

TOMASZ J. WODZICKI

MECHANIZM DZIAŁANIA REGULATORÓW WZROSTU ROŚLIN W ŚWIETLE BADAŃ OSTATNICH LAT *

Od czasu odkrycia auksyn i giberelin około 40 lat temu — wiele substancji wzrostowych zostało wydzielonych z tkanek roślinnych — zidentyfikowanych i zsyntetyzowanych, a liczba procesów wzrostowych w jakich stwierdzono ich regulującą rolę lub przynajmniej wykazano korelację między ich aktywnością a przebiegiem procesów morfogenetycznych wciąż wzrasta. Warto wymienić choćby tylko niektóre procesy będące wynikiem całego kompleksu procesów enzymatycznych i histogenetycznych, w których stwierdzono regulującą rolę substancji wzrostowych, a mianowicie: wydłużanie pędów i korzeni, reakcje tropiczne, wzajemne uwarunkowanie rozwoju części nadziemnej poprzez dominację wierzchołkową i korelatywne hamowanie, aktywność kambialną, regenerację tkanek uszkodzonych, rozmnażanie wegetatywne i generatywne, reakcję fotoperiodyczną, zapylanie i zapładnianie, dojrzewanie owoców, kiełkowanie nasion, indukowanie spoczynku, opadanie liści i owoców, starzenie się tkanek i organów.

Oczywiście wobec tak wszechstronnego udziału hormonów roślinnych w procesach wzrostu i rozwoju roślin, problem mechanizmu ich działania od lat jest przedmiotem wielu badań i spekulacji naukowych. Istnieją liczne i wprost świetne prace w wydaniu książkowym, w których autorzy przedstawiają poglądy jakie od lat 60 panowały na temat mechanizmu działania regulatorów wzrostu. Wymienię tu tylko niektóre, jak wydaną w 1955 r., a chyba dziś już klasyczną książkę Leopolda — *Auxins and Plant Growth* — książkę *Plant Growth Regulation* będącą zbiorem prac przedstawionych na czwartej międzynarodowej konferencji dotyczącej regulatorów wzrostu roślin, która odbyła się w 1959 r. w Instytucie Boyce Thompsona w Stanach Zjednoczonych, materiały konferencji dotyczącej naturalnych regulatorów wzrostu roślin, która miała miejsce w r. 1964 w Gif we Francji i wreszcie wydaną w 1967 r. w Polsce książkę pt. *Substancje wzrostowe roślin* Maciejewskiej-Potapczykowej.

Osobom zainteresowanym problematyką regulacji wzrostu roślin wiadomo jednak, że informacje dotyczące mechanizmu działania substancji wzrostowych

* Referat wygłoszony na posiedzeniu Warszawskiego Oddziału Towarzystwa Botanicznego 4. IV. 1968 r.

przedstawione w dziełach poświęconych regulatorom wzrostu roślin są fragmentaryczne i niezadowalające. Wynika to oczywiście z braku niezbędnych danych sprawdzonych doświadczalnie i ostrożności badaczy w formułowaniu hipotez.

W końcu ubiegłego, a szczególnie w pierwszej połowie bieżącego dziesięciolecia, zaczęły się jednak pojawiać prace, które rzuciły nowe światło na zagadnienie mechanizmu działania substancji wzrostowych. Jest to związane z ogromnym postępowaniem badań cytogenetycznych i wyjaśnieniem niektórych najbardziej podstawowych procesów metabolizmu komórki, a mianowicie roli kwasów nukleinowych w syntezie białek. Związane jest także z wydzieleniem specyficznego informacyjnego kwasu rybonukleinowego pełniącego rolę kodu tzw. messengera RNA (m-RNA), którego synteza powiązana jest ściśle z określonymi odcinkami kwasu dezoksyrybonukleinowego pełniącego rolę wzorca genetycznego. Wzorzec ten zawiera odpowiednią informację genetyczną o kolejności zasad w nukleotydach messengera kwasu rybonukleinowego, a tym samym informację o kolejności syntezy aminokwasów w polipeptydach białek.

Trudno dziś dociec, które prace zapoczątkowały serię badań dotyczących powiązania procesów związanych z regulowaną przez kwasy nukleinowe syntezą białek i działaniem hormonów roślinnych. W wielu publikacjach za pioniera uważa się japońskiego badacza Yoshio Masudę, który w 1959 r. podał do wiadomości, że tkanka roślinna (koleoptile owsa), na którą podziałano enzymem biorącym udział w hydrolizie kwasów nukleinowych, rybonukleazą, jest mniej wrażliwa na działanie auksyny. Należy jednak pamiętać, że już w 1953 r. Silberger i Skoog wskazywali na wpływ IAA na zawartość kwasu nukleinowego i wzrost tkanki w kulturze rdzenia tytoniu, a wiele prac, choćby takich jak prace Olszewskiej z 1959 r. było ściśle związanych z tą problematyką. Dopiero w kilka lat później ukazały się jednak wyniki badań licznych badaczy dostarczające bogatego materiału doświadczalnego, w którym stosując specyficzne inhibitory procesów syntezy białek i kwasów nukleinowych badacze wykazali, że obydwa te procesy jednocześnie są konieczne dla optymalnego wzrostu komórek roślinnych w obecności substancji wzrostowych.

Na czoło tych prac wysuwają się badania Varnera i jego współpracowników z Uniwersytetu w East Lansing w St. Zjednoczonych, dotyczące wpływu kwasu giberelinowego na kiełkowanie nasion jęczmienia.

