ACTA AGROBOTANICA
Vol. XXXII, (1): 27-37, 1979

Aktywność cytokininowa sześciu odmian Hordeum vulgare L.

B. POLITYCKA, A. STROIŃSKI, Z. KRZYWAŃSKI, M. W. BORYS

Zakład Fizjologii Roślin, Akademia Rolnicza w Poznaniu

(Przyjęto: 5 IV 1978)

B. Politycka, A. Stroiński, Z. Krzywański, M. W. Borys *(Academy of Agriculture, Dept. of Plant Physiology, Wołyńska 35, 60-637 Poznań)* Acta Agrobotanica 32 (1): 27-37 1979.

Cytokinin activity of six cultivars of Hordeum vulgare L.

Cytokinin activity was determined in roots, crowns, ears of six varieties of the barley in the tobacco Wisconsin 38 callus tissue test. Analysis was made in early stage of ears. The order increasing values of the total cytokinin activity (the total activity of compounds fitting their mobility with zeatin, zeatin ribosid and their more polar derivatives) were for most part of varieties: younger roots < older roots < crowns < ears. Dependences between the cytokinin activity and fresh weight of analysed material were not found.

WSTĘP

Z wielu gatunków roślin wydzielono, przy zastosowaniu kationitów i ekstrakcji *n*-butanolem, liczne cytokininy o zróżnicowanej ruchliwości chromatograficznej. Szczegółową analizę cytokinin w niedojrzałych nasionach kukurydzy przeprowadził Letham (1973).

W poprzedniej pracy (Jeske i in. 1977) na temat ogólnej aktywności cytokiniowej jęczmienia trzech odmian (cultivars) 'Antałek', 'Lubuski', 'Skrzeszowicki' stwierdzono, że w korzeniach, węzłach krzewienia, źdźbłach i kłosach aktywność taka występuje i jest zróżnicowana, zarówno w poszczególnych częściach rośliny, jak i pomiędzy odmianami. W tej pracy dokonano szczegółowej analizy wybranych frakcji uzyskanego widma chromatograficznego. Miała ona na celu stwierdzenie, czy istnieją zależności pomiędzy masą analizowanych części roślin, aktywnością enzymatyczną a aktywnością cytokininową, czego nie udało się stwierdzić badając sumaryczną aktywność cytokininową. W tym celu przeprowadzono rozdział chromatograficzny oraz zwiększono zakres stężeń ekstraktów pobieranych do biotestu. Zwiększono również liczbę badanych odmian.

MATERIAŁ I METODY

Sześć odmian jęczmienia: 'Alsa', 'Antałek', 'Cebeco', 'Lubuski', 'Skrzeszowicki' i 'Union' uprawiano w kulturach wodnych (Krzywański i in. 1976). Korzenie, węzły krzewienia i kłosy pobierano do analiz w fazie kłoszenia. Podziału na korzenie starsze i młodsze dokonano według długości systemu korzeniowego, dzieląc go na pół. Część, w której znajdowała się większość stożków wzrostu i najmłodsze korzenie, zaliczano do korzeni młodszych, a część przylegającą do węzła krzewienia zaliczano do korzeni starszych. Jako węzły krzewienia analizowano główne węzły krzewienia oraz jeden lub dwa węzły znajdujące się powyżej, z których wyrastały zaczątki korzeni przybyszowych. Kłosy pobierano całe po odcięciu od źdźbła. Zebrane części ważono i zamrażano w suchym lodzie: połowę plonu kłosów, węzłów, korzeni młodszych i korzeni starszych odmiany Lubuski oraz 1/4 plonu korzeni starszych pozostałych odmian.

