

ANDRZEJ REJOWSKI, STANISŁAW GRZESIUK

*Katedra Fizjologii Roślin WSR w Olsztynie*NATURALNE INHIBITORY WZROSTU  
I ICH ROLA W ŻYCIU ROŚLIN WYŻSZYCH*Wstęp*

W świecie roślin wyższych dość powszechnie występuje zjawisko okresowego hamowania wzrostu całych organizmów lub ich poszczególnych organów (np. nasiona wewnątrz owoców mięsistych, niektóre nasiona w stanie spoczynku, pąki śpiące u drzew, krzewów, bulw itp.). W końcu XIX w. wysunięto po raz pierwszy myśl (por. Mayer, Poljakoff — Mayber, 1963), że kiełkowaniu niektórych nasion (np. *Viscum*) wewnątrz owoców zapobiegają specjalne substancje — inhibitory. Myśl tę następnie rozwinął w formie ogólnej hipotezy Molisch (1922). Opierał on swoje wnioski o liczne obserwacje prowadzone przez siebie i innych autorów nad auksynami, których działanie było często maskowane lub znoszone przez bliżej nieznanne substancje.

Nowy okres w badaniach inhibitorów wzrostu zapoczątkował w 1922 r. Oppenheimer (wg Mayera i Poljakoff-Mayber, 1963). Okres ten trwał do lat czterdziestych naszego stulecia, a cechowała go znaczna niedokładność metodyczna w prowadzonych poszukiwaniach. Naturalnych inhibitorów szukano w organach roślinnych, określając aktywność tych inhibitorów za pomocą testów biologicznych w surowych wyciągach, lub po prostu w soku roślinnym. W takich warunkach na obiekt testowy wywierały wpływ zarówno stymulatory jak i inhibitory; ponadto działały nań także drobnoustroje (rozwijające się na dobrej pożywce) oraz inhibicja osmotyczna. Wnioski wysnute z tego rodzaju prac były więc obarczone dużym błędem.

W 1947 r. Akkerman i Veldstra (por. Mayer, Poljakoff-Mayber, 1963) wykazali, że czynnikami chemicznymi hamującymi kiełkowanie nasion pomidorów wewnątrz owoców są kwas kawowy i ferulowy. W późniejszych latach stwierdzono dodatkowo, że zahamowanie kiełkowania nasion wewnątrz owoców wywołane jest nie tylko inhibicją chemiczną, lecz również osmotyczną, tj. dużym stężeniem substancji osmotycznie czynnych w tkankach otaczających nasiona.

W 1949 r. Hemberg (wg Wareinga i in. 1964) wysunął hipotezę głoszącą, że spoczynek pewnych nasion, podobnie jak spoczynek bulw i pąków roślin drzewiastych, uwarunkowany jest działaniem inhibitorów. Podstawą tej hipotezy było

stwierdzenie dużej korelacji pomiędzy okresami spoczynku i zawartością endogen-nych inhibitorów w organach spoczynkowych.

Duży postęp w badaniach mechanizmu spoczynku roślin i ich organów uczyniło wprowadzenie do laboratoriów nowej techniki analitycznej (chromatografii bibułowej, cienkowarstwowej i kolumnowej). Dzięki chromatografii stało się możliwe oddzielenie inhibitorów od stymulatorów wzrostu i innych związków wymywanych z roślin przez rozpuszczalniki organiczne. W toku tych poszukiwań opracowano także metody rozdziału i określania endogennych inhibitorów roślinnych. Wprowadzenie chromatografii do badań inhibitorów spowodowało pojawienie się dużej liczby doniesień i publikacji naukowych próbujących wyjaśnić rolę tych związków w roślinach. Do dzisiaj jednak zarówno budowa inhibitorów jak i mechanizm ich działania nie zostały w pełni wyjaśnione.

### *Metody wykrywania i oznaczania inhibitorów*

Inhibitory wzrostu zostały wykryte w trakcie badań auksyn. Obydwie grupy substancji, tj. auksyny i inhibitory, rozpuszczają się w tych samych rozpuszczalnikach, a więc często towarzyszą sobie wzajemnie, wykazując przy tym często zbliżone właściwości chemiczne. Metody więc oznaczania inhibitorów są w pewnym zakresie podobne do metod oznaczania auksyn, pomimo różnego działania biologicznego tych substancji. Proces wykrywania i oznaczania naturalnych inhibitorów wzrostu składa się zazwyczaj z dwóch etapów pracy:

- 1) uzyskanie dobrego (aktywnego) ekstraktu;
- 2) analizy wyekstrahowanych substancji.

1. Ekstrahowanie inhibitorów wzrostu z roślin. Najczęściej używanymi do ekstrakcji rozpuszczalnikami są: eter dwuetylowy oraz alkohole etylowy i metylowy (Varga 1957 a i 1957 b, Remy 1961, Guern, 1964, Lane i Bailey 1964). Samą ekstrakcję inhibitorów należy przeprowadzać w temperaturze 0°C (Varga 1957 b, Remy 1961, Guern 1964, Lane i Bailey 1964, Robinson i Wareing 1964), natomiast zagęszczania ekstraktu można już dokonywać w temperaturach wyższych, nie przekraczających jednak + 35° C (Robinson i Wareing 1964). W trakcie tej samej ekstrakcji stosowane są niekiedy zmiany eluenta; na przykład przeprowadzanie ekstraktu alkoholowego do wodnego i znów do alkoholowego ma na celu dodatkowe oczyszczenie ekstraktu (przez precypitację) z domieszek utrudniających analizę, głównie zaś z barwników oraz ciał tłuszczowych (Lane i Bailey 1964, Robinson i Wareing 1964).

Oddzielenia inhibitorów od stymulatorów próbowano dokonać za pomocą ekstrakcji frakcjonowanej, jednak wyniki tej metody nie zawsze były zadowalające. Znacznie wygodniejsze i dokładniejsze okazały się metody chromatograficzne. Linser (1951) uzyskiwał kompletny rozdział inhibitorów i auksyn, stosując chromatografię kolumnową. Alkoholowy ekstrakt uzyskany z materiału roślinnego przepuszczał on przez kolumnę wypełnioną tlenkiem glinu. W metodzie tej inhibitory

wraz z alkoholem przepływały przez kolumnę, natomiast auksyny ulegały całkowitej adsorpcji. Następnie inhibitory były rozdzielane dalej przy użyciu innego rozpuszczalnika i innego sorbenta.

W badaniach inhibitorów wzrostu szersze zastosowanie znalazła chromatografia bibułowa (Bennet — Clark i Kefford 1953, Hemberg 1961, Lane i Bailey 1964, Robinson i Wareing 1964). Stosowanie tej metody wymaga jednak uprzedniego oczyszczenia ekstraktu od barwników roślinnych (Murakami 1959, Remy 1961, Lane i Bailey 1964), które utrudniają analizę. Oddzielenia tłuszczowców można dokonać przez precypitację i następnie sączenie. Luckwill (1957) dodawał do pierwotnego ekstraktu eterowego wodę i następnie całkowicie odparowywał eter. Regulatory wzrostu przechodziły w takim wypadku do frakcji wodnej, chlorofil zaś i karotenoidy wytrącone pozostawały na sączku bibułowym. Przesącz wodny można następnie powtórnie ekstrahować eterem (Luckwill 1957, Remy 1961).

Tabela 1

*Skuteczność ekstrakcji eterowej inhibitora  $\beta$  w zależności od pH ekstrahowanego materiału. Według Davisona, 1965*

pH ekstrahowanego roztworu	Końcowa długość wycinków koleoptyle <i>Avena</i> * w mm	Inhibicja wzrostu elongacyjnego w %
Kontrola	13,3	0
7,0	12,4	11
5,5	10,4	39
4,0	9,6	50
2,0	9,8	53

\* Początkowa długość: 6,0 mm.

Przy każdej ekstrakcji eterowej należy pamiętać o doprowadzeniu ekstrahowanego roztworu do odpowiedniego pH (tabela 1). Przygotowany w opisany sposób ekstrakt, po zagęszczeniu i ewentualnym przeprowadzeniu wyekstrahowanych związków do roztworu alkoholowego lub octanowego (Lane i Bailey 1964) może być poddany rozdziałowi chromatograficznemu.

### *Oznaczanie inhibitorów*

#### A. Metody fizyko-chemiczne

1. Chromatografia. W chromatografii bibułowej inhibitorów stosowana jest dość duża liczba rozpuszczalników (tabela 2). Fakt ten jest jedną z przyczyn otrzymywania różnych, a niekiedy rozbieżnych wyników. Z drugiej zaś strony stosowanie różnych rozpuszczalników przy analizie tego samego ekstraktu może być źródłem dodatkowych informacji o badanym związku. Jednym z najczęściej spoty-

Tabela 2

Wykaz najczęściej stosowanych rozpuszczalników w chromatograficznych badaniach naturalnych inhibitorów wzrostu roślin

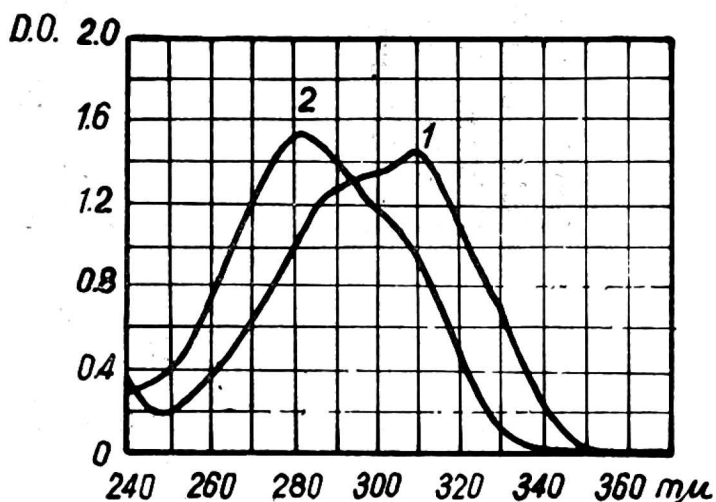
Rozpuszczalnik	Stosunek objętościowy	Według
izopropanol : amoniak : woda	10 : 1 : 1	Varga 1957a i b, Murakami 1959, Hemberg 1961, Lane i Bailey 1964, Robinson i Wareing 1964, Wareing i in. 1964, Davison 1965.
	4 : 1 : 5	Bardinskaja i Szubert 1962, Lane i Bailey 1964.
n-butanol : kwas octowy : woda	4 : 1 : 5	Bardinskaja i Szubert 1962, Lane i Bailey 1964.
	3 : 2 : 95	Bardinskaja i Szubert 1962.
	19 : 1 : 6	Michniewicz i Kopcewicz 1966.
n-butanol : amoniak : woda	200 : 6 : 36	Hemberg 1961, Davison 1965.
	80 : 20 : 10	Bardinskaja i Szubert 1962.
	35 : 1 : 5	Tureckaja i Kefeli 1963.
benzen : kwas octowy : woda	125 : 75 : 3	Davison 1965.
	6 : 7 : 3	Ibrahim i Towers 1960.
izopentanol : n-butanol : etanol : woda	1 : 1 : 2,5 : 4	Lane i Bailey 1964.
etanol : amoniak : woda	4 : 1 : 5	Lane i Bailey 1964
izopropanol : woda	100 : 20	Guern 1964.
mrówczan sodu : kwas mrówkowy : woda	10 : 1 : 200	Ibrahim i Towers 1960.
kwas octowy	2% i 15%	Bardinskaja i Szubert 1962.

kanych inhibitorów wzrostu jest tzw.  $\beta$ -inhibitor. Jego budowa i właściwości chemiczne nie są jeszcze dobrze poznane. Przy chromatograficznym wyodrębnieniu  $\beta$ -inhibitora stosuje się najczęściej rozpuszczalnik — izopropanol : amoniak : woda (w stosunku 10 : 1 : 1). Rozpuszczalnik ten uważany jest za podstawowy (tabela 2); inne rozpuszczalniki spełniają rolę pomocniczą i uzupełniającą.