Podstawową hipotezę badań oparto tu o znane już wcześniej następujące fakty:

1) już od 1890 r. z badań Haberlandta wiadomo było, że warstwa żywych komórek, tzw. warstwa aleuronowa, otaczająca martwą tkankę zapasową endospermu nasion roślin z rodziny *Gramineae* wydziela w czasie kiełkowania zarodka enzymy hydrolityczne — amylazy, odpowiedzialne za hydrolizę skrobi,

2) od r. 1940 dzięki badaniom Japończyka Hayashi (1940) wiadomo jest, że giberelina przyspiesza kiełkowanie nasion jęczmienia i ryżu,

3) w latach 1958—60 wykazano, że czynnikiem, który w czasie inicjacji aktywności merystematycznej zarodka pobudza aktywność α -amylazy jest substancja giberelinopodobna (Yomo 1958, Radley 1960). Spostrzeżenie to zostało wkrótce

potwierdzone przez Yomo (1960) i Palega (1960), którzy w celu pobudzenia aktywności α -amylazy użyli kwasu giberelinowego, i wreszcie

4) odkrycie w latach 1961—63 stwierdzające, że giberelina pobudza także aktywność innych hydrolaz w warstwie aleuronowej, a mianowicie proteaz (Yomo 1961, Briggs 1963), rybonukleazy (Chrispeels niepublikowany cytat za Varnerem 1967) i β -glukonazy (MacLeod i Millar 1962).

Przyjmując za punkt wyjścia wyżej wymienione badania oraz własne wyniki, w których stwierdzono, że zwiększenie aktywności α -amylazy, towarzyszące działaniu gibereliną może być zahamowane przez warunki beztlenowe oraz przez działanie dinitrofenolu, lub parafluorofenylalaniny i chloramfenikolu — inhibitorów oddychania i syntezy białek — Varner postawił hipotezę roboczą, zakładającą że wzrost aktywności α -amylazy związany jest ze wzmożeniem jej syntezy.

Do badań swych Varner użył połówek nasion jęczmienia bez zarodka, ale z nie naruszoną warstwą aleuronową. Pozwoliło to na wyeliminowanie wpływu zarodka i stworzyło świetne warunki dla doświadczenia, w którym jedyna żywa tkanka endospermu, tkanka aleuronowa zbudowana była z homogennej populacji niedzielących się komórek (tryploidalnych) reagujących na działanie gibereliny już przy koncentracjach w przedziale 10^{-11} do 10^{-7} M.

Po okresie inkubacji połówek nasion jęczmienia w obecności kwasu giberelinowego już wizualnie można było stwierdzić, że najpierw uległa hydrolizie część materiału zapasowego endospermu znajdująca się najbliższej warstwy aleuronowej.

Wprowadzając do pożywki obok kwasu giberelinowego znaczną C^{14} fenylalaninę Varner (1964) wykazał następnie, że w czasie inkubacji aminokwas ten wbudowywany był między innymi do frakcji białkowej przejawiającej aktywność α -amylazy. W dalszych doświadczeniach Varner stwierdził, że inne aminokwasy, leucyna, alanina, prolina i treonina ulegały wbudowaniu w białko α -amylazy ekstrahowanej z tkanek połówek nasion jęczmienia inkubowanych w obecności kwasu giberelinowego (Varner i Chandra 1964). Ostatecznie Varner i badacze z nim współpracujący wykazali, że przyrost aktywności α -amylazy w tych tkankach związany był z syntezą *de novo* tego enzymu.

Po ustaleniu tego faktu, Varner i jego koledzy postanowili zbadać hipotezę zakładającą, że wpływ kwasu giberelinowego na syntezę α -amylazy jest wyrazem oddziaływania gibereliny na syntezę kwasu rybonukleinowego niezbędnego do syntezy białka tego enzymu. W badaniach zastosowali oni selektywny inhibitor syntezy kwasu rybonukleinowego działający na poziomie transkrypcji kwasu dezoksyrybonukleinowego — antybiotyk aktynomycynę D. Substancja ta dodana wraz z kwasem giberelinowym do pożywki, w której inkubowano wypreparowaną z nasion jęczmienia warstwą aleuronową tylko częściowo hamowała syntezę α -amylazy. Jeśli jednak inhibitor dodano w 12—24 godzin przed podziałaniem gibereliną, efekt był znacznie większy. Aktynomycyna D nie hamowała syntezy α -amylazy, jeśli dodano ją w 6—12 godzin po wprowadzeniu kwasu giberelinowego do pożywki.

Zbadano też w jaki sposób kwas giberelinowy wpływa na włączanie znakowa-

nych C¹⁴ urydyny i adeniny oraz znakowanego P³² fosforu w cząsteczki kwasu rybonukleinowego w czasie moczenia połówek nasion jęczmienia. Wyniki nie pozostawiały wątpliwości, że synteza kwasu rybonukleinowego poprzedzała syntezę α -amylazy (Chandra i Varner 1965).

Ostatecznie badacze ci nie podali jeszcze wyników stwierdzających z całą pewnością, że syntetyzowany kwas nukleinowy zawiera także informacyjny messenger RNA specyficzny dla syntezy α -amylazy. Jednakowoż w krótkim doniesieniu złożonym na konferencji w Nowym Yorku Varner podał do wiadomości (Varner 1967), że wyniki przeprowadzonych nieopublikowanych jeszcze doświadczeń z podwójnie znakowanymi substancjami wskazały na syntezę frakcji kwasu rybonukleinowego uważanego za messengera RNA. Pozostało do wyjaśnienia czy frakcja ta zawiera messenger-RNA specyficzny dla syntezy α -amylazy, a także m-RNA specyficzny dla syntezy innych hydrolaz.

Wyniki doświadczenia z zastosowaniem aktynomycyny D doprowadziły autorów do wniosku, że działanie gibereliny na syntezę kwasu rybonukleinowego ma miejsce na poziomie transkrypcji kodu genetycznego DNA.

Niezależnie od Varnera i jego kolegów inna grupa badaczy pracująca pod kierunkiem Langa w tym samym Uniwersytecie podjęła prace zmierzające do poznania mechanizmu działania gibereliny na wzrost wydłużeniowy komórek (Nitsan i Lang 1965, 1966, Lang i Nitsan 1967). Również ci badacze zastosowali inhibitory syntezy białek: chloramfenikol, puromycynę oraz inhibitor syntezy kwasu rybonukleinowego — aktynomycynę D. Działali oni na wzrost siewek *Lactuca sativa* wrażliwej na działanie gibereliny i stosowanej w testach biologicznych tej substancji, a następnie odcinki epicotyłu *Lens culinaris*. Poza wymienionymi wyżej inhibitorami badacze ci włączyli także do doświadczeń inhibitory syntezy kwasu dezoksyrybonukleinowego: ametoptyrynę, mitomycynę C, alkohol fenetylowy i 5-fluorodezoksyurydynę (FUDR). Wybór szczególnie tej ostatniej substancji podyktowany był faktem, że podobnie jak inhibitory syntezy RNA hamowała ona silnie wzrost zarówno będący wynikiem stymulacji giberelinowej, jak i w doświadczeniach gdzie gibereliny nie stosowano.

