

TERESA KENTZER

KRYTYCZNE UWAGI O METODYCE BADAŃ REGULATORÓW WZROSTU ROŚLIN

Nauka o regulatorach wzrostu roślin, zapoczątkowana wyodrębnieniem auksyn przez Wenta, oraz zbadaniem struktury chemicznej tych związków przez Kögla i współpracowników rozwinęła się obecnie w specjalną gałąź fizjologii roślin. Ogromna ilość prac, jaka ukazuje się z tej dziedziny, świadczy o rosnącym ciągle zainteresowaniu tym problemem.

Zagadnienie substancji wzrostowych nabrało tak szczególnej wagi ze względu na rolę jaką spełniają one w organizmach roślinnych. Mimo jednak licznych prac nad tym zagadnieniem nie wyjaśniono jeszcze dotąd w pełni mechanizmu działania tych substancji, jak również właściwego charakteru i struktury chemicznej tych związków.

Od czasu rewelacyjnych odkryć Kögla i współpracowników, we wszystkich podręcznikach fizjologii roślin, aż do chwili obecnej, wymienia się trzy zasadnicze rodzaje tych związków: auksynę a — jednozasadowy kwas o stosunkowo prostej budowie ($C_{18}H_{32}O_5$) zidentyfikowany jako kwas auksentriolowy i bardzo zbliżony do niej związek — auksynę b ($C_{18}H_{30}O_4$) — kwas auksenolowy oraz heteroauksynę, również kwas, jednak o odmiennym składzie chemicznym ($C_{10}H_9O_2N$), który zidentyfikowano jako znany już wówczas dobrze kwas indolooctowy. Zasadniczą cechą obu form auksyny, jak stwierdzono w wyniku późniejszych badań, była ich spontanicznie postępująca inaktywizacja, polegająca na przejściu tych związków w nieaktywną postać, izomeryczną pseudoauksynę a i b (Went i Thimann 1937). Inaktywizacji ulega także kwas 3-indolooctowy, który utlenia się pod wpływem działania swoistej oksydazy. Wetmore i Morel 1949 (38) zjawisko inaktywizacji auksyn łączą z działalnością oksydazy polifenolowej. Można przypuszczać, że zjawisko szybko postępującej inaktywizacji auksyny a i b stanowi prawdopodobnie jedną z zasadniczych przyczyn utrudniających ich identyfikację, ponieważ wszelkie próby bezpośredniego potwierdzenia obecności tych związków nawet w materiale, w którym zostały one zidentyfikowane po raz pierwszy przez swych odkrywców, nie dały dotąd pozytywnych rezultatów. W związku z tym istnienie auksyny a i b należy uważać obecnie za bardzo problematyczne. Próby pośrednie identyfikacji tych związków, oparte na określaniu ich odporności na działanie kwasów, zasad oraz oznaczaniu ich ciężaru cząsteczkowego nie dały również przekonujących dowodów (Bonner i Bandurski 1952, Terpstra 1953) (14). Podobnie bezowocne okazały się również próby innych badaczy, zmierzające do wyizolowania i zidentyfiko-

wania auksyny a i b (Jones i wsp. 1952, Söding i Raadts 1953, Bennet-Clark i wsp. 1952, Terpstra 1953 (14).

Badania lat ostatnich wykazały natomiast, że najbardziej rozpowszechnionymi związkami typu regulatorów wzrostu są związki indolowe, jak: kwas 3-indoloocetowy, aldehyd 3-indoloocetowy, nityl kwasu 3-indoloocetowego i kwas 3-indolopirogronowy. W wyniku szczegółowych badań stwierdzono, że kwas 3-indoloocetowy występuje w roślinie w stanie wolnym w minimalnych tylko ilościach. Związek ten istnieje w formie nieczynnej, w powiązaniu z kompleksami białkowymi, z których jest uwalniany dopiero w procesie pewnych reakcji enzymatycznych. Produktem wyjściowym dla tego kwasu jest tryptofan (Thimann 1935). Obok wyżej wymienionych związków wyodrębnionych i zidentyfikowanych już niejednokrotnie stwierdzano istnienie innych jeszcze substancji o podobnej aktywności fizjologicznej, których struktura i skład chemiczny nie są jeszcze bliżej określone (Luckwill 1952, 1954, Söding 1954, Schoen i Morel 1954).