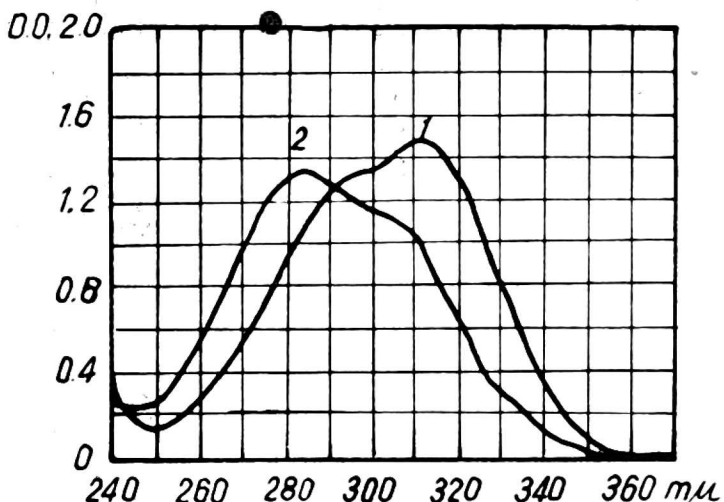
2. Reakcje barwne. Na chromatogramach inhibitory można m. in. wykrywać dzięki barwnym reakcjom, jakie dają te związki z pewnymi odczynnikami (tabela 3). Oprócz odczynników wymienionych w tabeli 3, do wykrywania inhibitorów fenolowych stosuje się niekiedy: purpurę metylową, 1% etanolowy roztwór wodorotlenku potasu, 1% etanolowy roztwór chlorku glinu, 0,1% ninhydrynę, 0,01% zasadowy azotan berylu, formaldehyd w kwasie siarkowym, 2N wodorotlenek sodu, pary amoniaku i inne (Lane i Bailey 1964).

Reakcje barwne w wykrywaniu inhibitorów na chromatogramach mają charakter oznaczeń jakościowych; przyjmowanie ich za podstawę do oznaczeń ilościowych (kolorymetrycznych) budzi zastrzeżenia, zarówno z powodu małej czułości, jak i małej specyficzności tych reakcji. Występowanie inhibitorów na chromatogramach można stwierdzić także dzięki ich fluorescencji w ultrafioletowym świetle.

3. Spektrofotometria. W latach ostatnich coraz częściej przy oznaczaniu inhibitorów wzrostu stosowane są metody spektrofotometryczne (Kolesnikow i Zore 1962, Guern 1964, Sarapuu 1965). Dzięki dużej czułości tych metod oraz występowaniu specyficznego widma pochłaniania światła ultrafioletowego (U. V.) przez pewne inhibitory, metoda ta zyskuje coraz większe uznanie przy identyfikacji i ilościowym oznaczaniu interesujących nas związków (rys. 1 i 2).



Rys. 1. Widmo pochłaniania światła ultrafioletowego (UV) przez kwas para-hydroksycynamonowy w ekstrakcie wodno-alkoholowym z *Spirodela polyrrhiza*: 1 — krzywa pochłaniania UV przez alkoholowy roztwór inhibitora; 2 — przez roztwór inhibitora w mieszaninie: alkohol — octan sodu (wg Guerna, 1964)



Rys. 2. Widmo pochłaniania UV przez syntetyczny kwas para-hydroksycynamonowy: 1 — krzywa dla roztworu alkoholowego; 2 — dla roztworu: alkohol — octan sodu (wg Guerna, 1964)

## B. Metody biologiczne

Tkanki roślinne zawierają na ogół znikome ilości inhibitorów. Aktywność biologiczna tych substancji jest bardzo zmienna. Wykrywanie więc inhibitorów metodami chemicznymi lub fizycznymi nie zawsze jest wskaźnikiem ich aktywności. Z tych to właśnie powodów dość powszechnie stosuje się określanie aktywności inhibitorów za pomocą bardzo czułych testów biologicznych.

Testy biologiczne używane do wykrywania naturalnych inhibitorów wzrostu są zasadniczo podobne do testów, przy pomocy których określa się aktywność auksyn. Przy określaniu jednak aktywności auksyn rejestruje się stymulację wzrostu obiektów testowych, zaś w badaniach inhibitorów odwrotnie — hamowanie wzrostu.

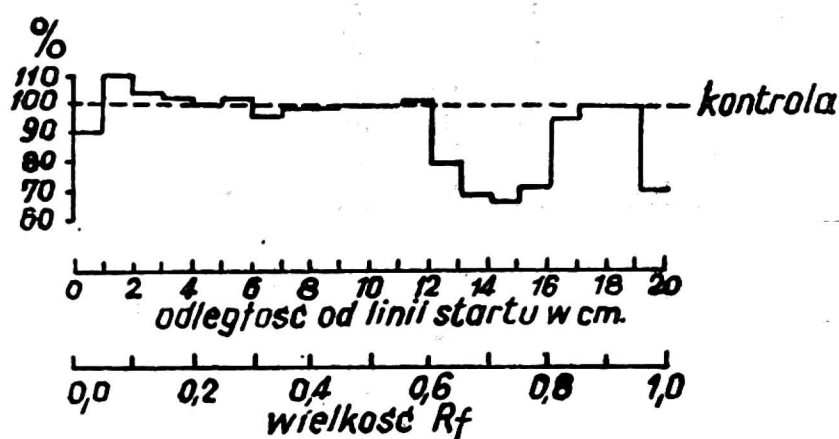
1. Najczęściej stosowanym testem jest opracowany przez Bentley'a i Housley'a (1954) test liniowego przyrostu koleoptyla owsa. Wyżej wymienieni autorzy zalecają posługiwanie się 10-milimetrowymi subapikalnymi wycinkami koleoptyla. Wycinki te umieszcza się w wodnych ekstraktach otrzymanych z analizowanych segmentów bibuły chromatograficznej (Varga 1957a). Ekstrakt wodny może być zastąpiony pożywką, w skład której wchodzi: wymyty z chromatogramu inhibitor, 2% sacharoza, 1  $\mu\text{g}/1$  ml IAA (kwas indoliloctowy) oraz kilka kropel buforu fosfora-

Fluorescencja i barwne reakcje niektórych związków fenolowych (Wg Ibrahima i Towersa 1960 oraz Bardińskiej i Szuberta 1962)

Nazwa związku	Fluorescencja w U.V.	Barwna reakcja			
		Kolor z dwuazowaną p-nitro aniliną (NaOH)	Kolor z dwuazowa- nym kwasem sulfanilowym (NaOH)	Kolor 1% FeCl <sub>3</sub>	Kolor z floroglucyną i HCl konc.
<b>Kwasy:</b>					
salicylowy	niebieska	goździkowy	żółty	jasnobrunatny	—
o-pirotechowy	ciemnoniebieska	niebiesko-biały	żółty	fioletowo-niebieski	—
β-rezorcylowy	brak	niebiesko-żółto-brunat.	żółto-brunatny	jasnobrunatny	—
α-rezorcylowy	brak	oranż-brunatny	brunatny	jasnobrunatny	—
γ rezorcylowy	brak	niebiesko-brunatny	brunatny	jasnobrunatny	—
gentyzynowy	jasnoniebieska	niebiesko-biały	jasnożółty	fioletowo-niebieski	—
protokatechowy	brak	jasnobrunatny	jasnożółty	fioletowo-niebieski	—
wanilinowy	brak	purpurowy	oranż	jasnobrunatny	brak
syryngowy	brak	niebieski	czerwony	jasnofioletowy	—
o-kumarowy	żółta	purpurowy	oranż	brak	—
p-kumarowy	ciemnoniebieska	niebieski	jasnobrunatny	brak	brak
melilotowy	brak	purpurowy	oranż-żółty	brak	—
florentynowy	brak	purpurowo-fioletowy	jasnogoździkowy	brak	—
kawowy	niebieska	jasnobrunatno-biały	jasnożółty	ciemnozielony	brak

Nazwa związku	Fluorescencja w U.V.	Barwna reakcja			Kolor z floroglucyną i HCl konc.
		Kolor z dwuazowaną p-nitro aniliną (NaOH)	Kolor z dwuazowa- nym kwasem sulfanilowym (NaOH)	Kolor 1% FeCl <sub>3</sub>	
ferulowy	niebieska	niebiesko-zielony	purpurowy	brak	brak
sinapowy	zielona	jasnoniebiesko-biały	goździkowy	brak	—
p-hydroksybenzoesowy	brak	goździkowy	żółty	brak	—
2-hydroksy-4-metoksybenzoe- sowy	brak	jasnobrunatny	żółty	jasnobrunatny	—
2-hydroksy-5-metoksybenzoe- sowy	jasnoniebieska	jasnoniebieski	jasnobrunatny	niebieski	—
2-hydroksy-6-metoksybenzoe- sowy	brak	brunatny	oranż-żółty	jasnobrunatny	—
3-hydroksy-5-metoksybenzoe- sowy	brak	oranż-żółty	jasnogoździkowy	zielony	—
Aldehydy:					
sinapowy	żółto-zielona	—	różowy	—	liliowy
koniferylowy	niebiesko-zielona	—	żółty	—	czzerwono- liliowy
p-oksybenzaldehyd	brak	—	brak	—	żółto-brązowy

nowego o pH 5,6 (Robinson i Wareing 1964). Okres ciemnej inkubacji wycinków koleoptyla w termostacie trwa zwykle 24 godziny przy temperaturze 25° C. Po tym okresie dokonywane są pomiary przyrostu liniowego obiektów testowych. Jeżeli w eluacie badanego wycinka chromatogramu znajdują się inhibitory, to przyrosty wycinków koleoptyli są znacznie mniejsze niż w wodzie destylowanej. Wyniki takich badań przedstawia się zwykle w postaci histogramów (rys. 3).



Rys. 3. Przyrosty wycinków koleoptyla owsa w eluatach z 1 cm bibułowych wycinków chromatogramu otrzymanego z eterowego ekstraktu owoców *Prunus persica* (wg Vargi, 1957a)

Opisana wyżej w skrócie metoda może być różnie modyfikowana, jednak jej ogólne zasady pozostają zwykle te same.

2. Test przyrostu liniowego wycinków łodygi grochu oparty jest o założenia podobne do testu owsianego (Hemberg 1961). Obydwa wyżej wymienione testy są najbardziej rozpowszechnione w badaniach biologicznej aktywności inhibitorów. Oprócz nich dość często stosuje się test wzrostowy korzeni (Bennet-Clark i Kefford 1953) oraz test wygięciowy koleoptyla owsa (Snov 1939, Meyer 1950).

3. Inhibitory wzrostu hamują także kiełkowanie nasion (Hemberg 1961). Opracowano więc na tej podstawie test aktywności inhibitorów zwany testem kiełkowania (Miyamoto i in. 1961, Wareing i in. 1964, Wareing 1965).