Badania nad wzrostem siewek *Lactuca sativa* nie dały jeszcze jasnego wniosku, stwierdzono bowiem, że w okresie inkubacji roślin kontrolnych zachodził zarówno podział, jak i wydłużenie komórek. Można więc było podejrzewać, że o ile w obecności gibereliny zachodzi także wzmożona synteza DNA, związana jest ona z podziałem komórek. Natomiast w badanych odcinkach epikotyłu *Lens culinaris* nie stwierdzono zmiany w liczbie komórek, przynajmniej w ciągu 48 godzin inkubacji. Tak więc w tym przypadku, inhibitor syntezy DNA ograniczał wyraźnie fazę wzrostu wydłużeniowego. Postanowiono więc sprawdzić hipotezę roboczą zakładającą, że dla normalnego przebiegu procesu wzrostu wydłużeniowego niezbędna jest synteza kwasu dezoksyrybonukleinowego i zbadać wpływ gibereliny na ten proces. W tym celu odcinki epicotyłu *Lens culinaris*, inkubowano w obecności kwasu giberelinowego i 5-fluoro dezoksyurydyny, a następnie oznaczano w nich zawartość kwasów nukleino-

wych (Nitsan i Lang 1966). Z danych przedstawionych przez Langa wynika, że w czasie inkubacji zawartość DNA w tkance epikotyłu wzrastała. Zwiększenie syntezy było jednak znaczniejsze przy obecności gibereliny. Inhibitor syntezy kwasu dezoksyrybonukleinowego ograniczał tę syntezę do poziomu obserwowanego na początku doświadczenia. Celem uzyskania dalszego dowodu dla potwierdzenia otrzymanych wyników badacze ci prześledzili włączanie znaczonej tymidyny- H^3 do kwasów nukleinowych tkanki. Z badań tych wynikało, że w czasie inkubacji zachodziła synteza kwasu dezoksyrybonukleinowego. Z innych badań z zastosowaniem znakowanej C^{14} -urydyny ustalono, że w okresie badanym następuje również synteza kwasu rybonukleinowego, szczególnie jego frakcji rybosomowej. W oparciu o wyniki swych badań Lang i jego współpracownicy zaproponowali hipotezę, że stymulujące wzrost wydłużeniowy działanie kwasu giberelinowego posiada związek z syntezą kwasu dezoksyrybonukleinowego. Badacze ci ograniczyli się jednak do ostrożnej interpretacji tego związku sugerując jedynie, że synteza kwasu dezoksyrybonukleinowego może być potrzebna w czasie wytwarzania rybosomowego kwasu rybonukleinowego.

Prace nad mechanizmem działania gibereliny doprowadziły niemalże natychmiast do włączenia w sferę badań mechanizmu działania zaledwie kilka lat temu odkrytego i zsyntetyzowanego naturalnego inhibitora wzrostu i substancji indukującej spoczynek, a będącej antagonistą działania gibereliny w kilku procesach biologicznych — mianowicie dorminy zwanej także abscisyną II. Dormina jest hormonem roślinnym przyspieszającym opadanie liści, młodych owoców, szypulek pozbawionych związków owocowych i ogonków liściowych pozbawionych blaszek u bawełny. Hormon ten przyspiesza także starzenie odciętych liści, powoduje zahamowanie wzrostu pędów i wytwarzanie pączków spoczynkowych, działa przeciwstawnie stymulacji IAA we wroście koleoptile owsa i działaniu gibereliny w systemie testowym endospermu nasion jęczmienia.

Sprawą mechanizmu działania dorminy (abscisyny II) zajęli się przede wszystkim jeden z odkrywców tej substancji i jego koledzy Addicott, Ohkuma, Smith i Thiessen 1966) a także badacze z Michigan State University (Varner i inni). Zainteresowanie ich uzasadnione było faktem, że dormina hamowała pojawienie się α -amylazy w czasie inkubacji warstwy aleuronowej nasion jęczmienia w obecności kwasu giberelinowego. Starając się wyjaśnić przyczynę zahamowania syntezy α -amylazy stwierdzili oni, że dormina nie hamowała oddychania i procesów fosforylacji. W doświadczeniach gdzie zastosowane zostały inhibitory syntezy białek takie, jak: puromycyna, p-fluorofenyloalanina i inne, badacze ci wykazali jednocześnie, że dormina nie ogranicza włączania znakowanych C^{14} aminokwasów w białka rozpuszczalne warstwy aleuronowej (Chrispeels, Varner 1966). Ponieważ wcześniejsze badania tych autorów z zastosowaniem aktynomycyny D wskazywały na możliwość przejawiania przez giberelinę aktywności poprzez wpływ na syntezę kwasu rybonukleinowego w procesie jego transkrypcji na kwasie dezoksyrybonukleinowym — postanowili oni sprawdzić wpływ dorminy na syntezę RNA.