Zamrożony materiał mielono i następnie zalewano etanolem w stosunku 1:9 (świeża masa : etanol). Tak potraktowane próby przechowywano w temperaturze pokojowej. Następnie próby poddawano wirowaniu, analizowano tylko supernatant, który doprowadzano NH_4OH do pH 8,8. Z kolei do ekstraktu etanolowego dodawano nasyconego roztworu $Ba(COOCH_3)_2$ (5 ml roztworu na 100 ml ekstraktu) i pozostawiono w temperaturze 8°C przez 24 h, po czym edwirowano, a supernatant zakwaszono HCl do pH 2,5. Cytokininy z zakwaszonego ekstraktu etanolowego wyodrębniono metodą Heide i Skooga (1967), za pomocą chromatografii kolumnowej, w której zastosowano Dowex 50 W×4 H^+ 50 — — 100 mesh. Cytokininy zaadsorbowane na jonicie eluowano 5N NH_4OH. Eluat zagęszczano na wyparce próżniowej w temp. 45°C i doprowadzano do pH 8,0. Z eluatu ekstrahowano cytokininy *n*-butanolem. Po wydzieleniu frakcji butanolowej zawierającej cytokininy, odparowano ją do sucha na wyparce próżniowej w temp. 45°C. Suchą pozostałość rozpuszczono w 1 ml 50% etanolu i nanoszono na bibułę chromatograficzną Whatman 3. Rozdziału eluatu dokonano mieszaniną rozwijającą o składzie *n-butanol:* kwas octowy: woda — 12:3:5. Rozwinięty chromatogram dzielono na 11 równych części o R_f=0-0,09; 0,09-0,18; 0,18-0,27; 0,27-0,36; 0,36-0,45; 0,45-0,54; 0,54-0,63; 0,63-0,72; 0,72-0,81; 0,81-0,91; 0,91-1,0. Uzyskany materiał wymywano 5 ml 50% etanolu przez 24 h.

5 ml roztworu wyjściowego rozcieńczano 50% etanolem następująco (stężenie c_1):

dla korzeni starszych odmiana 'Lubuski':		
pozostałe odmiany:	4	ml etanolu/100 g tkanki
dla korzeni młodszych:	18	ml etanolu/100 g tkanki

dla węzłów: 7,5 ml etanolu/100 g tkanki
dla kłosów: 20 ml etanolu/100 g tkanki

Otrzymane roztwory cytokinin pobierano do biotestu opartego na przyroście świeżej masy tkanki kalusa tytoniu Wisconsin 38 (Linsmaier i Skoog 1965). Pobierano roztwory w trzech stężeniach c_1, c_2 (roztwór c_1 rozcieńczano 10-krotnie) i c_3 (roztwór c_1 rozcieńczano 100-krotnie) w ilości 0,5 ml na 30 ml pożywki w kolbce.

Każdą próbę oznaczano w trzech stężeniach w 18 powtórzeniach (6 kolbek z trzema transplantami). Kombinację kontrolną stanowiły hodowle tkanki kalusa tytoniu rosnącej na pożywce z dodatkiem kinetyny w stężeniach 0,001; 0,005; 0,01; 0,03 i 0,06 mg na 1 l pożywki.

Oznaczono również ruchliwość chromatograficzną zeatyny i rybozydu zeatyny.

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Świeżą masę plonu z jednego wazonu przedstawiono w tabeli 1. Wyniki aktywności cytokininowej przedstawiono za pomocą histogramów (rys. 1, 2, 3 i 4) oraz w tabeli 2.

Histogramy wykazują duże zróżnicowanie aktywności cytokininowej zarówno pomiędzy poszczególnymi częściami rośliny, jak i pomiędzy odmianami.

Tabela 1 — Table 1

Plon świeżej masy (g) z jednego wazonu (4 rośliny)
Crop of the fresh weight (g) from one pot (4 plants)

Odmiana Cultivar	Korzenie starsze Older roots	Korzenie młodsze Younger roots	Węzły krzewienia Crowns	Kłosy Ears
'Alsa'	17,3	4,1	5,2	3,7
'Antałek'	25,3	4,2	5,4	2,6
'Cebeco'	24,2	4,1	6,9	3,2
'Lubuski'	17,3	2,0	7,2	3,0
'Skrzeszowicki'	21,4	2,7	5,9	1,8
'Union'	25,1	5,3	6,9	1,9

Zastosowanie w bioteście trzech rozcieńczeń analizowanej substancji pozwoliło wnioskować, że w przypadku gdy przy niższym rozcieńczeniu (c_1) otrzymano niższy przyrost tkanki w porównaniu do rozcieńczenia wysokiego (c_3), to analizowana próba odznacza się wyższą aktywnością cytokininową niż próba, dla której rozcieńczenie wyższe (c_3) wywołało niższy przyrost tkanki w porównaniu z niższym rozcieńczeniem (c_1).