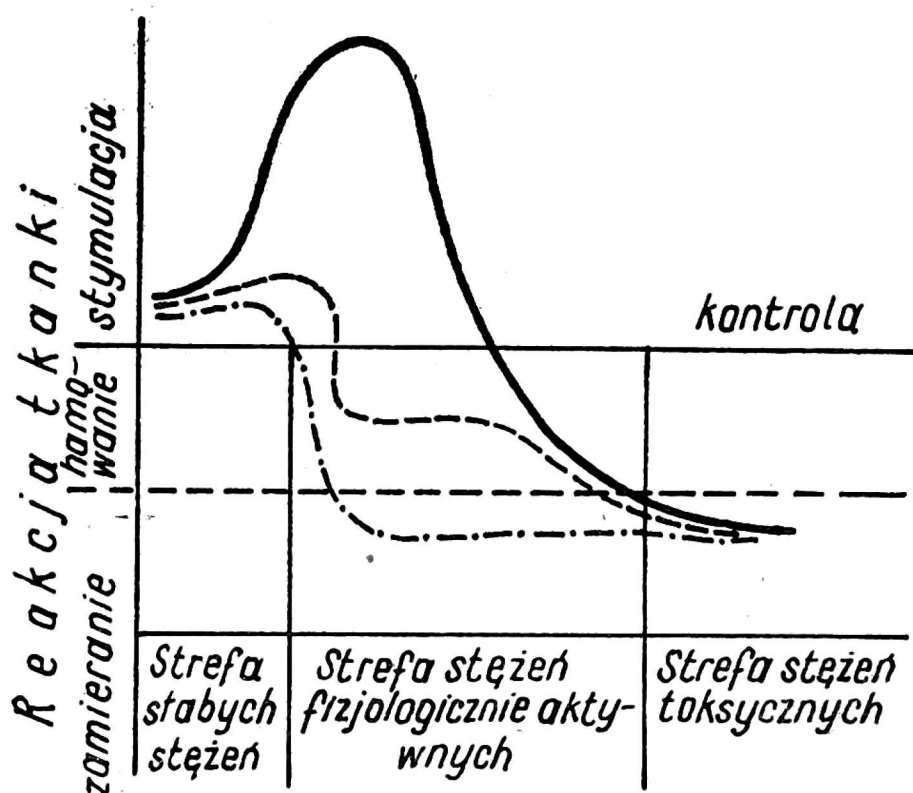
Żadna z przytoczonych wyżej metod nie jest doskonała, dlatego też niektórzy autorzy zalecają stosowanie w badaniach tego samego ekstraktu kilku metod jednocześnie (Wareing i in. 1964, Lane i Bailey 1964).

#### *Występowanie oraz właściwości biologiczne i chemiczne naturalnych inhibitorów wzrostu*

Nazwanie jakiegoś związku chemicznego inhibitorem wzrostu roślin nie zawsze jest ścisłe. Często bowiem ten sam związek, zależnie od stężenia, może bądź hamować, bądź też pobudzać (stymulować) wzrost. W piśmiennictwie dotyczącym regulatorów wzrostu używane jest pojęcie „stężenia aktywnego”, tj. takiego stężenia, w którym dany związek wywiera wyraźny wpływ na wzrost tkanek czy organów.



Wpływ ten jednak, jak już wspomniano, może być dodatni lub ujemny. Niemniej jednak, dla każdego związku chemicznego istnieje pewien określony zakres stężeń, w których wykazuje on pobudzające lub hamujące działanie (rys. 4).



Rys. 4. Aktywność regulatorów wzrostu jako funkcja ich stężenia — auksyny, - - - inhibitory, — · — · — · toksyny (wg Kefeliego i Tureckiej, 1964)

W małych stężeniach (rys. 4) zarówno stymulatory jak i inhibitory działają na wzrost pobudzająco. Zastosowanie stężeń coraz to większych (rys. 4 — strefa stężeń fizjologicznie czynnych) powoduje zróżnicowanie się regulatorów wzrostu pod względem ich działania na stymulatory i inhibitory (retardanty). Wreszcie jeszcze dalsze zwiększanie stężeń regulatorów wzrostu powoduje ponowne (jak przy stężeniach małych) zanikanie różnic w działaniu regulatorów wzrostu — jedne i drugie stają się toksynami i powodować mogą zamieranie tkanek. Zakres aktywnego działania toksyn właściwych (jako regulatorów) na wzrost jest mały (rys. 4), tj. zamyka się w granicach niewielkich stężeń. Z powyższego wynika, że używanie w stosunku do jakiejś substancji określenia „stymulator” lub „inhibitor” odnosi się tylko do stężeń fizjologicznie aktywnych, tj. takich stężeń, przy których ujawnia się ich najbardziej specyficzne działanie.

Liczba gatunków roślin, u których wykryto naturalne inhibitory wzrostu, jest znaczna (Miyamoto i in. 1961, Ferenczy 1957, Varga 1957a). Równolegle do zwiększającej się liczby doniesień o wykrywaniu coraz to nowych inhibitorów czynione są próby ich sklasyfikowania i uporządkowania (Mayer i Poljakoff-Mayber 1963, Kefeli i Tureckaja 1964).

Niżej podajemy przegląd rodzajów inhibicji i czynników endogennych hamujących wzrost.

1. Inhibicja osmotyczna. Osmotyczne hamowanie wzrostu (kiełkowania nasion) zachodzi wtedy, gdy nasiona lub inne organy rośliny znajdują się w roztworze o dużej wartości osmotycznej. Przeniesienie tkanek, organów czy nasion do wody powoduje zwykle wznowienie wzrostu czy kiełkowanie nasion. Inhibicja osmotyczna dotyczy zazwyczaj nasion znajdujących się wewnątrz owoców oraz roślin lub organów znajdujących się w warunkach nadmiernego zasolenia. W laboratorium zjawisko to spotkać można wtedy, gdy nasiona kiełkują w soku wyciśniętym z owoców, lub gdy badamy biotestem ekstrakty surowe, nieoczyszczone, których stężenia są duże. W warunkach naturalnych substancjami wywołującymi inhibicję osmotyczną są najczęściej cukry i sole nieorganiczne, jak np. chlorek sodu. Do wywoływania sztucznej inhibicji osmotycznej stosowany jest najczęściej mannitol (Mayer i Poljakoff-Mayber 1963).

2. Inhibitory oddychania. Są to związki, które wpływają hamująco na proces oddychania i w konsekwencji na całość metabolizmu. Bez aktywnego zaś metabolizmu nie zachodzą procesy wzrostowe. Inhibitory oddychania hamują więc i wzrost roślin. Do związków tych należą m. in. cyjanki, azydki, dwunitrofenol, hydroksylamina i inne. Hamowanie wzrostu przez inhibitory oddychania odbywa się przy tych stężeniach, które hamująco wpływają na całość metabolizmu.

3. Antymetabolity, czyli analogi różnych związków organicznych, takich jak kwasy nukleinowe, aminokwasy i inne (Khan 1966, Nooden i Thiman 1966). Związki te mogą hamować syntezę białek, co z kolei wywołuje zahamowanie wzrostu. Inhibitory tego rodzaju stosowane są egzogennie, a należą do nich: 5-fluorouracyl, 5-bromouracyl, 2-tiouracyl, fluorofenylalanina, puromycyna, aktinomycyna D i inne. Niektóre z wymienionych związków są inkorporowane do RNA, dezorganizując w ten sposób syntezę białek. Działanie tych związków może mieć charakter odwracalny lub nieodwracalny, co zależy od warunków doświadczalnych.

4. Herbicydy. Są to zazwyczaj związki syntetyczne (sztuczne). Hamują one wzrost roślin i kiełkowanie nasion. Niektóre z nich, jak np. 2, 4-D, mogą być stosowane do hamowania kiełkowania chwastów w uprawach polowych. Herbicydy używane są również do selektywnego i totalnego niszczenia chwastów. Niektóre z nich odznaczają się wielokrotnie wyższą aktywnością niż naturalne regulatory wzrostu. Np. kwas  $\alpha$ -naftylooctowy w koncentracji 1  $\mu\text{g/ml}$  daje taki stymulujący efekt na wycinkach koleoptyli, jak IAA w stężeniu 30  $\mu\text{g/ml}$ . Zjawisko to związane jest z tym, że IAA jako auksyna naturalna zużywana jest w procesie wzrostu, natomiast kwas  $\alpha$ -naftylooctowy w tkankach jest bardziej stabilny, ponieważ nie działają na niego oksydazy auksynowe. Kwas  $\alpha$ -naftylooctowy jest dla roślin ciałem obcym (Kefeli i Tureckaja 1964). Jako herbicydy stosowane są także auksyny (IAA) i naturalne inhibitory (Eckstein 1965). Efekt działania tych substancji uzależniony jest głównie od stężenia preparatu i od etapu ontogenezy rośliny.

5. Toksyny. Są to różne związki wywołujące w tkankach nekrozy. Ich działanie jest zazwyczaj nieodwracalne (Mayer i Poljakoff-Mayber 1963).

6. Inhibitory naturalne (endogenne). Są to związki chemiczne występujące

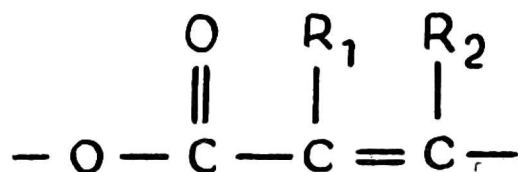
w różnych tkankach roślinnych. Do najczęściej spotykanych należą nienasycone laktony oraz związki fenolowe. Występują one w nasionach, pąkach, bulwach i innych organach, odgrywając ważną rolę w regulacji zasadniczych procesów życiowych. Hamują one kiełkowanie nasion, otwieranie się pąków, wzrost pędów itp. Są również jednym z głównych czynników indukujących spoczynek tych organów.

Z przytoczonego przeglądu związków hamujących wzrost najciekawsze dla przyrodnika są naturalne (endogenne) inhibitory wzrostu. Spośród wielkiej liczby związków fizjologicznie czynnych naturalne inhibitory wyróżniają się następującymi właściwościami (Kefeli i Tureckaja 1964):

- 1) hamują wzrost roślin;
- 2) zmniejszają lub neutralizują aktywność auksyn;
- 3) powodują okresowe zahamowanie wzrostu (spoczynek głęboki), które mija po obniżeniu stężenia inhibitorów lub ich rozłożeniu;
- 4) intensywność wzrostu roślin jest odwrotnie proporcjonalna do stężenia inhibitorów;
- 5) posiadają określoną budowę chemiczną; są to zazwyczaj proste lub złożone związki fenolowe i ich pochodne.