Odpowiednie doświadczenia ze znakowaną C^{14} -urydyną wykazały pewne (sięgające 25%) zmniejszenie włączania tego związku w cząsteczki kwasu rybonukleinowego. Autorzy przypuszczają, że zahamowanie to spowodowane było jednak obniżeniem pobierania urydyny, a nie zmniejszeniem inkorporacji i nie jest specyficzne. Na podkreślenie wg Varnera zasługuje tu fakt, że inhibicja dorminy nie przypomina działania żadnego ze stosowanych dotąd inhibitorów syntezy α -amylazy. Nie wpływa ona ani na oddychanie, ani na fosforylację, ani na globalną syntezę białek i kwasu rybonukleinowego. Ponieważ wpływ gibereliny na syntezę α -amylazy przejawia się również nie ilościową, a jakościową zmianą w syntezie białka, Varner uważa za prawdopodobne, że interakcja obu substancji jest przejawem działania w podobnym, a nawet identycznym punkcie procesów determinujących syntezę białka enzymu. Stwierdzenie to niezupełnie jest w zgodzie z wynikami doświadczenia, w którym Varner badał interakcję obu hormonów w procesie syntezy α -amylazy przy pomocy znanej metody analizy kinetycznej reakcji enzymatycznej Michaelisa i Mentona. Uzyskane w tej drodze wyniki przedstawione jako wykres Lineweaver-Burka wskazują, że proste nie przecinają się, a więc działanie obu substancji nie ma charakteru kompetycyjnego. Varner uważa jednak, że w przypadku skomplikowanego systemu tkankowego jakim się posługuje w swych badaniach, nawet gdyby działanie obu substancji było ściśle kompetycyjne, wykres mógłby przedstawiać się inaczej niż w prostym systemie enzym-substrat-inhibitor, dla którego opracowano metodę analizy kinetycznej. Niestety autorzy jak dotąd, zdaje się nie opublikowali danych dotyczących radioaktywności różnych frakcji kwasów nukleinowych po inkubacji tkanek w obecności dorminy. Wyniki takie niewątpliwie są w przygotowaniu i wkrótce należy spodziewać się dalszego wyjaśnienia hipotezy tych autorów.

Dane takie, chociaż dla innego materiału doświadczalnego i dla interakcji dorminy z innym regulatorem wzrostu, a mianowicie z 6-benzyladeniną, substancją z grupy cytokinin, przedstawił w r. 1967 van Overbeek i jego współpracownicy (van Overbeek i in. 1967).

Do badań swych badacze ci wybrali *Lemna minor*, która spośród szeregu przebadanych roślin okazała się najbardziej wrażliwa na działanie dorminy. Roślina ta reagowała zahamowaniem przyrostu masy już przy koncentracji 1 p.p.b., a przy tym zahamowanie jej wzrostu powodowane nawet przez koncentrację 1000 razy większą było łatwo odwracalne po przeniesieniu roślin na pożywkę bez dorminy. Badacze ci stwierdzili, że istnieje możliwość zniesienia lub ograniczenia inhibicji wywołanej przez dorminę w stężeniach aż do 100 p.p.b. przez dodanie do pożywki analogicznej ilości 6-benzyladeniny lub innych cytokinin. Ponieważ już dawniej wiadomo było, że rośliny dwuliścienne w obecności benzyladeniny wzmagają syntezę kwasów nukleinowych v. Overbeek i jego współpracownicy postanowili zbadać współdziałanie tej substancji i dorminy w odniesieniu do procesu syntezy kwasów nukleinowych. Przede wszystkim zastosowano inhibitor procesu transkrypcji kwasu rybonukleinowego na cząsteczkach kwasu dezoksyrybonukleinowego 6-metylo-

purynę tym bardziej, że okazało się, że substancja ta przy koncentracjach podobnego rzędu hamuje wzrost *Lemna minor* w podobny sposób jak dormina, a inhibicja ta jest odwracalna, oraz wykazuje analogiczną interakcję z cytokininą. Przeprowadzono badania współdziałania dorminy i cytokininy w procesie włączania znakowanego fosforu P^{32} w cząsteczki kwasów nukleinowych. Okazało się, że w obecności dorminy najwcześniej zmniejszeniu ulegała inkorporacja fosforu oznaczonego do frakcji kwasu dezoksyrybonukleinowego. A mianowicie włączanie znakowanego fosforu do frakcji DNA już po 1 dniu oddziaływania dorminą było znacznie bardziej zahamowane, niż do którejkolwiek frakcji kwasu rybonukleinowego. Autorzy wysnuli więc wniosek, że zahamowanie syntezy kwasu dezoksyrybonukleinowego jest jednym z wcześniejszych stadiów działania dorminy, a zahamowanie syntezy kwasu rybonukleinowego następuje później. Podobnie po wyeliminowaniu działania inhibitora, synteza DNA uległa przyśpieszeniu najwcześniej.

Rozpatrując znaczne różnice w budowie chemicznej dorminy i 6-benzyladeniny v. Overbeek uważa za mało prawdopodobne, żeby antagonistyczne działanie tych dwóch substancji było przejawem inhibicji kompetycyjnej w stosunku do aktywności działania jakiegoś enzymu. Jest on skłonny raczej rozpatrywać możliwość allosterycznej inhibicji polimerazy DNA zgodnie ze schematem inhibicji i aktywności allosterycznej Monoda (1966). Wg tej koncepcji dormina jako inhibitor utrzymywałaby pewną część enzymu w formie nieaktywnej, co powodowałoby przesunięcie równowagi enzymatycznej w kierunku stanu nieaktywnego pozostawiając tylko pewną część enzymu w stanie czynnym. Struktura dorminy wg v. Overbeeka mogłaby sprzyjać powstawaniu nietrwałego związku między jej cząsteczkami, a grupami aktywnymi cząsteczek aktywatora poprzez dwupunktowe wiązanie wodorowe. Po odłączeniu dorminy enzym uzyskiwałby swój normalny stan równowagi. Rola cytokininy mogłaby polegać na utrzymywaniu enzymu w jego formie aktywnej, a więc umożliwiającej syntezę kwasu dezoksyrybonukleinowego.

Na uwagę zasługuje tu zbieżność wyników uzyskanych przez v. Overbeeka i wyników Langa omawianych wcześniej, chociaż ten ostatni badał działanie innego hormonu roślinnego — gibereliny na inny proces, a mianowicie wzrost wydłużeniowy epikotyli *Lens culinaris*. Obaj badacze stwierdzili wpływ badanych hormonów na syntezę DNA w czasie procesu wzrostu. Z pracy v. Overbeeka wynika też, że zahamowanie syntezy DNA poprzedzało zmniejszenie syntezy rybosomowego DNA. W tym ujęciu wyniki uzyskane przez v. Overbeeka można rozpatrywać jako podtrzymanie hipotezy Langa, że dla normalnego przebiegu wzrostu niezbędna jest synteza jakiejś frakcji kwasu dezoksyrybonukleinowego związanej z wytwarzaniem rybosomów.