Ilości w jakich występują naturalne regulatory wzrostu w roślinie są stosunkowo niewielkie. Fakt ten stanowi poważną przyczynę utrudniającą badanie tych związków i nie pozwala na ich wykrycie za pomocą zwykłych metod chemicznych. Przeprowadzone w tym zakresie badania wykazały, że przy zastosowaniu najczulszej metody chemicznej możliwe jest oznaczenie ilości kwasu 3-indoloocetowego zaledwie rzędu $2 \text{ mg} (= 2 \times 10^{-6} \text{ g})$, co w porównaniu z biologiczną metodą oznaczania aktywności regulatorów wzrostu stanowi zaledwie 1/2000 czułości testu owsianego (Audus 1953). Badania w zakresie ilościowych stosunków czynnej substancji w roślinie wykazały natomiast, że ze ściętego wierzchołka koleoptyle dyfunduje do agaru w ciągu jednej godziny ilość substancji aktywnej odpowiadająca zaledwie $4 \times 10^{-8} \text{ g}$ heteroauksyny.

Naturalne substancje wzrostowe można wyizolować w drodze ich dyfuzji do agaru i badać bezpośrednio na testach biologicznych. Można je również określać metodą biologiczną w ekstraktach z różnego materiału roślinnego, wykorzystując różną ich rozpuszczalność w odpowiednio dobranym rozpuszczalniku, jak: alkohol, chloroform, eter itp.

Metoda bezpośredniej dyfuzji do agaru obok wielu zalet ma jednak również pewne strony ujemne. Najistotniejszą z nich jest zjawisko inaktywizacji czynnej substancji wzrostowej, zachodzące w wyniku działania enzymów na powierzchni cięcia badanego fragmentu tkanki (Kornmann 1935, Larsen 1936, 1940, Gorter i Funke 1937, Syre 1938). Dlatego też w metodzie tej stosuje się obecnie szereg dodatkowych czynności, zmierzających do wyeliminowania tego zjawiska. Spośród nich wymienić należy próby splukiwania powierzchni cięcia danego fragmentu tkanki (Söding 1952). Overbeek (1938), celem usunięcia niszczącego systemu enzymatycznego, stosował uprzednią dyfuzję do bibuły filtracyjnej, inni natomiast (Steeves, Morel i Wetmore 1953),

Terpstra 1953 (13), prowadzili badania nad możliwością użycia pewnych związków chemicznych jak cyjanku potasu i soli sodowej dwuetylowego amidu kwasu dwutlenowego niszczących enzymy, co doprowadzało w efekcie do zwiększenia aktywności dyfuzatu.

Rozpatrując z kolei metodę ekstrakcji badanego materiału roślinnego na drodze chemicznej, należy stwierdzić, że budzi ona również wiele zastrzeżeń. Zastrzeżenia te wynikają przede wszystkim z długotrwałości procesów ekstrakcji. Poza tym sama ekstrakcja stanowi bardzo złożony proces chemiczny, w którym dopiero poprzez wielokrotne oczyszczanie surowego ekstraktu roślinnego uzyskujemy wolne substancje wzrostowe i jako takie dopiero możemy określać metodą biologiczną. W czasie samej ekstrakcji zachodzi również niebezpieczeństwo powstania heteroauksyny z tryptofanu, w wyniku działania enzymów biorących udział w reakcjach zachodzących w procesach oczyszczania ekstraktu.

Inna jeszcze trudność polega na tym, że ekstrakty takie zawierają ponadto szereg substancji hamujących, co zaciera właściwy obraz oddziaływania systemu roślinnych regulatorów wzrostu.

Jak wiadomo zasada stosowania testów biologicznych polega na zjawisku stymulacji lub hamowaniu procesów wzrostowych badanego obiektu roślinnego, uwarunkowanych istnieniem całego systemu regulatorów wzrostu, których działanie łączy się zarówno ze zmianą metabolizmu całej plazmy komórkowej (Pohl 1954), jak również wtórnym ich wpływem na błonę komórkową (Bonner 1935, Ruge 1937, 1937a, 1942, Pohl 1954). Dlatego też zrozumiałe jest, że najbardziej wrażliwe na działanie substancji wzrostowej będą młode obiekty roślinne pozostające w stanie aktywnego wzrostu. Spośród szeregu przebadanych pod tym względem roślin wyselekcjonowano koleoptyle traw, a zwłaszcza owsa, jako najbardziej czuły materiał testowy.