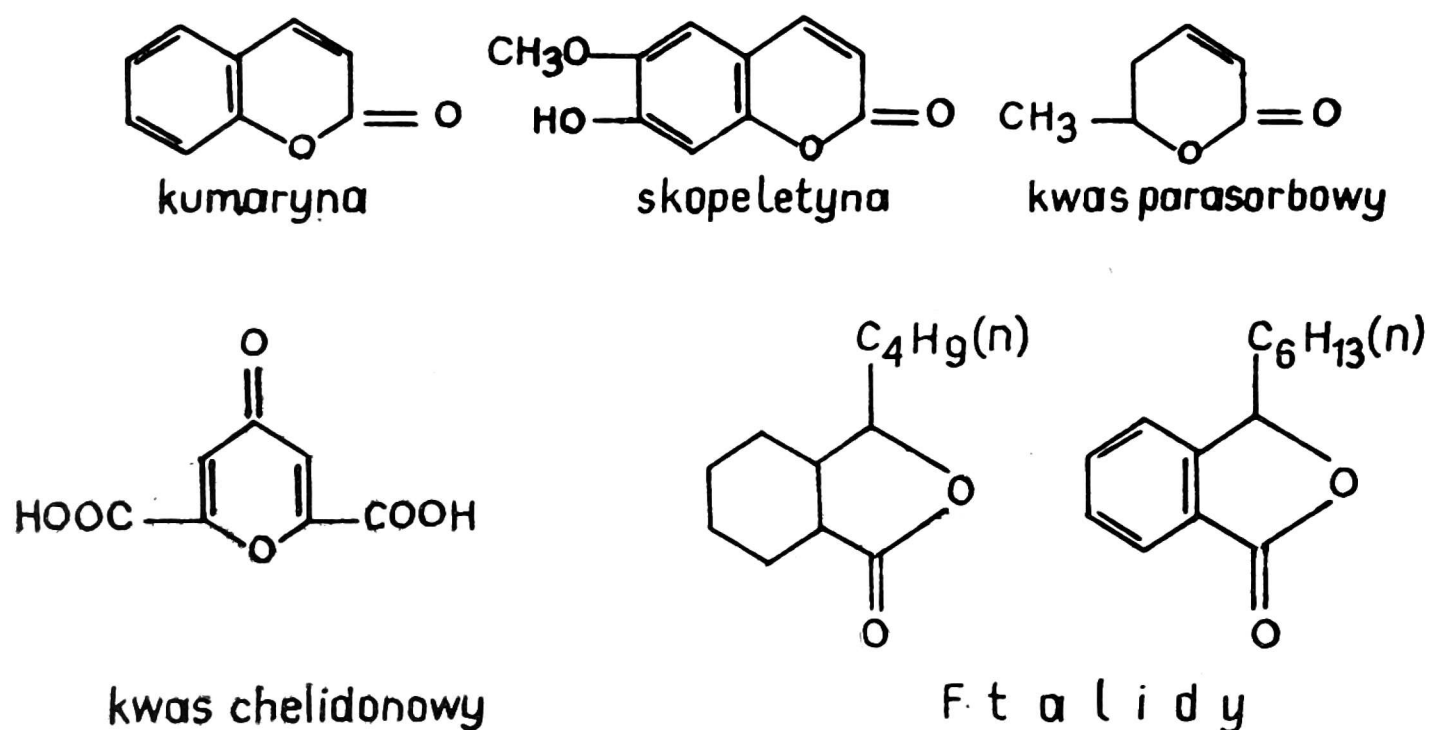
Przytoczone właściwości inhibitorów są podstawą wydzielenia ich w oddzielną grupę regulatorów wzrostu. Trudniejsze jednak jest przeprowadzenie granicy pomiędzy inhibitorami i toksynami wytwarzanymi przez rośliny. Toksynami naturalnymi są najczęściej, podobnie jak i inhibitory, związki fenolowe, laktonowe i inne. W odróżnieniu jednak od inhibitorów, naturalne toksyny w sposób nieodwracalny przerywają wzrost roślin czy organów (lub tkanek) testowych. Poza tym działanie toksyn nie wykazuje korelacji ze zmianami natężenia procesów wzrostowych.

Naturalne inhibitory wzrostu roślin są reprezentowane przez dziesiątki związków (Hemberg 1961, Mayer i Poljakoff-Mayber 1963, Grzesiuk 1967) odznaczających się różnorodną budową chemiczną. Najczęściej są one, jak już wspomniano, przedstawicielami nienasyconych laktonów, prostych i złożonych polifenoli, acyklicznych kwasów oraz fenolowych pochodnych flawonu (tzw. flawonoidy).



Rys. 5. Struktura nienasyconego laktonu (wg Hemberga, 1961)

Nienasycone laktony (rys. 5) stanowią grupę inhibitorów bardzo powszechnych w świecie roślinnym. Jednym z najczęściej występujących przedstawicieli tej grupy jest kumaryna (wewnętrzny bezwodnik kwasu cis-o-hydroksycynamonowego) (rys. 6). Występuje ona w większości roślin należących do rodzin: *Orchidaceae*,



Rys. 6. Wzory strukturalne niektórych związków hamujących wzrost, wyizolowanych z tkanek roślinnych (wg Hemberga, 1961)

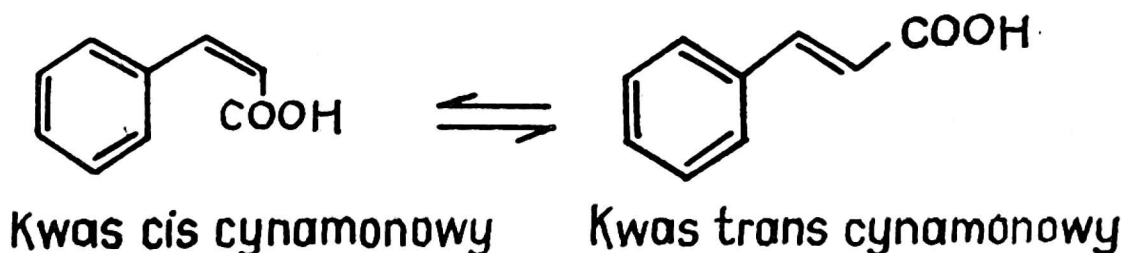
*Papilionaceae*, *Rutaceae*, *Umbelliferae* i *Labiatae* (Hemberg 1961) oraz w wielu innych (Knypl 1965). Związek ten gromadzi się w różnych organach roślin, najczęściej zaś w liściach. Stwierdzono jego obecność również w owocach i nasionach. Kumarynie przypisuje się szczególne funkcje w nasionach wrażliwych na światło (Barton 1965, Evenari 1965). Związek ten w stężeniu 4  $\mu\text{g}/\text{l}$  może całkowicie powstrzymać kiełkowanie nasion. Zjawisko to można odwrócić za pomocą światła, szczególnie zaś promieni czerwonych (630—680  $\text{m}\mu$ ). Podobny efekt wywołują promienie fioletowe (Evenari 1965). Kumaryna w tkankach roślinnych („*in vivo*”) występuje w bardzo niewielkich ilościach. Gromadzi się ona głównie jako „kumaryna związana” ( $\beta$ -glikozyd kwasu *cis*-*o*-hydroksycynamonowego) (Knypl 1965). Droga przemian od kwasu cynamonowego do kumaryny prowadzi prawdopodobnie poprzez izomerację  $\beta$ -glikozydu kwasu *o*-kumarowego do  $\beta$ -glikozydu kwasu kumarynowego. Przypuszcza się, że przemiany te zachodzą przy udziale światła (Knypl 1965).

Kumaryna stosowana jest często w laboratoriach jako inhibitor kiełkowania. Ma ona zdolność indukowania wrażliwości na światło u niektórych odmian sałaty normalnie niewrażliwych na ten czynnik. Budowa cząsteczki kumaryny charakteryzuje się dwoma pierścieniami — aromatycznym i nienasyconym laktonowym (rys. 6). Zmiany tej struktury w powiązaniu z aktywnością kumaryny były już niejednokrotnie przedmiotem badań. Stwierdzono, że w tym związku chemicznym nie ma jakiejś jednej specjalnej grupy odpowiedzialnej za jego aktywność inhibicyjną. Redukcja nienasyconego pierścienia laktonowego lub substytucja przez grupę hydroksylową, metylową lub inne pozbawiają jednak ten związek aktywności. Inne laktony, składające się tylko z jednego pierścienia laktonowego (np. kwas parasor-

bowy), wykazują również aktywność biologiczną. Stwierdzono, że kumaryna hamuje mitozę komórek i wzrost systemu korzeniowego; poza tym w doświadczeniach testowych powstrzymuje wzrost wycinków łodygi grochu i koleoptyla owsa.

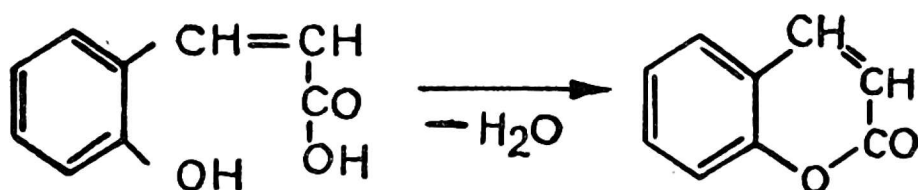
Drugim naturalnym inhibitorem dość powszechnie występującym w roślinach jest skopoletyna (rys. 6). Gromadzi się ona niemal we wszystkich organach roślinnych bądź w formie wolnej, bądź też w postaci glikozydu. Największe jej ilości występują w wyrosniętych częściach systemu korzeniowego. Jej stężenie dochodzi tam do  $5 \times 10^{-5}$ , a działanie inhibicyjne może wywoływać już stężenie  $3 \times 10^{-5}$  M.

Ważny ze względu na rozprzestrzenienie i rolę, jaką odgrywa w roślinach, jest kwas cynamonowy. Występuje on w dwóch izomerycznych formach, a mianowicie w formie *cis* i w formie *trans* (rys. 7). Kwas *trans*-cynamonowy jest naturalnym



Rys. 7. Kwas *cis*  $\rightleftharpoons$  *trans*-cynamonowy (wg Knypla, 1965)

prekursorem indolu i dalej poprzez tryptofan, kwas indolopirogronowy oraz indolo-acetyloaldehyd — prekursorem kwasu indoliloctowego. Z drugiej zaś strony pochodną hydroksylową kwasu cynamonowego jest kwas kumarynowy, czyli o-oksycynamonowy. Występuje on także w dwóch formach, z których trwała jest tylko forma *trans*. Forma *cis*, wskutek sąsiedztwa hydroksylu karboksylowego i hydroksylu rdzeniowego, łatwo traci cząsteczkę wody i przechodzi w bezwodnik zwany kumaryną (rys. 8). Kwas *trans*-cynamonowy działa antagonistycznie w sto-

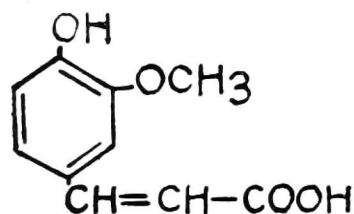


Rys. 8. Kwas *cis*-kumarynowy  $\longrightarrow$  kumaryna

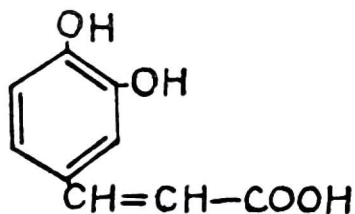
sunku do IAA, zaś kwas *cis*-cynamonowy synergistycznie (Hemberg 1961). Biorąc pod uwagę możliwość przekształceń: kwas *cis*-cynamonowy  $\rightleftharpoons$  kwas *trans*-cynamonowy  $\longrightarrow$  kwas kumarynowy  $\longrightarrow$  kumaryna, układ ten można uważać w tkankach roślinnych za pewnego rodzaju czynnik równowagi pomiędzy stymulatorami i inhibitorami. W przemianach tych prawdopodobny jest udział aparatu enzymatycznego, sterowanego przez czynniki genetyczne. Nie jest to jednak jedyna współzależność inhibitorów i stymulatorów w organizmie roślinnym. Na przykład, drogi biogenezy związków fenolowych, flawonoidowych i indolilowych są wspólne aż do kwasu szikimowego i 5-fosforanu kwasu szikimowego. Kwasy te są prekurso-

rami zarówno związków fenolowych i flawonoidów jak i związków indolilowych (Kefeli i Tureckaja 1964, Tomaszewski 1960).

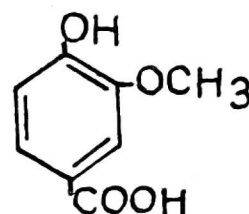
Mieszanka kwasów cynamonowego, kumarynowego i ich pochodnych stanowi według niektórych badaczy (Hemberg 1961, Köves 1957, Varga 1957a) najpowszechniej występujący w świecie roślin wyższych inhibitor, zwany  $\beta$ -inhibitorem.