Tabela 2 — Table 2

Maksymalne wartości aktywności cytokininowej uzyskane z chromatogramów (ryc. 1, 2, 3, 4)
Dane w μg kinetyny w przeliczeniu na 1 g świeżej masy analizowanej tkanki

Maximum values of cytokinin activity from chromatograms (Figs. 1, 2, 3, 4)
Data in μg kinetin per 1 g fresh weight of analysed tissue

Odmiana Cultivar	'Alsa					'Antałek'					'Cebeco'				
R_f	0,0-0,18	0,18-0,27	0,36-0,45	0,63-0,72	0,72-0,81	0,0-0,18	0,18-0,27	0,36-0,45	0,63-0,72	0,72-0,81	0,0-0,18	0,18-0,27	0,36-0,45	0,63-0,72	0,72-0,81
Korzenie młodsze Younger roots	0	26,4 [3]	32,9 [3]	2,0 [2]	26,4 [3]	0,02	2,1 [2]	0	0,3 [2]	1,8 [2]	0,2 [1]	30,0 [3]	0,9 [2]	15,4 [3]	1,8 [2]
Korzenie starsze Older roots	0,008	0,2 [2]	0,2 [2]	3,9 [3]	3,9 [3]	0,008	0,02 [1]	0,4 [2]	3,9 [3]	0,2 [3]	0,4 [2]	0,8 [2]	15,6 [3]	5,5 [3]	23,4 [3]
Węzły krzewienia Crowns	27,5 [3]	14,2 [3]	0,3 [1]	9,6 [3]	13,8 [3]	0,02	0,1 [1]	13,8 [3]	1,4 [2]	1,1 [2]	1,4 [2]	2,7 [2]	27,4 [3]	1,1 [3]	2,7 [2]
Kłosy Ears	0,3 [1]	10,3 [2]	108,9 [3]	10,9 [2]	36,3 [3]	36,5 [3]	36,5 [3]	3,6 [2]	3,6 [2]	3,6 [2]	72,1 [3]	0,3	3,6 [2]	10,8 [2]	10,8 [2]

Odmiana Cultivar	'Lubuski'					'Skrzeszowicki'					'Union'				
R_f	0,0-0,18	0,18-0,27	0,36-0,45	0,63-0,72	0,72-0,81	0,0-0,18	0,18-0,27	0,36-0,45	0,63-0,72	0,72-0,81	0,0-0,18	0,18-0,27	0,36-0,45	0,63-0,72	0,72-0,81
Korzenie młodsze Younger roots	0	10,0 [3]	1,6 [2]	2,6 [2]	10,0 [3]	0,003	0,03 [1]	0,1 [1]	1,0 [2]	1,7 [2]	0	1,7 [2]	16,7 [3]	16,7 [3]	33,2 [3]
Korzenie starsze Older roots	0,005	1,9 [3]	0,01	0,005	0,01	0	5,4 [3]	0,15 [1]	0,4 [2]	0,5 [2]	1,6 [3]	0,2 [2]	0,8 [2]	0,02	0,8 [2]
Węzły krzewienia Crowns	4,1 [3]	9,6 [3]	4,1 [3]	0,04	0,04	27,1 [3]	0,27	27,1 [3]	27,1 [3]	27,1 [3]	1,4 [2]	2,1 [2]	0,2 [1]	1,4 [2]	13,9 [3]
Kłosy Ears	11,0 [2]	109,6 [3]	29,2 [3]	36,5 [2]	36,5 [3]	0,3 [1]	0,3 [1]	0,3 [1]	2,9 [1]	0,2 [1]	11,0 [2]	11,0 [3]	36,6 [3]	11,0 [2]	11,0 [2]

Wartości z wskaźnikiem (Values with index)

[1] — odpowiadają roztworom o stężeniu c_1 (respond to solution in concentration c_1).