Pierwszą klasyczną metodą oznaczania aktywności regulatorów wzrostu opartą na zasadzie reakcji wzrostowych koleoptyle owsa opracował Went 1928 (2). Z uwagi na to, że stanowi ona punkt wyjściowy dla szeregu innych metod opartych na tej samej zasadzie, wydaje się celowe jej szczegółowe omówienie. Jako obiektu testowego używał Went etiolowanych kielków owsa (Victory oats), hodowanych w ściśle określonych warunkach temperatury i wilgotności. Po uzyskaniu przez nie pewnej określonej długości ścinał wierzchołki pochewek liściowych około długości 3 mm usuwając w ten sposób naturalne źródło czynnej auksyny. Stwierdzenie to, stanowiące podstawowe założenie metody, doprowadziło jak wiadomo w początkowej fazie badań nad zagadnieniem substancji wzrostowych do sformułowania zasadniczego poglądu o istnieniu w wierzchołkach koleoptyle czynnej substancji, która przemieszcza się ku podstawie koleoptyle, umożliwiając jego wzrost. Zdolność wyodrębniania tej substancji na drodze jej dyfuzji do agaru stanowi drugi zasadniczy moment wykorzystany w technice wentowskiej. Jak stwierdzono bowiem, umie-

szczenie na powierzchni dekapitowanego koleoptyle bloczka agarowego z dyfuzatem ze ściętych wierzchołków wzbudza ponownie procesy wzrostowe, jakie zachodzą normalnie w obecności naturalnego wierzchołka wzrostu. Stosując jednostronne nakładanie kostek agarowych, uzyskiwał Went charakterystyczne wygięcia koleoptyle owsa, spowodowane nierównomiernym wzrostem obu jego krawędzi w wyniku jednostronnego działania substancji wzrostowej. Wielkości tych wygięć proporcjonalne w pewnych granicach do ilości substancji działającej, stały się ilościowym wskaźnikiem czynnych substancji wzrostowych, występujących w badanym materiale roślinnym. Na tej zasadzie określono również pojęcie jednostki owsianej, odpowiadające najmniejszej ilości substancji wzrostowej, która w określonych warunkach światła, temperatury i wilgotności, w ciągu 2 godzin powoduje wygięcie pochewki liściowej owsa o 10° .

Ogromną zaletą metody Wenta jest to, że pozwala ona na badanie aktywnych substancji wzrostowych, uzyskiwanych na drodze bezpośredniej ich dyfuzji do agaru. W idealnym przypadku określa ona zdolność oddawania substancji wzrostowych przez badany obiekt roślinny i pozwala na prześledzenie ilościowych stosunków transportowanych w roślinie czynnych regulatorów wzrostu.

Metoda Wenta przeszła do chwili obecnej swoją ewolucję poprzez szereg drobnych, jednak bardzo istotnych zmian w technice jej wykonania.

Pierwsza jej modyfikacja wprowadzona przez Skooga 1937 (35) polegała na odizolowaniu kielków od nasion bezpośrednio przed próbą (tzw. Ohnekortest von Skoog). Skoog wychodził z założenia, że usuwając endosperm, usuwa tym samym źródło prekursorów substancji wzrostowych aktywowanych w wierzchołku koleoptyle. Stwierdzono bowiem, że nawet w dekapitowanym koleoptyle po 2 godzinach powstaje tzw. „fizjologiczny wierzchołek wzrostu“, który spełnia konsekwentnie funkcje morfologicznego wierzchołka pochewki liściowej, zaopatrując kielek w czynne substancje wzrostowe. W wypadku usunięcia nasion okres tworzenia fizjologicznego wierzchołka wzrostu przedłużony jest od 5—7 godzin, wskutek czego przedłuża się również okres reakcji pochewki liściowej na działanie doprowadzanej z zewnątrz substancji wzrostowej.

Druga modyfikacja wg Funke (1939) wprowadza bardziej radykalne zmiany polegające na badaniu reakcji wzrostowych tylko najwyższej partii kielków owsa, odcinanych w odległości 1,2 cm od jego wierzchołka. Odcięte fragmenty kielków, naklejone za pomocą żelatyny na szkiełko podstawowe pokryte wilgotną bibułą, pozostają następnie przez okres 24 godzin w ciemnej wilgotnej, komorze aż do nałożenia kostek agarowych. Okres ten konieczny jest prawdopodobnie dla całkowitego spływu pozostających jeszcze w pochewce czynnych regulatorów wzrostu, które mogłyby zacierać właściwy obraz oddziaływania substancji doprowadzanej z zewnątrz. Jak stwierdzono, okres

reakcji koleoptyle przy podobnym postępowaniu przedłuża się od 18—20 godzin, a czułość testu wzrasta 6—7-krotnie.

Z innych roślin testowych, dających reakcje wzrostowe oparte na tej samej zasadzie, wymienić należy główaczka (Söding 1937), hypokotyle słonecznika (Amlong 1939) oraz izolowane i dekapitowane korzonki soczewicy (Naundorf 1940). Do tej samej kategorii testów należy również test grochowy (Went i Thimann 1937). Czułość tego testu jest jednak znacznie niższa niż testu owsianego, a przy tym, jak stwierdzono na podstawie obserwacji własnych, znaczna nieregularność wygięć utrudnia w dużym stopniu pomiary, dając mało wiarygodne wyniki.