Ze wspomnianej pracy v. Overbeeka wynikają także istotne wnioski związane z problemem mechanizmu działania cytokinin. Otóż dane te wskazują, że 6-benzyladenina stymulowała syntezę kwasów nukleinowych, a w tym kwasu dezoksyrybonukleinowego. Sam fakt, że cytokininy mogą oddziaływać na metabolizm kwasów nukleinowych i syntezę białek, oraz że mogą być metabolizowane i wbudowywane

w cząsteczki kwasu nukleinowego znany jest jednak już od dość dawna. Odpowiednią dyskusję tego zagadnienia można znaleźć w syntetycznej pracy Maciejewskiej-Potapczykowej (1967) i pracach szczegółowych. W dalszym ciągu sam mechanizm regulacji wzrostu roślin przez te hormony wciąż jest mało poznany.

Nowe dane, które ostatnio przedstawił Srivastava (1967) po dokonaniu badań nad wpływem kinetyny na degradację jądra i chloroplastów w czasie starzenia się odciętych liści *Hordeum vulgare* oraz wzrostu tkanki rdzenia *Nicotiana tabacum* są w zasadzie tylko uzupełnieniem i rozwinięciem wyników znanych już z badań wcześniejszych dotyczących włączania radioaktywnej kinetyny do kwasów rybonukleinowych (Olszewska 1959). Dane Srivastavy przedstawiają jednak wyraźnie sugerowane wcześniej korelacje i dodają kilka nowych informacji. Jako takie zasługują tu na krótkie omówienie.

W ciągu 4 dni inkubacji odciętych liści jęczmienia w obecności kinetyny znakowanej C^{14} lub po 20—26 dniach wzrostu szczytu tkanki rdzenia tytoniu Srivastava badał zmiany ilościowe, a następnie radioaktywność w różnych frakcjach kwasów nukleinowych. W niektórych doświadczeniach zamiast radioaktywnej kinetyny stosował on w pożywce radioaktywny fosfor P^{34} . Przede wszystkim wykazał on, że kinetyna zapobiegała degradacji rybosomowego RNA w odciętych liściach jęczmienia. W dalszym ciągu przedstawione przez Srivastavę dane wskazują, że radioaktywny C^{14} ze znaczonej kinetyny pojawił się we wszystkich frakcjach kwasów nukleinowych zarówno w liściach jęczmienia, jak i w tkance tytoniu. Dane te zgodne są również z doniesieniem Foxa z 1966 r., który obserwował inkorporację benzyladeniny we frakcję niskocząsteczkowego kwasu rybonukleinowego (s-RNA). Na podstawie swej pracy Srivastava proponuje mechanizm działania kinetyny wzorowany na uprzednio omówionych sugestiach Varnera odnośnie regulacji syntezy α -amylazy w nasionach jęczmienia, podobnie zresztą jak tłumaczyła rolę cytokininy w opóźnianiu procesu starzenia się tkanek Osborne już w 1962 r. A mianowicie sugeruje on, że cytokinina wpływa na syntezę kwasu rybonukleinowego w procesie jego transkrypcji na DNA. W tym przypadku sytuacja jest jednak bardziej skomplikowana wiadomo bowiem, że często działanie cytokininy ujawnia się dopiero w obecności innych regulatorów wzrostu, szczególnie znane są interakcje cytokininy z auksyną. Dlatego też celem lepszego zrozumienia mechanizmu działania cytokinin i ugruntowania wyżej wspomnianej hipotezy potrzebne są jeszcze bardziej niż w stonku do innych hormonów roślinnych gruntowne badania.

Zagadnienie mechanizmu działania auksyn w procesach wzrostowych było dotąd badane najbardziej wszechstronnie. Dzięki temu powstało wiele hipotez starających się wytłumaczyć mechanizm stymulacji wzrostu towarzyszący działaniu auksyn. Hipotezy te omawiane szczegółowo we wspomnianych już wcześniej pracach przeglądowych można uporządkować w trzy grupy. A mianowicie:

1. Najwcześniejsze historycznie i do dziś posiadające duże znaczenie hipotezy, które wiążą stymulację wzrostową auksyn ze zmianami zachodzącymi w błonie komórkowej, pobieraniem wody i własnościami osmotycznymi komórki.

2. Hipotezy traktujące auksyny jako substancje współdziałające bezpośrednio z aktywnością enzymów, to jest pewnego rodzaju koenzymy, substancje ochronne lub nawet wchodzące w skład enzymów. Do tej grupy hipotez należą również propozycje dotyczące związku auksyn z enzymami metabolizmu ATP, biorącymi udział w przenoszeniu reszt kwasu fosforowego z wysokoenergetycznych wiązań ATP, a szczególnie z fosfatazami hydrolizującymi estry kwasu fosforowego.

Wobec złożoności kompleksowego procesu jakim jest obserwowany wzrost, wpływ auksyn na aktywność różnych systemów enzymatycznych może być jednak dalece niebezpośredni i dlatego hipotezy należące do tej kategorii są chyba najdalsze wyjaśnienia specyfiki działania auksyn jako stymulatorów wzrostu.

3. Trzecia grupa, to hipotezy uwzględniające przede wszystkim rolę auksyn w procesach syntezy kwasów nukleinowych i białek. Jest zupełnie prawdopodobnie, że auksyny regulują wzrost poprzez działanie na kilka różnych procesów — np. na wzrost plastycznych właściwości błony komórkowej, umożliwiających powiększanie się objętości komórki wskutek istniejącego w komórce ciśnienia osmotycznego i zwiększonego pobierania wody (jak sugerują to Cleland i Burström, 1961), oraz syntezę białek, szczególnie zaś białka enzymatycznego poprzez regulację syntezy specyficznego kwasu rybonukleinowego (co sugeruje wielu badaczy).

Ostatnie prace Clelanda (1967) i Lockharta (Lockhart i in. 1967) dostarczają dalszych dowodów, że auksyna powoduje znaczny wzrost zarówno plastycznych, jak i elastycznych właściwości błony komórkowej w czasie indukcji wzrostu wydłużeniowego. Cleland zademonstrował przy tym nową, ciekawą technikę, umożliwiającą badanie właściwości fizycznych samych błon komórkowych, a nie jak dotąd całych koleoptile.