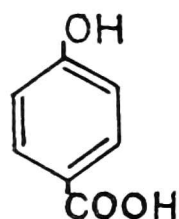
kwas ferulowy



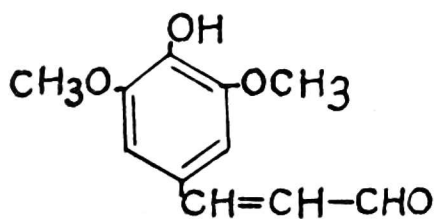
kwas kofeinowy



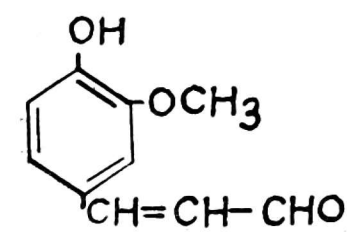
kwas wanilinowy



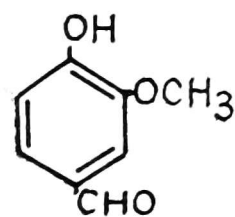
kwas p-oksybenzoesowy



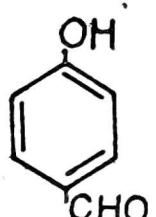
aldehyd sinapowy



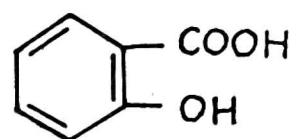
aldehyd koniferylowy



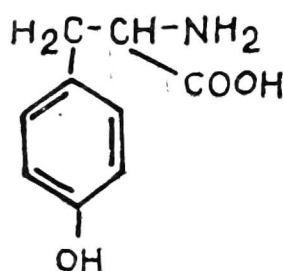
wanilina



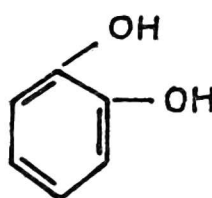
p-oksybenzaldehyd



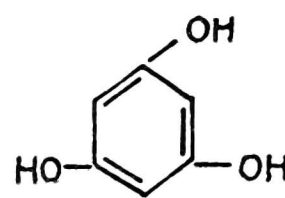
kwas salicylowy



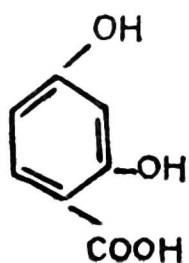
tyrozyna



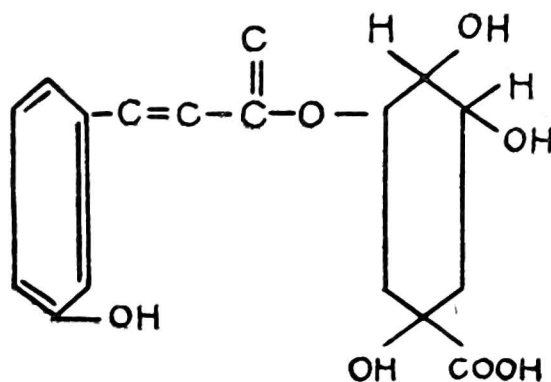
pirokatechina



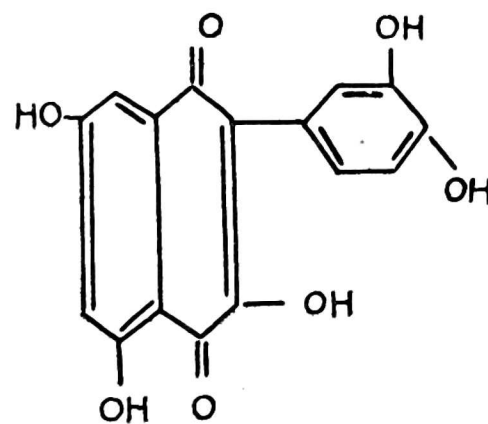
floroglucyna



protokatechina



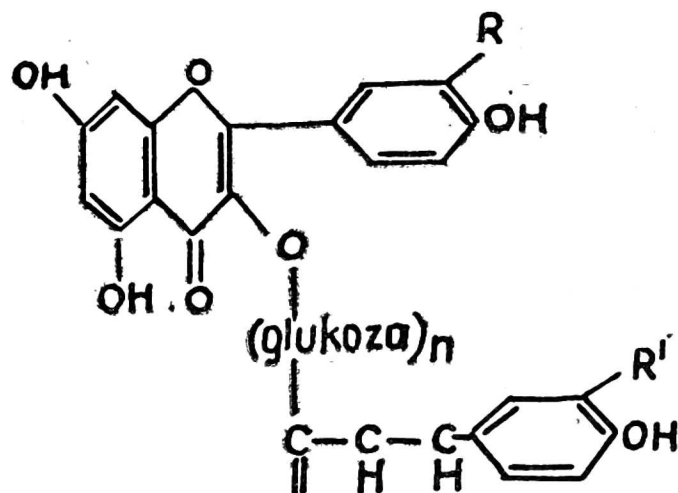
kwas chlorogenowy



kwercetyna

Rys. 9. Wzory strukturalne niektórych polifenoli

Inhibitory fenolowe i ich pochodne reprezentowane są przez liczną grupę związków. Do najczęściej występujących w tkankach roślinnych należą związki wymienione w tabeli 3 i na rys. 9, a ponadto liczna grupa fenoli złożonych i pochodnych fenolowych. Wszystkie te związki w stanie wolnym wykrywane są w niewielkich tylko ilościach. Przeważnie występują one jako glikozydy. Fenole złożone i ich pochodne wykryto w organach roślin różnych gatunków, nieraz odległych systematycznie. Kwas kawowy i ferulowy wykryto w owocach pomidora. W plewkach jęczmienia stwierdzono obecność kumaryny, kwasu wanilinowego oraz kwasu hydroksycynamonowego i jego pochodnych. W owocach truskawki i brzoskwini, a także w zewnętrznej części bielma pszenicy, występuje kumaryna oraz pochodne kwasów benzoowego i cynamonowego. Z ekstraktów słomy traw wyizolowano kwasy: kumarowy, ferulowy, sinapowy, p-oksybenzoowy, wanilinowy, kawowy oraz protokatechowy. Kwasy fenolowe można ponadto prawie zawsze wykryć w liściach różnych innych roślin (tabela 4).



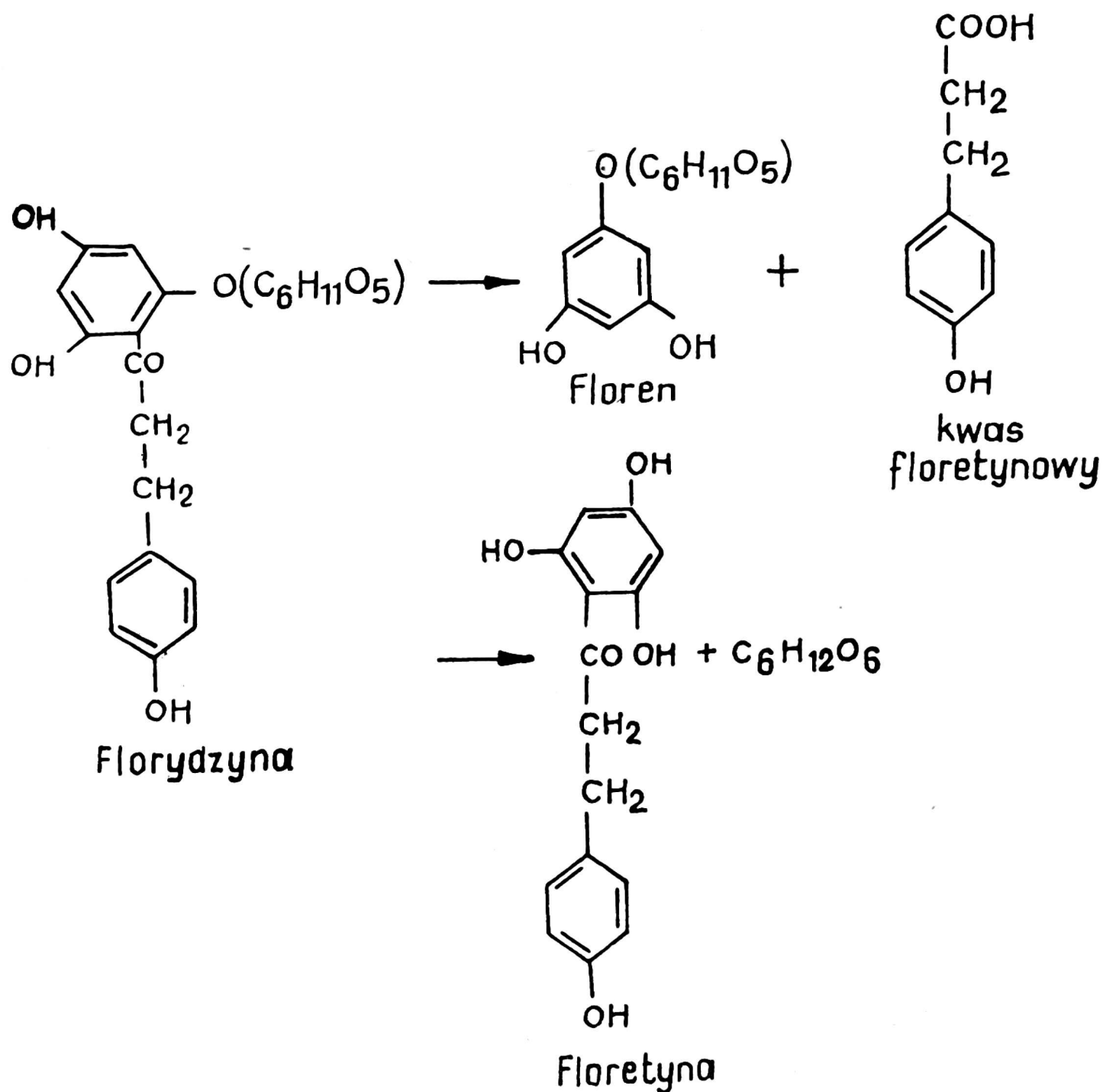
Rys. 10. Struktura flawonoidowego kompleksu wyizolowanego z grochu:  $n$  — nieokreślona liczba reszt glukozy;  $R, R_1$  — różne funkcjonalne grupy (wg Kefeli'ego i Tureckiej, 1964)

Kompleks flawonoidowy odznaczający się aktywnością inhibicyjną wyizolowano z roślin grochu (rys. 10). W liściach i korze drzew owocowych stwierdzono obecność dużych ilości flawonoidów: naringeniny i florydżyny (rys. 11). Mają one właściwość silnego hamowania wzrostu indukowanego przez IAA. Inhibitory te powstają w roślinach na drodze glikozydacji i kondensacji polifenoli.