Wszystkie wyżej omówione testy roślinne, ze względu na charakterystyczną formę reakcji wzrostowych, jakim ulegają one w obecności czynnych substancji wzrostowych, zaliczmy do grupy testów określanych powszechnie terminem testów wygięciowych.

Druga kategoria testów biologicznych, oparta na zasadzie równomiernego wzrostu na długość badanych obiektów roślinnych, obejmuje zarówno testy pędowe, jak i korzeniowe. Do testów pędowych należy test cylindryczny koleoptyle owsa (Bonner 1933/5) oraz opracowany ostatnio przez Nitsch J. i Nitsch C. (1956) test pierwszego międzywęźla. Metoda polega na badaniu wzrostu na długość określonych fragmentów kielków owsa w roztworach substancji wzrostowych. Różnice w intensywności wzrostu odcinków poddanych działaniu substancji wzrostowych, w stosunku do kontrolnych, określają ilość czynnej substancji w roztworze. Oznaczanie regulatorów wzrostu w tej grupie testów łączy się najczęściej z metodą chromatograficzną. Pozytywne rezultaty w oznaczaniu naturalnych regulatorów wzrostu roślin daje zwłaszcza stosowana obecnie metoda chromatografii bibułowej (Bennet-Clark i wsp. 1952, Luckwill 1952, 1954, Kefford 1955). Metoda ta łącznie z biologiczną daje pewne pojęcie o ilościowym występowaniu tych związków, poprzez określanie na testach roślinnych fizjologicznej aktywności eluatów z poszczególnych frakcji chromatogramu, odpowiadających R_f danej substancji. Do tej grupy testów roślinnych można także zakwalifikować metodę testu fasolowego opracowaną przez Mitschella i Whitehead (1941).

Spośród testów korzeniowych wymienić należy test korzeniowy grochu Leopolda i Guernseya (26) i rzeżuchy (Moewus 1949), u których intensywność wzrostu korzeni jest uzależniona od stężenia czynnej w badanym roztworze substancji wzrostowej. Wymienione ostatnio testy nie mogą być jednak stosowane w dokładniejszych badaniach ze względu na niską ich czułość, jak i dokładność wyników. Jak stwierdzono bowiem, wyniki prób z korzeniowym testem rzeżuchy niejednokrotnie nie odpowiadają zupełnie rzeczywistym ilościom aktywnych substancji w badanym roztworze (Clauß 1952), a granice błędu, popełnianego dla koncentracji kwasu 3-indoloctowego poniżej 1 mg/l, mogą sięgać 50—260% aktualnej ich zawartości. Podobnie ko-

zeniowy test grochu, według nie opublikowanych jeszcze doniesień Leopolda (26), daje bardzo zmienne wyniki, niepowtarzalne zdaniem autora z inną partią nasion nawet tej samej odmiany grochu.

Do trzeciej grupy testów zakwalifikujemy wszystkie pozostałe biologiczne próby oznaczania substancji wzrostowych, niezależnie od typu spowodowanych ich działaniem reakcji wzrostowych. Do bardzo oryginalnych testów roślinnych w tej grupie należy tzw. „Test Kropidlaka” wprowadzony przez Chamina (1954). Okazało się mianowicie, że *Aspergillus niger*, stosowany dotąd z dobrym rezultatem w badaniach urodzajności gleb, reaguje również w sposób bardzo wyraźny i szybki na działanie substancji wzrostowych intensywniejszym przyrostem grzybni, co pozwala na włączenie go do grupy biologicznych metod określania naturalnych regulatorów wzrostu roślin. Ciekawą metodę opracowała także Turiecka (1947), która określała aktywność regulatorów wzrostu na zasadzie szybkości i intensywności ukorzenia sadzonek fasoli, moczonych przez pewien czas w roztworach substancji wzrostowych. Inna metoda polega na wykorzystaniu zdolności pewnych roślin do epinastycznych ruchów liści pod wpływem działania substancji wzrostowych. Wielkość skrętoń liści przyjęto jako wskaźnik aktywności działającej substancji (Audus 1953). Laibach i Fischlich (1935) stosowali metodę, w której dekapitowane epikotyle bobiku, smarowane pastą lanolinową z dodatkiem substancji wzrostowych, wykazywały charakterystyczne powiększenie średnicy górnej powierzchni epikotyle, odpowiadające w przybliżeniu ilości działającej substancji.