Celem bliższego wyjaśnienia związku między stymulacją wzrostu przez auksynę, a metabolizmem kwasów nukleinowych wykonanych zostało w ostatnich latach wiele prac. Zagadnienie to w stosunku do auksyn było wyczerpująco dyskutowane w pracy Maciejewskiej-Potapczykowej i dlatego ograniczę się tutaj do zreferowania tylko ostatnich znanych mi w tej dziedzinie wyników.

Znane dotąd wyniki wskazują na możliwość udziału auksyny w procesach syntezy białka enzymatycznego jako korepresora lub co najmniej substancji włączonej w system regulacji: represor-gen regulator-gen strukturalny DNA odpowiedzialny za uruchomienie lub zatrzymanie syntezy informacyjnego messengera RNA specyficznego dla określonych białek enzymatycznych.

Ostatnio przedstawione dane przez grupę badaczy z Purdue University w Lafayette, współpracujących z dr Key są próbą powiązania tych hipotez ze znany wpływ auksyny na plastyczność (lub rozciągliwość) błony rosnących komórek (Key i in. 1967). Badacze ci zastosowali inhibitory syntezy kwasu rybonukleinowego związanej z transkrypcją DNA w systemie, gdzie badali wpływ kwasu 2,4-dwuchloro-fenoksyoctowego na wzrost i plastyczne właściwości błony komórkowej hypokotyli soi. Badania wykazały, że antybiotyki hamujące syntezę kwasu rybonukleinowego i białka hamowały jednocześnie stymulację wzrostu pod wpływem auksyny oraz

zwiększenie rozciągliwości błony komórkowej. Ważnym było wykazanie, że istotną rolę odgrywało tu nie zahamowanie globalnej produkcji RNA i białek, lecz tylko pewnych specyficznych frakcji związanych ze wzrostem.

Celem wyjaśnienia tego zagadnienia Key i jego współpracownicy zbadali wpływ szeregu analogów pirymidynowych i purynowych na syntezę RNA i wydłużanie hypokotyli soi w obecności auksyny. Żadna z substancji analogów pirymidynowych nie hamowała wzrostu i syntezy RNA z wyjątkiem 5-fluorouracylu, który w badanych koncentracjach hamował tylko syntezę RNA bez wpływu na wzrost. 5-fluorouracyl nie hamował także syntezy białek. Analogi purynowe, 8-azaguanina i 6-metylpuryna zahamowały zarówno wzrost, jak i syntezę kwasu rybonukleinowego. Podobnie działał antybiotyk aktynomycyna D. Te ostatnie substancje hamowały też syntezę białek. Początkowo małą, a następnie wzmacniającą się inhibicję wywołaną działaniem aktynomycyny D, tłumaczy Key obecnością w okresie początkowym pewnego zapasu wcześniej wytworzonego messengera RNA, który ulega zużyciu. Zapas ten później nie zostaje już uzupełniony ponieważ aktynomycyna D hamuje jego syntezę *de novo*. Wnioskując na podstawie obserwacji szybkości hamowania wzrostu przez aktynomycynę D Key wysunął hipotezę, że synteza frakcji białka niezbędnej dla wzrostu była hamowana znacznie silniej, niż globalna synteza białek i że obieg specyficznego dla tej frakcji informacyjnego messengera RNA był szybszy, niż innych frakcji m-RNA. Ponieważ wzrost mógł się odbywać jednak mimo zahamowania syntezy RNA przez 5-fluorouracyl należało sprawdzić, których frakcji RNA synteza zostaje zahamowana. W doświadczeniu ze znakowanym P^{32} ortofosforanem stwierdzono, że w wyniku działania 5-fluorouracylu (w badanych koncentracjach) zahamowaniu ulegała synteza przede wszystkim rybosomowego RNA, a także tzw. frakcji rozpuszczalnej przenośnikowego RNA (transfer RNA) i DNA. Stosunkowo najmniejszej inhibicji ulegała frakcja, w której spodziewano się obecności informacyjnego RNA. Wnioski wysnute przez Keya na podstawie jego obszernej pracy są następujące: wydłużanie komórek w tkankach roślinnych uzależnione jest od stałej biosyntezy RNA i białka. Potrzeba syntezy RNA ogranicza się do konieczności syntezy frakcji zwanej D-RNA — tj. frakcji, której synteza uzależniona jest bezpośrednio od transkrypcji DNA, i w której przynajmniej część stanowi informacyjny m-RNA. Stymulujące wzrost działanie auksyny uzależnione jest także od syntezy RNA i białka. Działanie to nie polega na uaktywnianiu już istniejącego kwasu rybonukleinowego i białek. Wpływ auksyny na wzrost można też tłumaczyć stymulacją syntezy RNA w ujęciu globalnym, zaś w mniejszym stopniu białek. Synteza ta zawierałaby również frakcję, która tworzy się w wyniku bezpośredniej transkrypcji DNA.

W pracy Keya interesujące jest podkreślenie, że auksyna wzmacnia globalną syntezę RNA, szczególnie jego frakcji rybosomowej. Być może jest to przejawem podobnego mechanizmu działania jaki sugerował Lang w omawianej już poprzednio pracy dla działania gibereliny.

Interesującą pracę dotyczącą mechanizmu działania auksyny przedstawili

ostatnio w krótkim doniesieniu badacze współpracujący z Galstonem. Autorzy ci zademonstrowali wyniki badań wskazujące na istnienie w tkance łodygi grochu specjalnego kompleksu odpornego na działanie hydrolaz, złożonego z kwasu indolilo-3-octowego i kwasu rybonukleinowego. Kompleks ten należałby do frakcji rozpuszczalnego RNA tzn. 4s-RNA lub przenośnikowego t-RNA (Kaur-Sawhney i in. 1967).