[2] — odpowiadają roztworom o stężeniu c_2 (respond to solution in concentration c_2).

[3] — odpowiadają roztworom o stężeniu c_3 (respond to solution in concentration c_3).

Wartości bez wskaźnika dotyczą przypadków, kiedy wartości maksymalnej nie można przypisać jednoznacznie jednemu roztworowi (Values without in deal with events, when maximum value can not be ascribed to one solution).

Analizę otrzymanych histogramów przeprowadzono porównując aktywności cytokininowe dla pięciu wybranych frakcji o ruchliwości chromatograficznej (R_f): I — 0-0,18; II — 0,18-0,27; III — 0,36-0,45; IV — — 0,63-0,72; V — 0,72-0,81. Wyniki przedstawiono w tabeli 2.

Ruchliwością mniejszą od 0,1 charakteryzują się substancje bardziej polarne od zeatyny, mieszczące się w zakresie frakcji I. Letham (1973) zidentyfikował w tej frakcji w nasionach kukurydzy następujące związki: 5'-monofosforan rybozydu zeatyny, 6-(1-karboksy-2-hydroksypropyloamino)-9' rybofuranozylopurynę i 6-(1,2-dwukarboksyetyloamino)-9-b--D rybofuranozylo-purynę.

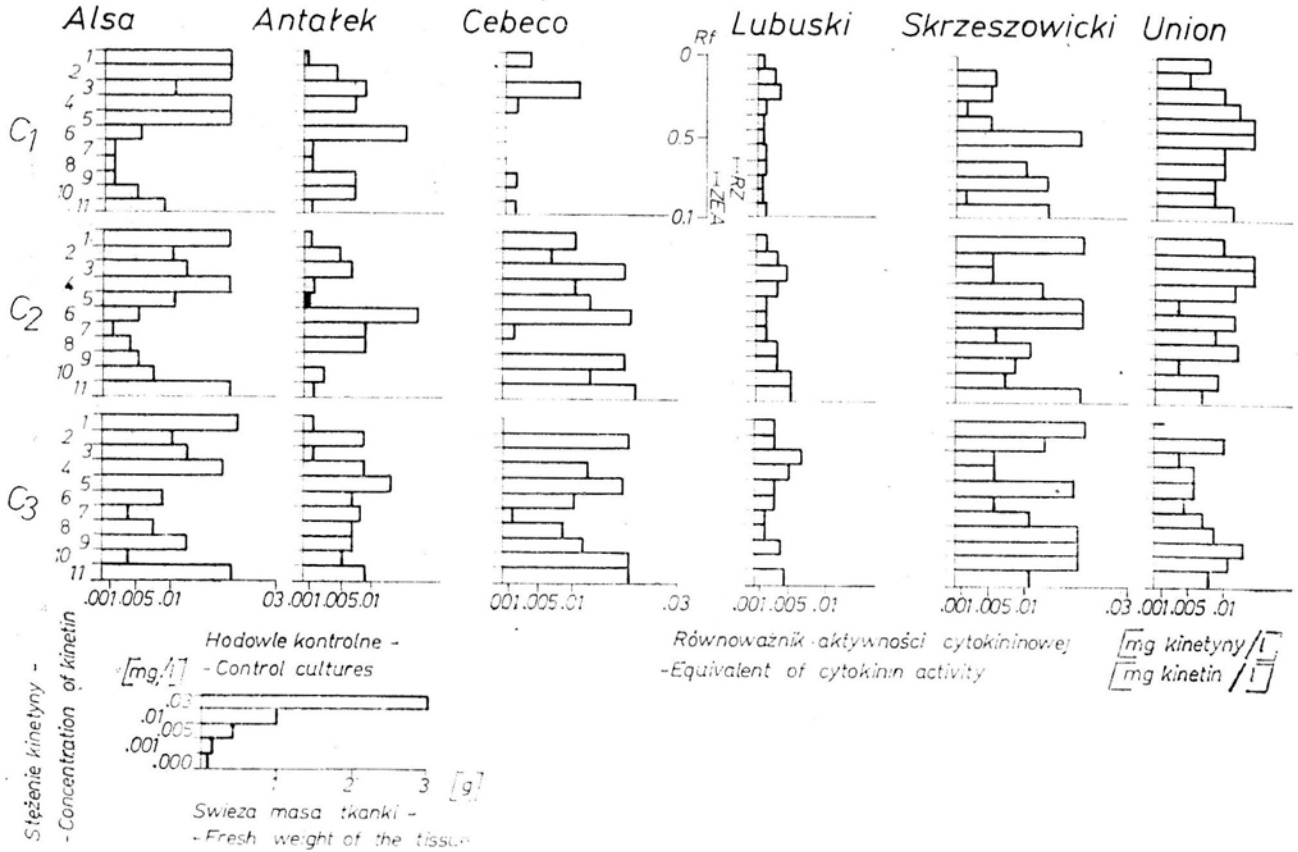
W korzeniach niską aktywność tej frakcji wykazuje jedynie odmiana 'Cebeco' i 'Union'. Natomiast w węzłach krzewienia i kłosach aktywność tej frakcji jest wysoka. Zaobserwowano duże zróżnicowanie pomiędzy odmianami. U odmian 'Alsa' i 'Skrzeszowicki' aktywność tej frakcji w węzłach krzewienia jest większa niż u pozostałych odmian.