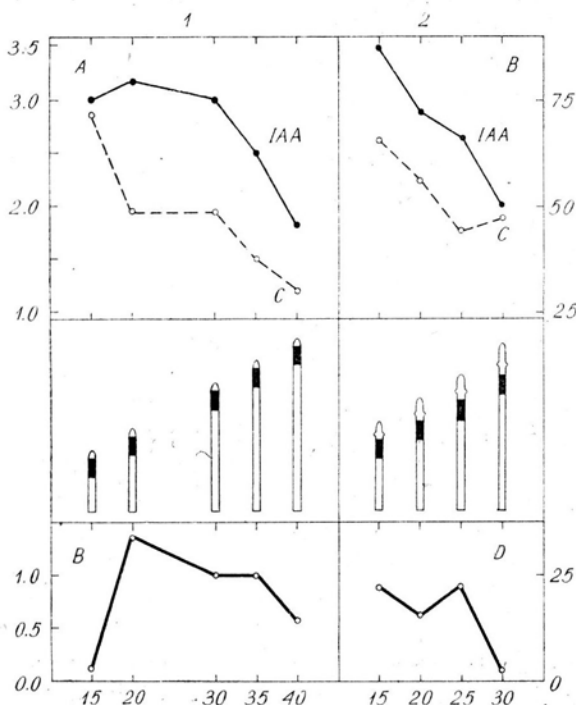
Istnieją również metody oparte na pomiarach różnic w ilości pobranej wody przez dany obiekt roślinny przy udziale substancji wzrostowych. Ilość ta może być określana bezpośrednio w drodze pomiaru intensywności transpiracji badanych obiektów (Chołodnyj 1929), lub metodą wagową zastosowaną przez Bobko i Jakuszkina (1945), którzy jako organu testowego używali fragmentów pędu grochu. Wymieniona metoda budzi jednak poważne zastrzeżenia ze względu na kryteria, jakimi kierowano się przy wyborze badanego materiału roślinnego (wymagana ściśle określona odległość pomiędzy pączkiem szczytowym, górną łuską i pierwszym liściem rośliny). Możliwość zrealizowania wymaganych w tym przypadku warunków, które odpowiadałyby tym kryteriom, wydaje się bardzo problematyczna. Charakteryzując ogólnie grupę omówionych ostatnio metod należy stwierdzić, że ujemną ich cechą jest mała precyzja i dokładność wykonania, w każdym bądź razie nie wystarczająca dla dokładnego i wiarygodnego odzwierciedlenia subtelnych różnic, jakie obserwujemy w działaniu naturalnego systemu roślinnych regulatorów wzrostu.

Wyniki wielu badań wskazują na istnienie szeregu dodatkowych czynników warunkujących dokładność i czułość omówionych wyżej metod, wynikających zarówno z odrębności natury fizjologicznej badanego obiektu roślin-

nego, jak i z układu i charakteru warunków środowiska, w jakich przebiega procedura doświadczenia.

Szczegółowe badania na przykładzie testu owsianego wykazały, że czułość metody uzależniona jest od wieku kielków. Kryterium, jakim się tu kierowano, stanowił stopień rozwoju kielków, określany na zasadzie długości koleoptyle lub pierwszego międzywęzła (rys. 1). Na tej zasadzie określono również wymaganą wielkość kielków dla prawidłowego przebiegu reakcji wzrostowych, wzbudzanych działaniem regulatorów wzrostu (Nitsch J. i Nitsch C. 1956).

Dalsze badania wykazały, że czułość testu cylindrycznego i pierwszego międzywęzła uzależniona jest w określonych warunkach doświadczenia od strefy, z jakiej pobrano dany fragment tkanki, ściśle—od jego odległości od wierzchołka koleoptyle lub kolanka kielka w przypadku testu pierwszego



Rys. 1 Wpływ wieku kielków owsa na intensywność wzrostu wycinków koleoptyle i pierwszego międzywęzła w roztworze kwasu 3-indolooctowego (z pracy Nitsch, J. i C. Nitsch 1956).

1— wycinki z koleoptyle owsa,

2— wycinki z pierwszego międzywęzła.

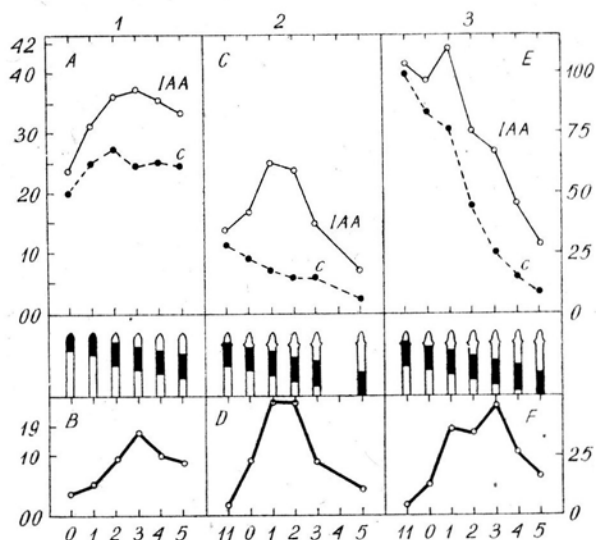
Krzywe A, C przedstawiają wzrost wycinków w roztworze substancji wzrostowej (linia ciągła) i kontrolnych (linia przerywana). Stężenia: A—60, C—10 mg/litr.