Po okresie inkubacji tkanki w obecności znaczonego C^{14} -IAA badacze wyekstrahowali kwas rybonukleinowy i poddali działaniu szeregu enzymów hydrolitycznych. Następnie hydrolizat zawierający znaczoną frakcję RNA poddano dializie. Okazało się, że zastosowane enzymy i substancje umożliwiły uwolnienie się w czasie dializy większej części RNA. Niedializująca frakcja przejawiała jednak znacznie wyższy procent radioaktywności, niż wynikałoby to z założenia proporcjonalnej hydrolizy wszystkich frakcji. Dokonano próby uzyskania w warunkach sztucznych analogicznego kompleksu auksyny i RNA odpornego na działanie hydrolaz. Gdy hydrolizowano jednak frakcję 4s-RNA inkubowaną z C^{14} znakowaną auksyną w warunkach *in vitro* — tylko 3—5% radioaktywności udało się wykryć we frakcji pozostałej po oddializowaniu, chociaż na podstawie badania absorpcji w ultrafiolecie stwierdzono pozostanie około 15% nieoddializowanego RNA po zakończeniu dializy. Widać więc, że tworzenie się kompleksu IAA-RNA jest właściwe żywej tkance, a nie konsekwencją dalszych operacji związanych z preparowaniem. Celem bliższego poznania hipotetycznego kompleksu, Kaur-Sawhney i jego współpracownicy dokonali elektroforetycznego rozdzielania izolowanej znakowanej frakcji RNA. Badając położenie związku przy różnym pH badacze ci ustalili, że znaczone frakcja przemieszczała się zawsze na taką samą odległość podczas gdy zarówno kwas adenilowy, jak i cytydylowy zajmowały pozycje coraz bliższe anody w miarę wzrostu pH. Na podstawie dotychczasowych badań, autorzy sugerują, że IAA jest w tkance wiązany z cząsteczkami lekkiej frakcji RNA. Nie wypowiedają się oni jednak co do ewentualnego znaczenia wykrytego kompleksu.

Współdziałanie różnych substancji o charakterze stymulatorów wzrostu z syntezą kwasów nukleinowych i metabolizmem białek było badane szczególnie przez badacza japońskiego Masudę (1967). Doświadczenia swe przeprowadził Masuda na *Helianthus tuberosus*, u którego Adamson (1962) stwierdził, że kinetyna synergistycznie wzmacnia efekt wzrostu działania auksyny, a w r. 1963 Setterfield przedstawił wyniki badań interakcji gibereliny, auksyn i kinetyny na tym samym materiale roślinnym. Ten ostatni badacz wykazał wówczas, że giberelina synergistycznie wzmacnia stymulację wzrostu wydłużeniowego, ale hamowała podział komórek. W odpowiednim doświadczeniu Masuda wykazał, że kinetyna sama stymuluje wzrost w tym samym wymiarze co 2,4-D z dodatkiem kinetyny o ile badana tkanka została wcześniej poddana działaniu 2,4-D. Uprzednie oddziaływanie kinetyną przed inkubacją z 2,4-D nie dało tego samego efektu. Badając wpływ kwasu giberelinowego wykazano, że oddziaływanie tą substancją poprzedzające działanie 2,4-D lub 2,4-D z dodatkiem kinetyny powoduje wzmoczenie wzrostu w okresie późniejszym. Tak więc Masuda

wysnuł wniosek, że w stosowanych koncentracjach kinetyna jest mniej skuteczna niż auksyna i giberelina, jako czynnik przygotowujący lub przystosowujący tkankę do reakcji na kolejne działanie auksyny lub auksyny z kinetyną i dalej, że kwas giberelinowy czyni komórki wrażliwe na działanie auksyny lub auksyny z kinetyną, a kinetyna współdziała z auksyną.

Nie wglębiając się dalej w obszerną pracę Masudy, w której zastosował on selektywne inhibitory syntezy RNA i dokonał szczegółowych badań nad syntezą poszczególnych frakcji kwasów nukleinowych w powiązaniu z okresem wstępnego uwrażliwiania (lub uczulania) tkanki bulw *Helianthus tuberosus* na działanie auksyny lub auksyny z kinetyną, dalsze wnioski Masudy można przedstawić następująco:

Dwa typy RNA odgrywają ważną rolę w ciągu kolejnych okresów: przygotowawczego i okresu wzrostu tkanki bulw *Helianthus tuberosus*. Synteza frakcji lżejszej zachodzi w okresie uwrażliwiania i jest stymulowana przez giberelinę, a hamowana przez analogi zasadowe, lecz nie jest hamowana przez aktynomycynę D. Drugi typ RNA tworzy się w czasie działania auksyny i prawdopodobnie związany jest z transkrypcją DNA. Masuda przypuszcza, że ta frakcja RNA może być niezbędna dla syntezy specjalnego białka (lub białek) odpowiedzialnego za wzrost indukowany przez auksynę, jak sugerowali to uprzednio Noodén i Thimann (1963, 1965) oraz Key i Ingle (1964). Oczywiście charakter tego białka nie jest znany.

Badaniem współdziałania auksyny i kininy w związku z syntezą różnych frakcji kwasów nukleinowych w czasie wzrostu, z zastosowaniem m. in. techniki umożliwiającej badanie syntezy w wyizolowanych jądrach komórkowych przedstawił ostatnio Cherry (1967) ze wspomnianego już poprzednio Purdue University w Indiana. Jest to ciekawa praca, szczególnie ze względu na bardzo staranne przygotowanie metodyczne i warta przestudiowania.

Do podsumowania stanu wiedzy w zakresie mechanizmu działania substancji wzrostowych może być wykorzystane stanowisko v. Overbecka przedstawione już w r. 1966 w Science. A więc przede wszystkim zaczynamy sobie zdawać sprawę że:

1) miejsce działania hormonów, przynajmniej niektórych hormonów roślinnych jak i zwierzęcych znajduje się gdzieś na poziomie genu,

2) w pewnych przypadkach, prawdopodobnie poprzez stymulację syntezy cząsteczek informacyjnego m-RNA, hormony umożliwiają rozpoczęcie syntezy białka enzymów,

3) enzymy te z kolei kontrolują metabolizm i procesy fizjologiczne organizmu.