Różne związki hamujące wzrost roślin wykryto w liściach, koleoptylach, źdźbłach, łodygach, bulwach, pąkach, korzeniach, owocach, nasionach, pręcikach, pyłku i wielu innych organach i tkankach roślinnych. Najlepiej został zbadany pewien charakterystyczny inhibitor występujący w liściach (Robinson i Wareing 1964, Sarapuu 1965), pąkach (Vegis 1964, Wareing i in. 1964) oraz owocach (Varga 1957 a i b). Jest to substancja o odczynie kwaśnym, rozpuszczalna w eterze dwuetylowym, etanolu, benzenie i wodzie. Hamuje ona kiełkowanie i wzrost elongacyjny pędów i korzeni. Jej aktywność może być oznaczana testem wycinków koleoptyla owsa (Hemberg 1961). Przy zastosowaniu rozdzielacza chromatograficznego, w układzie izopropanol — amoniak — woda (10 : 1 : 1), związek ten wykazuje  $R_f$  w granicach 0,55—0,80. Jego budowa chemiczna do chwili obecnej nie została jeszcze



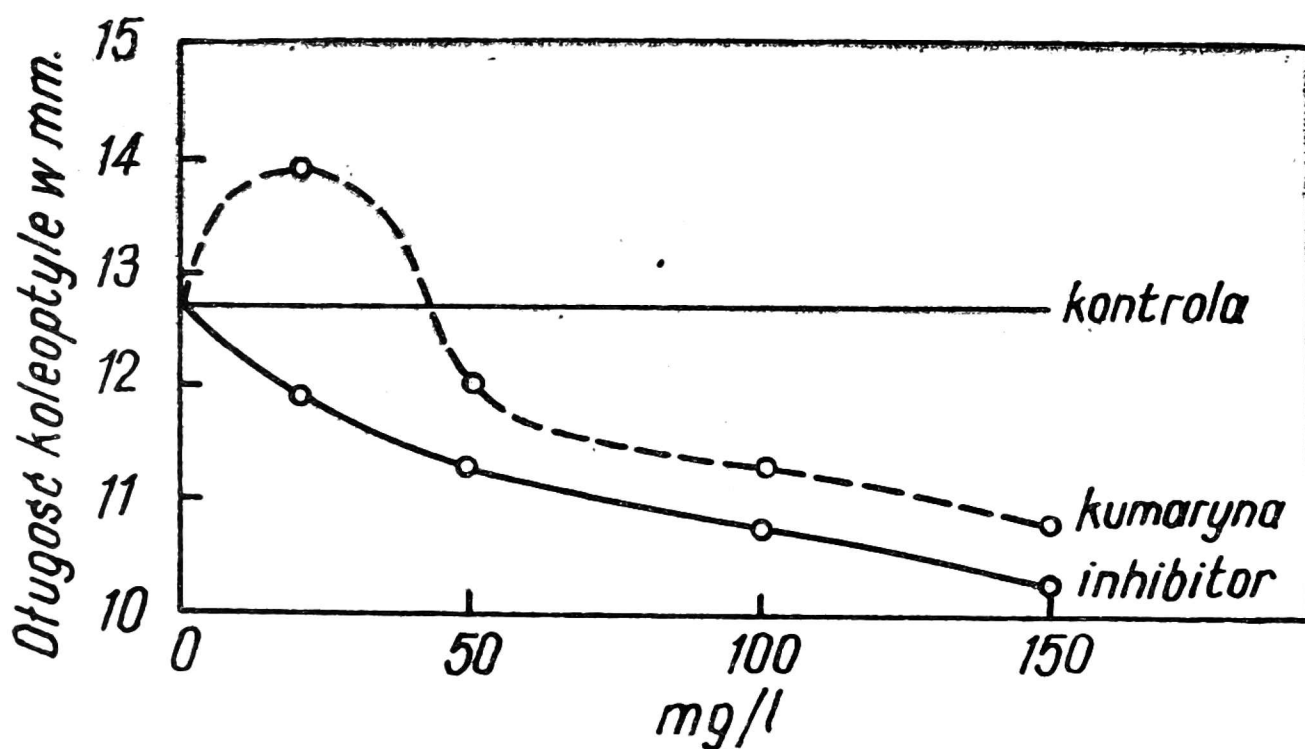




Rys. 11. Florydzyzna i jej przemiany w liściu jabłoni (wg Sarapuu, 1965)

poznana. Prawdopodobnie jest to mieszanina kwasów aromatycznych, niektórych laktonów i flawonoidów (Bennet-Clark i Kefford 1953, Lane i Bailey 1964, Robinson i Wareing 1964). Omawiany inhibitor nazwany został kompleksem  $\beta$ -inhibitorów, lub po prostu  $\beta$ -inhibitorem. W odróżnieniu od inhibitorów o znanej budowie chemicznej nie wywołuje on stymulacji wzrostu przy małych stężeniach. Działanie jego jest silniejsze, niż najbardziej aktywnych znanych inhibitorów wzrostu (rys. 12). Właściwość tę należy tłumaczyć synergicznym działaniem kilku związków, z których prawdopodobnie inhibitor ten się składa. Przypuszcza się ponadto, że skład  $\beta$ -inhibitora jest zmienny i zależy od gatunku rośliny. Próby chemicznego zidentyfikowania  $\beta$ -inhibitora z liści jabłoni dokonał Sarapuu (1965).

Omawiany inhibitor jest jednym z najczęściej spotykanych inhibitorów w roślinach wyższych. Varga i Ferenczy (1956) wykryli stosunkowo duże jego ilości w so-



Rys. 12. Aktywność  $\beta$ -inhibitora i kumaryny. Test koleoptyle owsa (wg Robinsona i Wareinga, 1964)

ku owoców licznych gatunków, Lane i Bailey (1964) stwierdzili obecność aktywnego  $\beta$ -inhibitora w pąkach klonu, Robinson i Wareing (1964) badali  $\beta$ -inhibitor liści brzozy. Obecność  $\beta$ -inhibitora stwierdzono ponadto w pąkach różnych innych roślin. Występowanie tego związku w nasionach było zaledwie sygnalizowane (Ching i Foote 1961, Miyamoto i in. 1961, Wareing i in. 1964). Obecnie wiadomo już, że tego typu związki odgrywają ważną rolę w wywoływaniu spoczynku różnych organów roślinnych (Luckwill 1952).

W ostatnich latach, kiedy zaczęły się mnożyć doniesienia o wykryciu coraz to nowych, często bliżej nieokreślonych inhibitorów, zainteresowania badaczy skierowały się w stronę dokładniejszego poznania tych związków. Jednocześnie podejmowane były próby wyjaśnienia, jakie to są związki i jaką spełniają funkcję w organizmie roślinnym. Wiele z tych substancji zostało wyizolowanych i zidentyfikowanych.

#### *Rola i działanie inhibitorów wzrostu*

Badania z zakresu występowania i zmiennej aktywności inhibitorów upoważniają do wniosku, że zawartość tych związków w tkankach roślinnych wykazuje sezonową rytmikę, korelującą ze stanem fizjologicznym tkanek. Nasuwa to myśl, że związki te biorą czynny udział w indukcji spoczynku organów oraz w indukcji fotoperiodycznej. Przepuszczenia te zostały potwierdzone doświadczalnie.

Blommaert (1954), Varga i Ferenczy (1956) oraz Hemberg (1961) wykazali, że zmiany aktywności  $\beta$ -inhibitora, występującego w skórcie bulwy ziemniaka, korelują z aktywnością fizjologiczną bulwy: inhibitor zanikał, gdy bulwy wychodziły ze stanu spoczynku. Zanikanie inhibitora odbywa się również przy sztucznym

przerywaniu spoczynku za pomocą chloroetanolu. Podobnym zmianom ulegają inhibitory w pąkach drzew (Lane i Bailey 1964, Wareing i in. 1964).

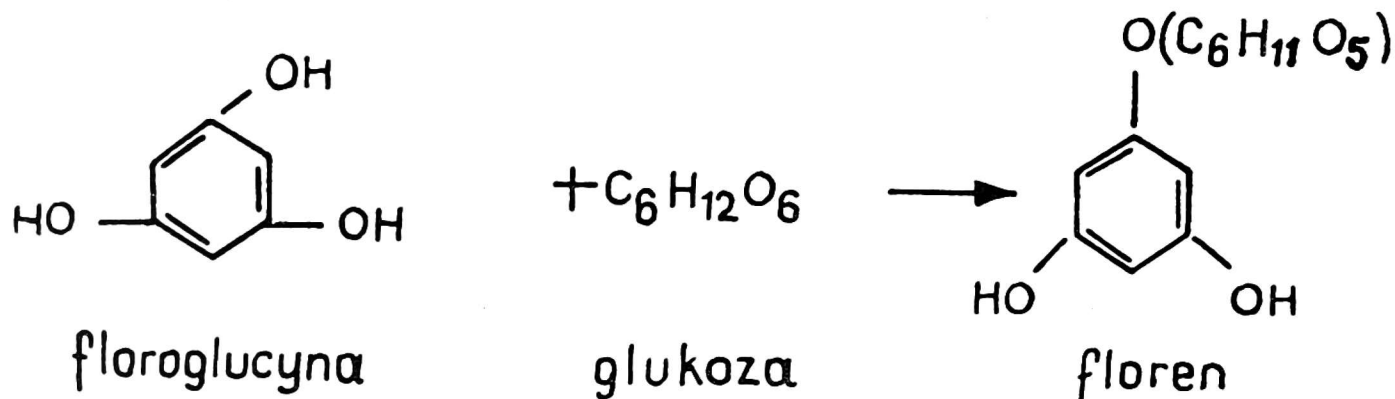
Udział inhibitorów w indukcji spoczynku pąków drzew związany jest z fotoperiodyzmem roślin. Wiadomo, że powstawanie pąków spoczynkowych u drzew jest determinowane warunkami świetlnymi liści. Już to stwierdzenie sugeruje myśl, że z liści przebywających w warunkach dnia krótkiego (KD) przenika do pąków czynnik hamujący ich wzrost. Sugestia ta znalazła potwierdzenie w ścisłych biochemicznych badaniach (Sarapuu 1965). Stwierdzono mianowicie, że w liściach jabłoni w okresie późnego lata i wczesnej jesieni nagromadzają się duże ilości dihydrohaukonu (flawonoidu) zwanego florydzyną (rys. 11). Związek ten jest silnym inhibitorem wzrostu elongacyjnego, może on całkowicie neutralizować działanie auksyn, a ponadto hamuje on także proces oddychania oraz proces fosforylacji oksydacyjnej, w wyniku czego przerwana zostaje synteza kwasów nukleinowych (KN) i białek.

W okresie poprzedzającym opadanie liści florydzyzna w liściach zanika, a zwiększa się jej stężenie w pędach. Jednocześnie w liściach gromadzi się zwiększona ilość floretyny. Można więc przypuszczać, że pod koniec okresu wegetacji florydzyzna w liściach ulega deglikozydacji na floretynę, zaś floretyna ta wędruje do pędów, gdzie znów ulegając glikozydacji tworzy florydzynę. Po opadnięciu liści, w okresie głębokiego spoczynku pąków, enzym rozkładający florydzynę nie przejawia prawie żadnej aktywności (Sarapuu, 1965) i zawartość florydzyzny w tkankach utrzymuje się na stałym mniej więcej poziomie. Pod wpływem obniżonych temperatur zawartość florydzyzny w pędach i pąkach szybko się zmniejsza, natomiast wzrasta zawartość ligniny, w skład której wchodzi kwas floretynowy, będący pochodną florydzyzny. Kwas floretynowy może z jednej strony być gromadzony jako komponent ligniny, z drugiej zaś strony w stanie wolnym może przejawiać w obecności KN stymulację wzrostu. Jako stymulator zdolny jest on do neutralizowania hamującego działania florydzyzny. Jest to więc ciekawy przykład przemiany inhibitora w stymulator oraz odkładania substancji fizjologicznie czynnej w postaci związku fizjologicznie obojętnego. Przemiany florydzyzny uzależnione są od zmian oświetlenia. W liściach intensywna synteza tego związku zachodzi tylko na świetle. W warunkach dobrego oświetlenia odbywa się także w liściach deglikozydacja florydzyzny, w wyniku czego powstaje łatwo przemieszczająca się floretyna, która może stymulować wzrost embrionalny. Natomiast w ciemności florydzyzna rozpada się na kwas floretynowy, który jest stymulatorem wzrostu elongacyjnego. Działa on synergicznie w stosunku do IAA.