W kłosach natomiast frakcja ta jest bardziej aktywna u odmian 'Antałek', 'Cebeco', 'Lubuski' i 'Union' niż u odmian 'Alsa' i 'Skrzeszowicki'.

Frakcję II stanowi 9-glukozyd zeatyny (Lethman 1973) — o ruchliwości chromatograficznej 0,25. Podobnie jak w przypadku frakcji I, obserwujemy większą aktywność tej frakcji w korzeniach młodszych, węzłach krzewienia i kłosach niż w korzeniach starszych. W korzeniach młodszych największą aktywność wykazywały odmiany 'Alsa' i 'Cebeco', a w korzeniach starszych odmiana 'Skrzeszowicki'. Względnie najniższe wartości tej frakcji w korzeniach posiadają odmiany 'Antałek' i 'Union'. W węzłach krzewienia najwyższą aktywność wykazywały odmiana 'Alsa' i 'Lubuski', najniższą odmiana 'Antałek'. W kłosach frakcja ta była najbardziej aktywna u odmian 'Lubuski' i 'Antałek'.

W zakresie frakcji III znajdują się według Lethmana (1973) 6--(-2,3,4-trójhydroksy)3-metyl-butylamino)puryna, 6-(3,4-dwuhydroksy-3--metyl-butylamino)puryna i 2-hydroksyzeatyna o $R_f = 0,4$. W korzeniach młodszych frakcja ta jest najaktywniejsza u odmiany 'Alsa' i 'Union', a w korzeniach starszych u odmiany 'Cebeco'. Najniższą aktywność dla obu rodzajów korzeni wykazywała odmiana 'Antałek'. Przy ogólnie wysokiej aktywności w węzłach krzewienia wszystkich badanych odmian najwyższą wartość zanotowano u odmian 'Cebeco' i 'Skrzeszowicki'. W kłosach frakcja ta była najaktywniejsza u odmian 'Alsa' i 'Lubuski', najsłabsza u odmiany 'Skrzeszowicki'.

