁₄, A₂₀, i — A₄, A₄, A₇, A₁₃, i — A₁₃, A₁₆, i' — A₃, i — A₃, A₃, A₁, A₄₂). The activity of these gibberellins has been studied in bioassay.