Inhibitor — florydzyzna szczególnie w dużych ilościach występuje w liściach i kory drzew. Przez niektórych autorów (Sarapuu 1965) jest on utożsamiany z inhibitorem  $\beta$ . Pomimo występowania florydzyzny w tkankach niekiedy w dużych stężeniach, wzrost tych tkanek jest możliwy, dzięki ciągłym przemianom florydzyzny i utrzymywaniu się stanu równowagi między florydzyną — inhibitorem a jej pochodnymi — stymulatorami i auksynami. Zjawiska takie w przyrodzie są dość

częste. Znane są na przykład przemiany inhibitora — kwercytny w substancje stymulujące — antocyjany. Tego typu związki tworzą więc w roślinach układy o dużej wrażliwości na różne zmiany warunków zewnętrznych.

Wspomniane wyżej przemiany można łatwo uzyskać również w warunkach laboratoryjnych. Jeżeli na przykład do liścia wprowadzona zostanie z zewnątrz trójfenolofloroglucyna (słaby inhibitor) razem z glukozą, to już po 24 godz. ekspozycji na światło zachodzi glikozydacja i tworzy się floren, komponent fizjologicznie czynnej florydzy (rys. 13). Podobną glikozydację można uzyskać stosując rezorcynę lub hydrochinon.



Rys. 13. Powstawanie florenu z floroglucyny i glukozy

Potwierdzenie przemian inhibitorów wzrostu przy różnym fotoperiodzie uzyskał Wareing i in. (1964) w badaniach nad transmisją czynnika inhibitującego z liści do pąków. W doświadczeniach tych wystawienie brzozy na dzień krótki (KD) powodowało przechodzenie pąków w stan spoczynku. Warunki dnia długiego (DD) wywoływały nabrzmiewanie pąków bocznych, a następnie wznowienie przez nie wzrostu. W doświadczeniach, w których pąki brzozy eksponowano na DD, a liściom stworzono warunki KD, pąki pozostawały w spoczynku; jeśli natomiast pąki były na KD, a liście na DD, to pąki nie popadały w spoczynek.

U roślin drzewiastych w ogóle stwierdzono więcej inhibitorów w liściach przebywających na KD, niż na DD. Gromadzenie się więc inhibitorów w liściach jest zjawiskiem poprzedzającym popadanie pąków w stan spoczynku (Wareing i in. 1964).

Inhibitor otrzymany przez Wareinga i in. (1964) z liści brzozy hamował zarówno wzrost koleoptyla owsa, jak i siewek oraz pąków brzozy. Związek ten indukował także popadanie pąków w spoczynek. Odpowiednia dawka kwasu giberelinowego ( $GA_3$ ) całkowicie to jego działanie neutralizowała.

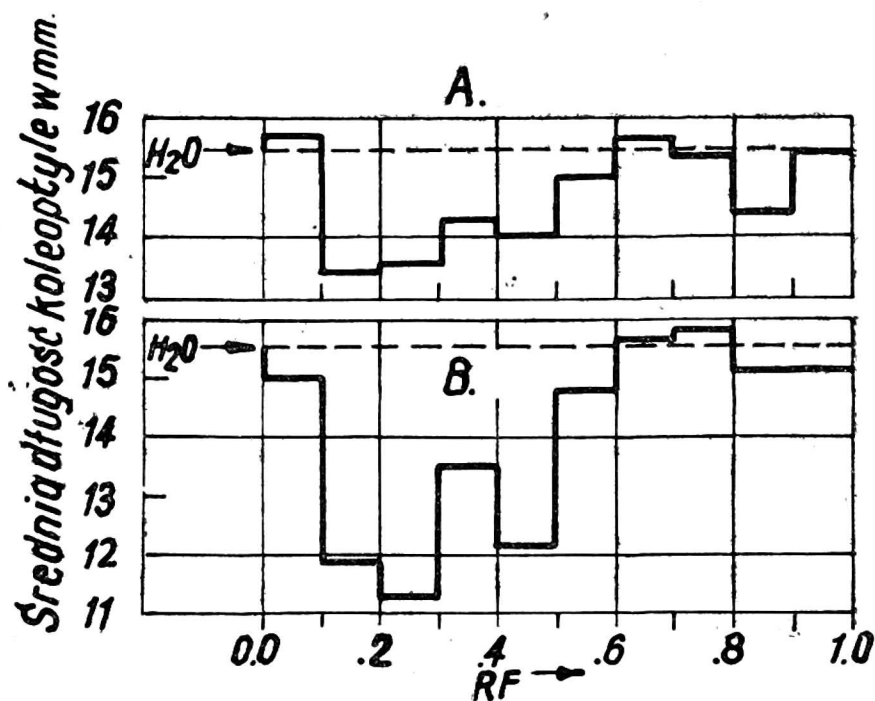
Tak więc na podstawie dotychczas przeprowadzonych badań można przypuszczać, że jesienny spoczynek drzew jest uwarunkowany działaniem inhibitora powstającego w warunkach dnia krótkiego w liściach i przemieszczający się przed ich opadnięciem do pędów zimujących. Inhibitor ten został wyizolowany i utożsamiony z  $\beta$ -inhibitorem.

W świetle wyżej przytoczonych danych nasuwa się pytanie czy naturalne inhibitory wzrostu spełniają także rolę regulatorów spoczynku nasion? Każda ogólna

teoria spoczynku musi brać pod uwagę duże podobieństwo pomiędzy spoczynkiem pąków niektórych roślin drzewiastych i spoczynkiem nasion licznych gatunków roślin, a szczególnie tych, które do przełamania spoczynku wymagają działania niskich temperatur.

Nasiona brzozy (*Betula verrucosa*) kiełkują tylko na świetle. Przy temperaturze 15° C wykazują one zjawisko fotoperiodyzmu, objawiające się większą zdolnością kiełkowania na dniu długim niż na krótkim. Nasiona poddane działaniu niskich temperatur kiełkują dobrze również i w ciemności, natomiast bez tego zabiegu lub bez dostępu światła nie kiełkują w ogóle. Zamoczenie nasion brzozy w roztworze GA<sub>3</sub> przerywa ich spoczynek. Działanie GA<sub>3</sub> indukujące wzrost można także obserwować na pąkach spoczynkowych brzozy.

Przytoczone dane sugerują, że mechanizm spoczynku nasion i pąków *Betula verrucosa* jest taki sam lub bardzo podobny. Szukając dowodów popierających tę hipotezę, wyizolowano inhibitor z okryw nasiennych brzozy i stwierdzono, że jest to  $\beta$ -inhibitor analogiczny do związku występującego w pąkach brzozy. Na świetle inhibitor ten traci całkowicie swoją aktywność. Uszkodzenie mechaniczne okryw nasiennych, lub umieszczenie nasion w atmosferze wzbogaconej tlenem, pobudza nasiona do kiełkowania nawet w ciemności. Aktywność inhibitora jest więc związana z małym natlenieniem tkanek (rys. 14).



Rys. 14. Chromatogramy wodnych ekstraktów nasion *Xanthium* przetrzymywanych w czystym tlenie (A) i w powietrzu (B) (wg Wareinga, 1965)

U wielu gatunków drzew zawartość inhibitorów wzrostu w pąkach zmniejsza się systematycznie w czasie zimy i najmniejsza jest w okresie poprzedzającym wiosenny rozwój pąków. Również w nasionach wielu gatunków roślin (jabłoń, jesion, buk) stwierdzono, że obniżona temperatura i odpowiednia wilgotność (stratyfikacja) powoduje rozkład inhibitorów. W miarę zanikania inhibitorów pod wpływem niskiej temperatury gromadzą się w organach spoczynkowych stymulatory (np. gibbereliny, auksyny, kininy).

Hipoteza spoczynku, wywołanego działaniem inhibitorów, nie zyskała sobie jeszcze ogólnego uznania. Jest ona również obiektem pewnych krytyk. Na przykład Burton (1956) badając serię odmian ziemniaka, zróżnicowanych pod względem głębokości spoczynku, nie stwierdził korelacji między głębokością spoczynku a zawartością inhibitorów. Buch i Smith (1959) działając na rosnące pędy ziemniaka inhibitorami otrzymanymi z bulw spoczynkowych nie mogli wywołać spoczynku tych pędów. Housley i Taylor (1958) uważają zaś, że inhibitory znajdujące się w skórce bulwy ziemniaka nie hamują wzrostu pąków tej bulwy. Ich hamujące działanie na test owsiany jest wynikiem przypadkowego raczej nagromadzenia w skórce bulwy związków fenolowych.

Przytoczone niektóre publikacje, próbujące podważyć hipotezę spoczynku inhibitorowego, należy jednak uważać za wynik niedokładności badawczych. Współczesna metodyka badań wykazuje bezspornie, że inhibitory wzrostu są jednym z głównych czynników wywołujących spoczynek pąków i nasion.

Mechanizm działania inhibitorów wzrostu nie został jeszcze całkowicie wyjaśniony i przedstawiony w formie ogólnej teorii, czy choćby hipotezy. Istnieją już jednak liczne obserwacje i doświadczenia, wskazujące, że działanie inhibitorów może być różnorakie.

1. Pewne inhibitory fenolowe, lub ich tlenowe pochodne (chinony) mogą wiązać auksyny w nieczynne związki kompleksowe. Kompleksy te pod wpływem oddziaływań środowiska mogą z kolei ulec rozkładowi (Mietlickij, Korablewa, 1965).

2. Pewne inhibitory natury fenolowej inaktywują działanie enzymów, szczególnie zaś enzymów biorących udział w metabolizmie cukrowcowym (Hemberg 1961, Mietlickij i Korablewa 1965).

3. Naturalne inhibitory wzrostu hamują w roślinach fosforylację oksydacyjną, w wyniku czego utrudniona lub zahamowana jest synteza ATP, co doprowadza do deficytu energii (wiązań makroergiczych) niezbędnych w procesach wzrostowych (Steilind 1963, Steilind i Saddik 1962, Mietlickij i Korablewa 1965). Często zatrzymaniu fosforylacji towarzyszy gromadzenie się w roślinach fosforu nieorganicznego i powstrzymanie rozpadu fityny w nasionach. W tym wypadku schemat regulacji wzrostu przedstawiałby się jak na rys. 15.

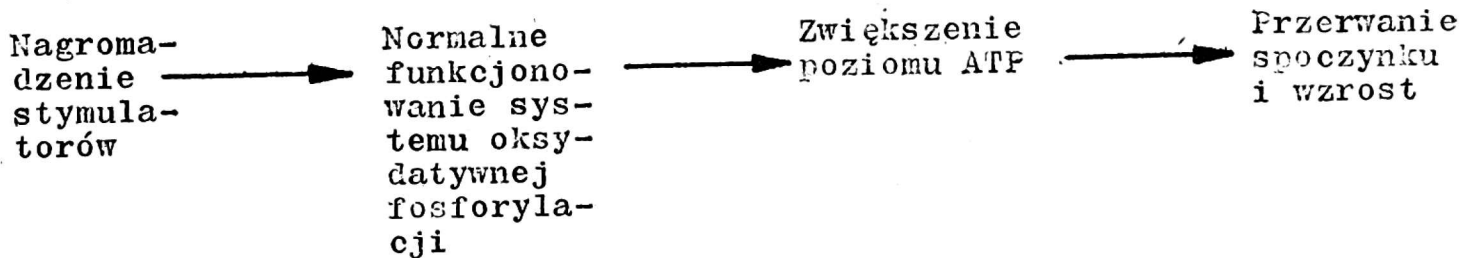
4. Inhibitory wzrostu wywierają bardzo duży wpływ na metabolizm kwasów nukleinowych i białek (Mayer i Poljakoff-Mayber, 1963). Głębokość spoczynku organów roślinnych jest dość ściśle uzależniona od zawartości kwasów nukleinowych (Vegis 1964, Mietlickij i Korablewa 1965). Podczas spoczynku zawartość DNA i RNA jest mała, natomiast w miarę jego ustępowania — wzrasta.