Krzywe B, D przedstawiają różnice pomiędzy wzrostem wycinków zadziałanych preparatem kontrolnych. Na skali z lewej wzrost w mm, na prawej w %/0 od długości początkowej wycinków = 4 mm

międzywęzła (Nitsch J. i Nitsch C. 1956). Wyniki badań wskazują, że istnieje pewien określony gradient długościowy w czułości koleoptyle, w związku z czym zdolność reagowania obniża się ku jego podstawie (rys. 2). Zjawisko to wyjaśniają w pewnym stopniu wyniki doświadczeń Pohla (1954), który określił fizjologiczne podstawy różnej reakcji badanych obiektów testowych na działania substancji wzrostowych.

Intensywność wzrostu badanych fragmentów tkanki w obecności substancji wzrostowej warunkuje także ich wielkość. Ogólnie obserwowano tym energiczniejsze reakcje wzrostowe im większa była długość początkowa wycinków. Zwiększenie długości wycinków, jakkolwiek stanowiłoby do pewnego stopnia uproszczenie metody, łączy się jednak z tendencją ich do wyginania, co utrudnia pomiary. Na tej zasadzie (Nitsch J. i Nitsch C. 1956) przyjmują optymalną ich długość w granicach 4—5 mm (rys. 3).

Jak zaznaczyłam już poprzednio, ogromny wpływ na czułość i dokładność metod wykazują warunki środowiska zewnętrznego.



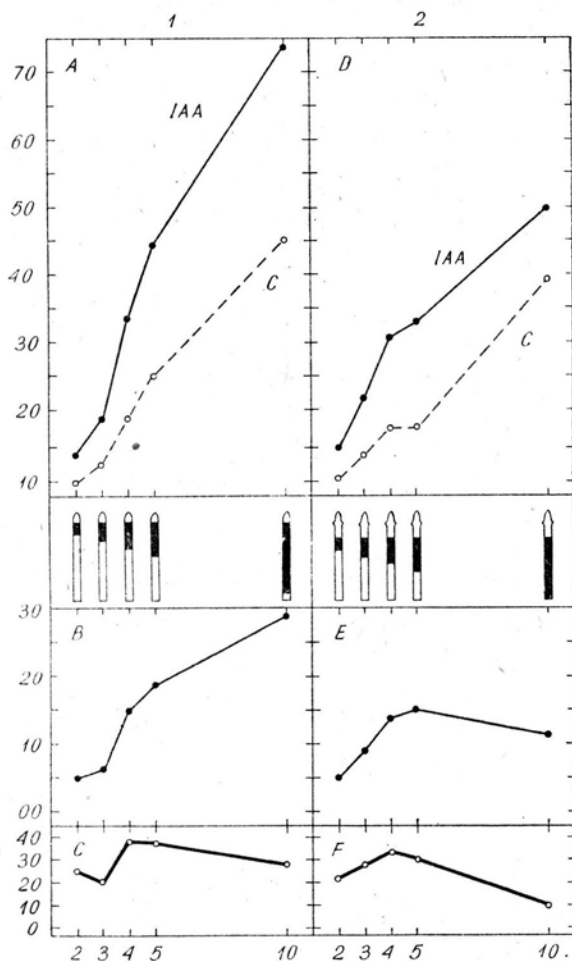
Rys. 2. Wpływ położenia wycinków koleoptyle owsa oraz pierwszego międzywęzła owsa i sorgo na intensywność ich wzrostu w roztworze kwasu 3-indololctowego (z pracy Nitsch, J. i C. Nitsch 1956).

- 1— wycinki z koleoptyle owsa,
- 2— wycinki z pierwszego międzywęzła sorgo,
- 3— wycinki z pierwszego międzywęzła owsa.

Krzywe A, C, E przedstawiają wzrost wycinków w roztworze substancji wzrostowej (linia ciągła) i kontrolnych (linia przerywana). Stężenia: A — 50, C — 50, E — 10 mg/litr.