Przedstawiona powyżej koncepcja preferuje jedno miejsce działania hormonu podczas, gdy inne wpływy procesu następowałyby jako jego konsekwencja. V. Overbeck przestrzega przed przyjęciem tego zbyt, jak się wydaje, uproszczonego mniemania. Przytacza on dane Sweeney'a sprzed 25 lat wskazujące, że ruch protoplazmy w komórkach koleoptile pod wpływem auksyny przyśpiesza się w ciągu sekund. Tak szybkiej reakcji nie da się prawdopodobnie wyjaśnić uważając ją za wynik wpływu auksyny na syntezę enzymu poprzez wytworzenie specyficznego

m-RNA w procesie transkrypcji wzorca genetycznego DNA. Podobnie działanie szeregu hormonów zwierzęcych wpływających na syntezę RNA przejawia swój wpływ na organizm w jeszcze wcześniejszych reakcjach. Np. po wstrzyknięciu szczeruwi estrogenu, obieg krwi w naczyniach krwionośnych narządów płciowych samicy wzmagają się już po upływie 30 sekund. Dopiero po okresie pół godziny dostrzega się syntezę nowego białka. Jeżeli wstrzyknąć szczeruwi substancje z grupy glukokortykoidów, już po 30 sekundach obieg krwi w wątrobie ulega znacznemu wzmoczeniu, natomiast synteza RNA (wszystkich rodzajów) daje się stwierdzić dopiero po upływie szeregu godzin. Wreszcie po wstrzyknięciu androgenu w ciągu pół godziny podwaja się koncentracja koenzymu NAD, co nie jest uzależnione od syntezy nowego RNA. Przykładów można by przytoczyć więcej. Wszystkie one wskazują na to, że w licznych przypadkach działanie hormonu można wykryć na długo przed reakcją w postaci wzmoczonej syntezy kwasów nukleinowych. Tak więc chociaż nie ma wątpliwości, że działanie hormonów w pewnym punkcie swego mechanizmu dotyczy także syntezy RNA i białek, to jednak pozostaje wciąż do wyjaśnienia czy i w jakim stopniu rola hormonów związana jest z procesem transkrypcji kodu genetycznego DNA koniecznej w czasie syntezy informacyjnego messenger RNA. Nie jest wykluczone, że punktów działania hormonów jest więcej niż jeden. Na razie o istnieniu ich świadczą tylko liczne, chociaż o charakterze bardziej ogólnych korelacji, informacje. Bez wątpienia wkrótce i te zagadnienia będą przedmiotem szczegółowych badań, nie mniej dogłębnych od tych, które ujawniły związek działania hormonów z metabolizmem kwasów nukleinowych i białek.

LITERATURA

- Adamson D., 1962. *Can. J. Bot.*, 40, 719.
 Addicott F. T., Ohkuma K., Smith O. E., Thiessen W. E., 1966. *Adv. Chem.*, 53, 47.
 Briggs D. E., 1963. *J. Inst. Brewing*, 69, 13.
 Chandra G. R., Varner J. E., 1965. *Biochem. Biophys. Acta*, 108, 583.
 Cherry J. H., 1967. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 144, 154.
 Chrispeels M. J., Varner J. E., 1966. *Nature*, 212, 1066.
 Cleland R. E., 1967. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 144, 3.
 Cleland R. E., Burström H., 1961. *Handbuch der Pflanzenphysiologie.*, 14, 807.
 Fox J. E., 1966. *Plant Physiol.*, 11, 75.
 Haberlandt G., 1890. *Ber. Deut. Botan. Ges.*, 8, 40.
 Hayashi T., 1940. *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*, 16, 531.
 Kaur-Sawhney R., Bara M., Galston A. W., 1967. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 144, 63.
 Key J. L., Ingle J., 1964. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 52, 1382.
 Key J. L., Barnett N. M., Lin C. Y., 1967. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 144, 49.
 Lang A., Nitsan J., 1967. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 144, 49.
 Leopold A. C., 1955. *Auxin and Plant Growth*, Univ. Calif. Press, Berkeley, Los Angeles.
 Lockhart J. A., Bretz Ch., Kenner R., 1967. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 144, 19.
 MacLeod A. M., Millar A. S., 1962. *J. Inst. Brewing*, 68, 322.

- Maciejewska-Potapczykowa W., 1967. Substancje wzrostowe roślin P.W.R. L., Warszawa.
- Masuda Y., 1959. *Plant Physiol.*, 12, 324.
- Masuda Y., 1967. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 144, 68.
- Monod J., 1966. *Science*, 154, 475.
- Nitsan J., Lang A., 1965. *Develop. Biol.*, 12, 358.
- Nitsan J., Lang A., 1966. *Plant Physiol.*, 41, 965.
- Noodén L. D., Thimann K. V., 1963. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 50, 194.
- Noodén L. D., Thimann K. V., 1965. *Plant Physiol.*, 40, 193.
- Olszewska M. J., 1959a. *Acta Soc. Bot. Pol.*, 28, 175.
- Olszewska M. J., 1959b. *Exptl. Cell Res.*, 16, 193.
- Osborne D. J., 1962. *Plant Physiol.*, 37, 595.
- Paleg L., 1960. *Plant Physiol.*, 35, 902.
- Plant Growth Regulation, 4th International Conference on Plant Growth Regulation., 1961. The Iowa State Univ. Press Ames.
- Radley M., 1959. *Chemistry and Industry*, 1959, 877.
- Régulateurs Naturels de la Croissance Végétale. Colloques Intern. du Centre National de la Recherche Scientifique No 123., 1964. Ed. C. N. R. S. Paris.
- Setterfield G., 1963. *Symp. Soc. Expt. Biol.*, 17, 98.
- Silberger J., Skoog F., 1953. *Science*, 118, 443.
- Srivastava B. I. S., 1967. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 144, 260.
- van Overbeek J., 1966. *Science*, 152, 721.
- van Overbeek J., Loeffler J. E., Mason M. I. R., 1967. *Science*, 156, 1497.
- Varner J. E., 1964. *Plant Physiol.*, 39, 413.
- Varner J. E., 1967. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 144, 219.
- Varner J. E., Chandra G. R., 1964. *Proc. U. S. Nat. Acad. Sci.*, 52, 100.
- Yomo H., 1958. *Hakko Kyokai Shi*, 16, 444.
- Yomo H., 1960. *Hakko Kyokai Shi*, 18, 603.
- Yomo H., 1961. *Hakko Kyokai Shi*, 19, 284.