5. Okresowe przechodzenie organów roślinnych (roślin) w stan spoczynku jest w większości wypadków właściwością dziedziczną. Należy więc sądzić, że zmiany metaboliczne, prowadzące do wytworzenia inhibitorów i spoczynku podlegają jakiejś kontroli genetycznej (Bonner 1965, Szafranski i Klita 1965). Hipotetyczny schemat genetycznej kontroli syntezy białek został opracowany na przykładzie bakterii. Przyjmując jednak założenie o podobieństwie struktury genetycznej

## I. Spoczynek

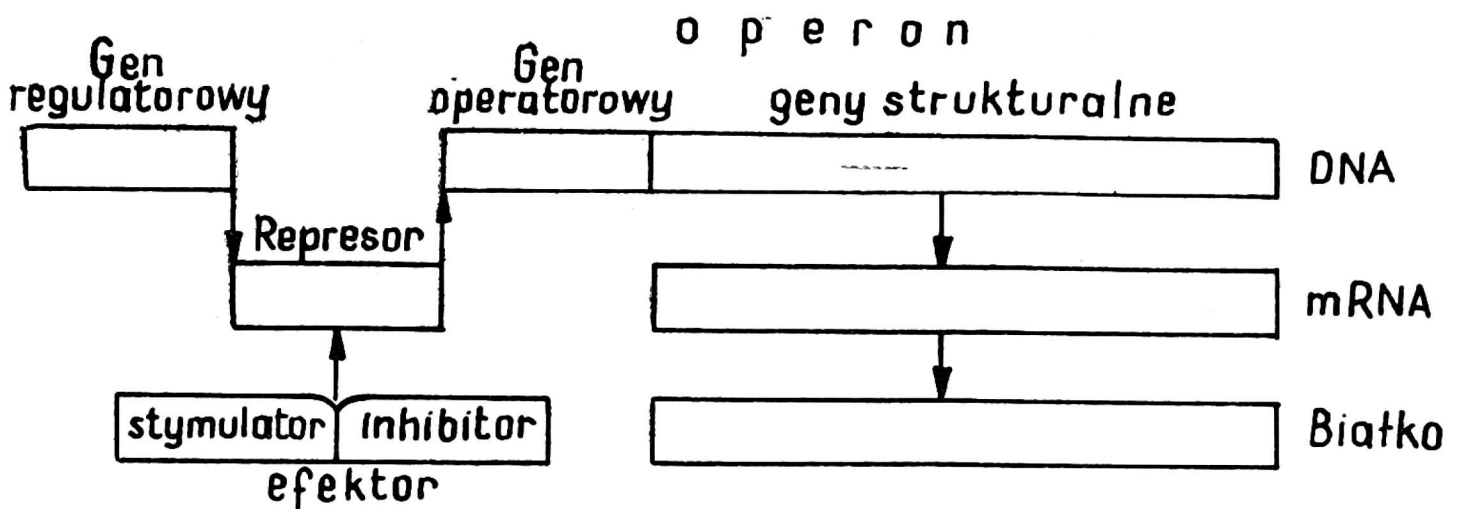


## II. Aktywny wzrost.



Rys. 15. Schemat regulacji wzrostu roślin znajdujących się w stanie spoczynku (I) i w stanie aktywnego wzrostu (II) (wg Kefeli'ego i Tureckiej 1964)

wszystkich organizmów żywych, można przypuszczać, że i u roślin schemat jest podobny (rys. 16). Rola regulatorów wzrostu sprowadzałaby się wówczas do roli efektora.



Rys. 16. Schemat udziału regulatorów wzrostu w procesie syntezy białka

W przytoczonym schemacie (rys. 16) szereg genów strukturalnych obejmujących określony odcinek DNA tworzy, łącznie z genem operatorowym, tzw. operon. Główną funkcją operonu jest synteza m-RNA i dalej białek. Funkcjonowanie jednak operonu uzależnione jest od stanu genu operatorowego. Jeśli operator jest otwarty, to geny strukturalne wytwarzają m-RNA, odpowiednie białka i enzymy. Jeśli operator zostanie zablokowany, to proces syntezy białek ustaje. Zamknięcie operonu następuje wówczas, gdy jego operator połączy się z określonym i aktywnym represorem. Represor zaś jest z kolei produktem genu zwanego regulatorem, a jego aktywność uwarunkowana jest przez specyficzny metabolit zwany efektem (rys. 16). Odpowiedni efektor może aktywować działalność represora, powodując zamknię-

cie operonu i powstrzymanie jego funkcji (rys. 16), lub odwrotnie — inny efektor może zahamować działalność represora, umożliwiając tym realizację informacji zawartych w operonie, a więc odpowiednią syntezę białek (Szafranski i Klita, 1965). Efektorami zaś mogą być inhibitory i stymulatory wzrostu.

W świetle przytoczonej hipotezy, proces wzrostu i różnicowania się komórek w roślinach jest procesem rozwinięcia (w czasie) specyficznego dla gatunku modelu syntezy białka. Realizacja tego modelu odbywa się między innymi poprzez okresowe blokowanie niektórych genów.

Zdaniem Tauana i Bonnera (1964) bezpośrednią przyczyną stanu spoczynkowego niektórych organów roślinnych (np. pąków śpiących, bulw ziemniaka) jest zahamowanie aktywności pewnych genów i w wyniku zatrzymanie syntezy m-RNA i białek.

Przytoczone schematy i hipotezy wewnętrznej regulacji wzrostu roślin należy przyjmować z dużą ostrożnością. Niemniej jednak wszystkie dane (Grzesiuk i Rejowski 1963, Michniewicz i Kopcewicz 1966) wskazują, że system regulacji jest co najmniej dwustronny, a układy stymulatory  $\leftrightarrow$  inhibitory odgrywają w nim główną rolę. Działalność stymulatorów i inhibitorów zależy z kolei zarówno od czynników wewnętrznych jak i wpływów środowiska.

#### LITERATURA

1. Bardinskaja M. N., Szubert T. A., 1962. *Biochimia*, nr 1: 58—64.
2. Barton L. V., 1965. *Handbuch der Pflanzenphysiologie*, 15: 727—745.
3. Bennet-Clark T. A., Kefford N. P., 1953. *Nature*, 171: 645—647.
4. Bentley J. A., Housley S., 1954. *Physiol. Plant.*, 7: 405—419.
5. Blommaert K. L. J., 1954. *Nature*, 174: 970—972.
6. Bonner J., 1965. *The molecular biology of development*. Oxford.
7. Buch M. L., Smith O., 1959. *Physiol. Plant.*, 12: 706—715.
8. Burton W. G., 1956. *Physiol. Plant.*, 9: 567—587.
9. Ching T. N., Foote W. H., 1961. *Agron. J.*, 53/3/: 183—186.
10. Davison R. M., 1965. *Austr. J. Biol. Sci.*, 18/3/: 475—486.
11. Eckstein Z., 1965. *Post. Nauk Roln.*, 1: 107—112.
12. Evenari M., 1965. *Handbuch der Pflanzenphysiologie*, 15: 804—847.
13. Ferenczy L., 1957. *Acta Biologica*, 8/1/: 31—37.
14. Grzesiuk S., 1967. *Fizjologia nasion*. PWRiL. Warszawa (w druku).
15. Grzesiuk S., Rejowski A., 1963. *Post. Nauk Roln.*, nr 6/84/: 3—24.
16. Guern J., 1964. *Regulateurs Naturels de la Croissance Végétale. Remarques a propos des methodes d'extraction, de purification et d'identification des inhibiteurs de croissance*, 353—362 (*Colloques Internat. du Centre Nat. Rech. Scient.* 15—20 Juliet 1963).
17. Hemberg T., 1961. *Handbuch der Pflanzenphysiologie*, 14: 1163—1184.
18. Housley S., Taylor W. C., 1958. *J. Exp. Bot.*, 9: 458—471.
19. Ibrahim R. K., Towers G. H., 1960. *Arch. Biochem. Biophys.*, 87/1/: 125—128.
20. Kefeli W. J., Tureckaja R. Ch., 1964. *Uspiechi Sowrem. Bioł.*, 57/1/: 99—114.
21. Khan A. A., 1966. *Planta*, 68: 83—87.
22. Knypl J. S., 1965. *Post. Nauk Roln.*, nr 6/96/: 31—50.
23. Kolesnikow D. A., Zore S. W., 1962. *Fizjoł. Rast.*, 9/4/: 454—460.
24. Koves E., 1957. *Acta Biol. Szeged.*, 3: 179—187.



25. Lane F. E., Bailey L. F., 1964. *Physiol. Plant.*, 17/1/: 91—99.
26. Linser H., 1951. *Planta*, 39: 377—401.
27. Luckwill L. C., 1952. *J. Hort. Sci.*, 27: 53—65.
28. Luckwill L. C., 1957. *J. Hort. Sci.*, 32:18—33.
29. Mayer A. M., Poljakoff-Mayber A., 1963. *The germination of seeds*. Oxford.
30. Meyer E., 1950. *Planta*, 38: 213—232.
31. Michniewicz M., Kopcewicz J., 1966. *Roczniki Nauk Rolniczych*, 90-A-4: 690—698.
32. Mietlickij L. W., Korablewa N. P., 1965. *Biochimia pokoja zapasajuszczich organow rastienij*. Moskwa.
33. Miyamoto T., Tolbert N. E., Everson E. H., 1961. *Plant Physiol.*, 36/6/: 739—746.
34. Molisch H., 1922. *Pflanzenphysiologie als Theorie der Gärtnerei*. Jena.
35. Murakami Y., 1959. *Bot. Mag. (Tokyo)*, 75/848/: 36—43.
36. Nooden L. D., Thiman K. V., 1966. *Plant. Physiol.* 41: 157—164.
37. Remy P., 1961. *Ann. Amelior. Plantes*, 11/2/: 113—298.
38. Robinson P. M., Wareing P. F. *Phys. Plant.*, 17: 314—323.
39. Sarapuu L. P., 1965. *Fizjoł. Rast.*, 12/1/: 134—145.
40. Snow R., 1939. *Nature*, 144: 906.
41. Stenlind G., 1963. *Physiol. Plant.* 16: 110.
42. Stenlind G., Saddik K., 1962. *Physiol. Plant.*, 15: 369—373.
43. Szafranski P., Klita S., 1965. *Post. Bioch.*, 11/4/: 459—484.
44. Tomaszewski M., 1960. *Post. Bioch.*, 4/3/: 357—373.
45. Tuan D. V. H., Bonner J., 1964. *Plant Physiol.*, 39/5/: 768—772.
46. Tureckaja R. Ch., Kefeli W. J., 1963. *Fizjoł. Rast.*, 10/1/: 98—104.
47. Varga M., 1957a. *Acta Biologica*, 8/1/: 39—47.
48. Varga M., 1957b. *Acta Biol. Szeged.*, 3/3—4/: 225—232.
49. Varga M., 1957c. *Naturwissenschaften*, 44: 398—399.
50. Varga M., Ferenczy L., 1956. *Nature*, 178: 1075.
51. Vegis A., 1964. *Ann. Rev. of Plant Physiol.*, 15: 185—224.
52. Wareing P. F., 1965. *Handbuch der Pflanzenphysiologie*, 15: 909—924.
53. Wareing P. F., Eagles C. F., Robinson P. M., 1964. *Regulateurs naturels de la croissance végétale. Natural inhibitors as dormancy agents*, 377—386 (*Colloques Internat. du Centre Nat. Rech. Scient.* 15—20 Juillet 1963).