Krzywe B, D, F przedstawiają różnice pomiędzy wzrostem wycinków zadziałanych preparatem i kontrolnych. Na skali lewej wzrost w mm, na prawej w % od długości początkowej wycinków = 4 mm

Specjalną uwagę zwrócono między innymi na rolę światła. Istnieją dane wskazujące na stymulujący wpływ światła czerwonego na wzrost koleoptyle owsa w obecności substancji wzrostowych (Livermann i Bonner 1953, Schneider 1941 (26)). Wyniki innych doświadczeń nie potwierdziły jednak tej zależności, a nawet wykazały hamujący wpływ światła czerwonego na wzrost niektórych obiektów testowych (Galston i Gaker 1953, Nitsch J.



Rys. 3. Wpływ długości wycinków koleoptyle owsa i pierwszego międzywęzła na intensywność ich wzrostu w roztworze kwasu 3-indolactowego (z pracy Nitsch: J. i C. Nitsch 1956).

1— wycinki z koleoptyle owsa,

2— wycinki z pierwszego międzywęzła owsa.

Krzywe A, D przedstawiają wzrost wycinków w roztworze substancji wzrostowej (linia przerywana) i kontrolnych (linia przerywana). Stężenia: A—20; B—10 mm/litr.

Krzywe B, D przedstawiają przyrost wycinków zadziałanych preparatem w stosunku do kontrolnych w mm; C, F w $\%$ od długości początkowej wycinków.

i Nitsch C. 1956). Ogólnie można stwierdzić, że efekt hamowania lub stymulacji wzrostu uzależniony jest od rodzaju źródła światła, badanego obiektu roślinnego, a także stężenia substancji wzrostowej. W stężeniu 100 mg/l i powyżej notowano bowiem stymulujący wpływ światła czerwonego, przy niższych stężeniach substancji wzrostowych to samo światło hamowało wzrost koleoptyle.

Stwierdzono dalej, że czułość stosowanych metod uzależniona jest w dużym stopniu od składu atmosfery. Istnieją na przykład dane wskazujące na ogromny wpływ ilości CO₂, przy czym optymalna jego koncentracja w danych warunkach doświadczenia wynosi 5% dla testu koleoptyle a 1% dla testu pierwszego międzywęzła (Nitsch J. i Nitsch C. 1956). Badanią innych autorów (Ranson i Parija 1955) wskazują również na istotną rolę tlenu w przyspieszaniu lub hamowaniu reakcji wzrostowych wzbudzanych działaniem substancji wzrostowych. W związku z tym powstała nawet koncepcja użycia koleoptyle owsa, jako czulej próby biologicznej, dla oznaczania stopnia zanieczyszczenia i ilości szkodliwych dla roślin substancji zawartych w atmosferze (Hull, Went, Yamada 1954). Na tych zasadach można by także tłumaczyć dobowe i sezonowe wahania w czułości testu owsianego.

W wypadku stosowania testu wygięciowego Wenta okazało się, że wielkość reakcji uzależniona jest od odczynu samych kostek agarowych (Söding 1952). Te same spostrzeżenia odnoszą się również do testu cylindrycznego i pierwszego międzywęzła, gdzie obserwowano obniżenie czułości badanej tkanki przy wzrastającej kwasowości środowiska (Nitsch J. i Nitsch C. 1956).

Dużo uwagi poświęcono również wpływom pewnych nieorganicznych związków, takich jak mangan (Loo 1944), kobalt (Miller 1954) i bor (Hemberg 1951), na czułość testów, a zwłaszcza testu cylindrycznego i pierwszego międzywęzła. W związku z tym istnieją obecnie próby uczulania tych testów, polegające na płukaniu badanych obiektów bezpośrednio przed próbą w roztworach określonych związków chemicznych (Nitsch J. i Nitsch C. 1956).

Podobnie w badaniach nad wpływem niektórych organicznych połączeń na wzrost koleoptyle poczyniono ciekawe i zasadnicze obserwacje, które wykazały, że same aminokwasy w odpowiednio dużym stężeniu 10⁻³ M mogą wywołać charakterystyczne reakcje wzrostowe bez dodatku substancji wzrostowych. Podobne ich działanie nie ujawnia się jednak w stosunku do testu pierwszego międzywęzła, co ma niewątpliwie ogromne znaczenie przy wyborze odpowiedniej metody badań.

Oprócz wymienionych istnieje jeszcze szereg innych, bliżej nie określonych czynników warunkujących efektywność biologicznych metod oznaczania regulatorów wzrostu roślin, które Söding (1952) łączy w jedną wspólną grupę czynników natury meteorologicznej (meteorologische Faktoren).

Z podanego przeglądu biologicznych metod oznaczania aktywności sub-

stancji wzrostowych uwarunkowanych wpływem tak wielu-różnych czynników wynika zatem, że kwestia wyboru metody jest zagadnieniem bardzo istotnym i ciągle jeszcze aktualnym. Ogromna liczba metod świadczy natomiast, że żadna z nich nie jest właściwie doskonała i dlatego rozpoczynając pracę nad zagadnieniem substancji wzrostowych stajemy przed niezwykle trudnym problemem — oceny i wyboru odpowiedniej metody badań. Kryteria, jakimi należałoby kierować się w tym wypadku, powinny stanowić realne możliwości przeprowadzenia danego doświadczenia z zachowaniem wszelkich odpowiadających danej metodzie warunków, które zapewniłyby maksymalną czułość reakcji i miarodajność wyników.

Zakład Fizjologii Roślin U. M. K. w Toruniu
Dział Fizjologii Roślin Ośrodka Biologii
Stosowanej U. M. K. w Koniczynie

LITERATURA

- Amlong H. V., 1939. *Jahrb. f. wiss. Bot.* 88, 438 i 455.
 Audus L. J., 1953. *Plant Growth Substances*, London.
 Bennet-Clark T. A., Tambiah M. S. a. Kefford N. P. 1952. *Nature*, 169, 452.
 Bonner J., 1935. *Jahrb. f. wiss. Bot.* 82, 377.
 Bobko E. W., Jakuszkina N. I., 1945. *D. A. N.* 48, 2.
 Chaminade R., 1954. *Compt. Rend. l'Acad. Scienc. Paris* 239, 25: 1844.
 Chołodnyj N., 1929. *Planta* 7, 702.
 Funke, 1939. *Jahrb. f. wiss. Bot.* 88, 373.
 Galston A. M. a. Baker R. S., 1953. *Amer. Jour. Bot.*, 40, 7.
 Gorter C. J. a. Funke G. L., 1937. *Planta* 26; 532—545.
 Hemberg T., 1951 *Physiol. Plantarum* 4: 358—369.
 Hull H. M., Went F. W., Yamada N., 1954. *Plant Physiol.* 29, 2: 182—187.
 Jones E. R. H., Henbest H. B., Smith G. F. a. Bentley J. A., 1952. *Nature*, 169, 485.
 Kefford N. P., 1955. *Journ. Exper. Bot.*, 6, 16: 129—151.
 Kornmann P., 1935. *Ber. Deutsch. Bot. Ges.* 53; 523—527.
 Laibach F., Fischnich O., 1935. *Ber. Deutsch. Bot. Ges.* 53; 469.
 Larsen P., 1936. *Planta* 25: 311—314.
 Larsen P., 1940. *Planta* 30: 673—682.
 Loo T. L., 1944. *Annals Bot.*, 8: 357—362.
 Luckwill L. C., 1952. *Nature* 169: 375.
 Luckwill L. C., 1954. *Rapp. et communs. Huitième Congrès. Intern. Bot. Paris*: 148.
 Miller C. D., 1954. *Plant Physiol.* 29: 79—82.
 Mitchell J. W. a. Withead M. R., 1941. *Bot. Gaz.*, 102: 770.
 Moewus F., 1949. *Biol. Zentr.* 68: 118—140.
 Naundorf G., 1940. *Planta* 30: 650.
 Nitsch J. P. a. Nitsch C., 1956. *Plant Physiol.* 31, 2: 94—111.
 Overbeek J., 1938. *Plant Physiol.* 13: 587.
 Pohl R., 1954. *Planta*, 44, 2: 191—202.
 Ranson S. L., Parija B., 1955. *Journ. Exper. Bot.*, 6, 16: 80—93.
 Ruge, 1937. *Zeitschr. f. Bot.*, 31, 1.
 Ruge, 1937a. *Planta* 27, 352 i 436.

- Ruge, 1942. *Planta* 32, 571.
- Schoen, Ulrich M. M., Morel, G. 1954. *Compt. Rend. l'Acad. Scienc. Paris*, 238, 26: 2549—2550.
- Söding H., 1937. *Jahrb. f. wiss. Bot.* 86, 770.
- Söding H., 1952. *Die Wuchsstofflehre*.
- Söding H. a. Raadts E., 1953. *Planta* 43, 25.
- Söding H., 1954. *Rapp. a. communs. Huitième Congrès. Intern. Bot. Paris*, 148.
- Steeves T. A., Morel G. a. Wetmore R. H., 1953. *Amer. Jour. Bot.*, 40: 534—538.
- Syre H., 1938. *Zeitschr. Bot.* 33: 129—182.
- Thimann K. V., 1935. *J. biol. Chem.*, 109: 279—291.
- Turiecka R. Ch., 1947. *D. A. N.* 58, 3.
- Went F. W. a. Thimann K. V., 1937. *Phytohormones*.