W zakresie frakcji IV znajduje się rybozyd zeatyny o $R_f = 0,69$ (patrz rys. 1, 2, 3, 4). U większości odmian najwyższą aktywność tej frakcji obserwowano w kłosach, a najniższą w korzeniach starszych. W tych ostatnich u odmiany 'Cebeco' znaleziono względnie wysoką aktywność cytokininową, a najniższą u odmiany 'Lubuski' i 'Union'. W węzłach krze-

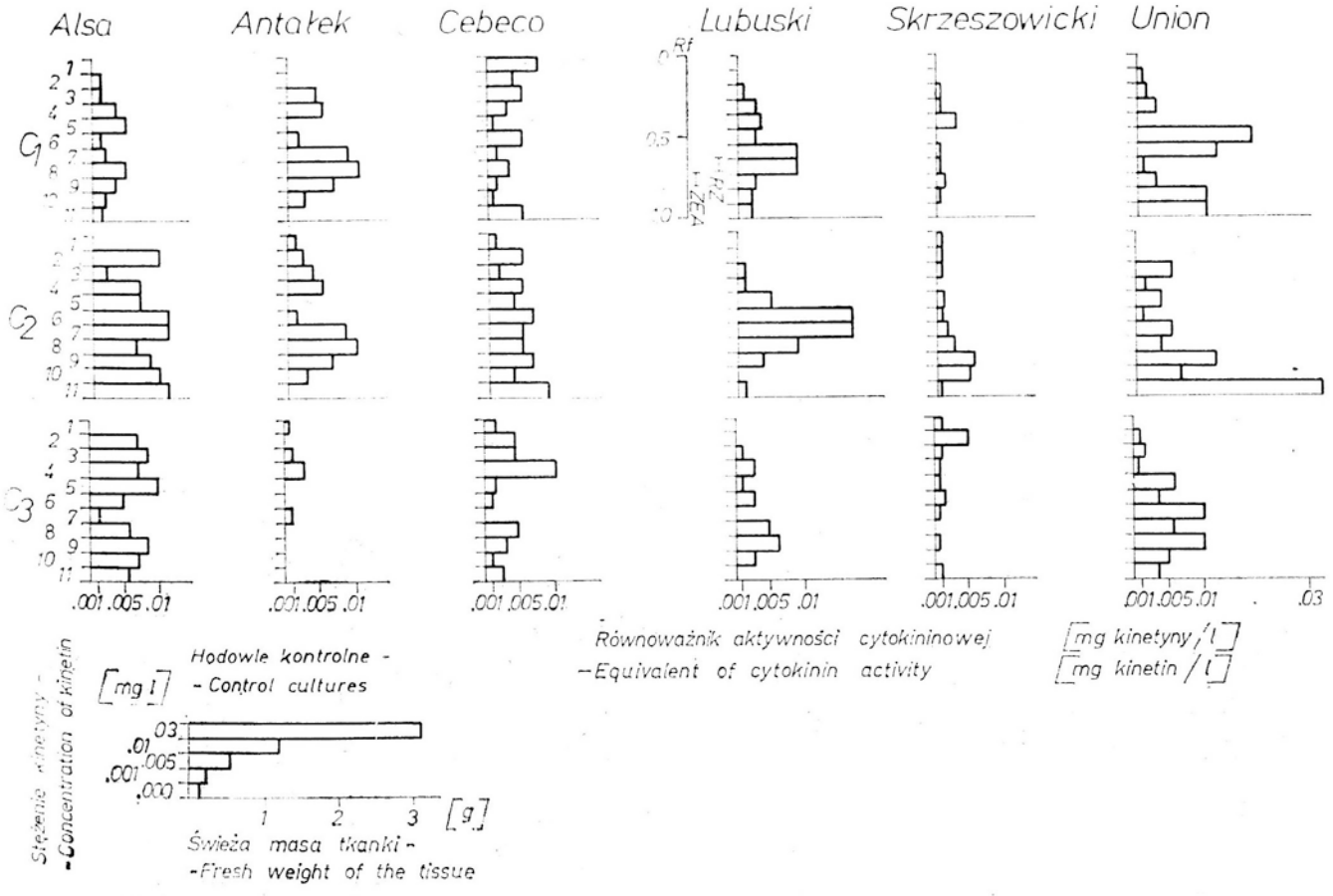


Rys. 3. Histogramy aktywności cytokininowej w analizowanej masie węzłów

Objaśnienia jak na rys. 1.

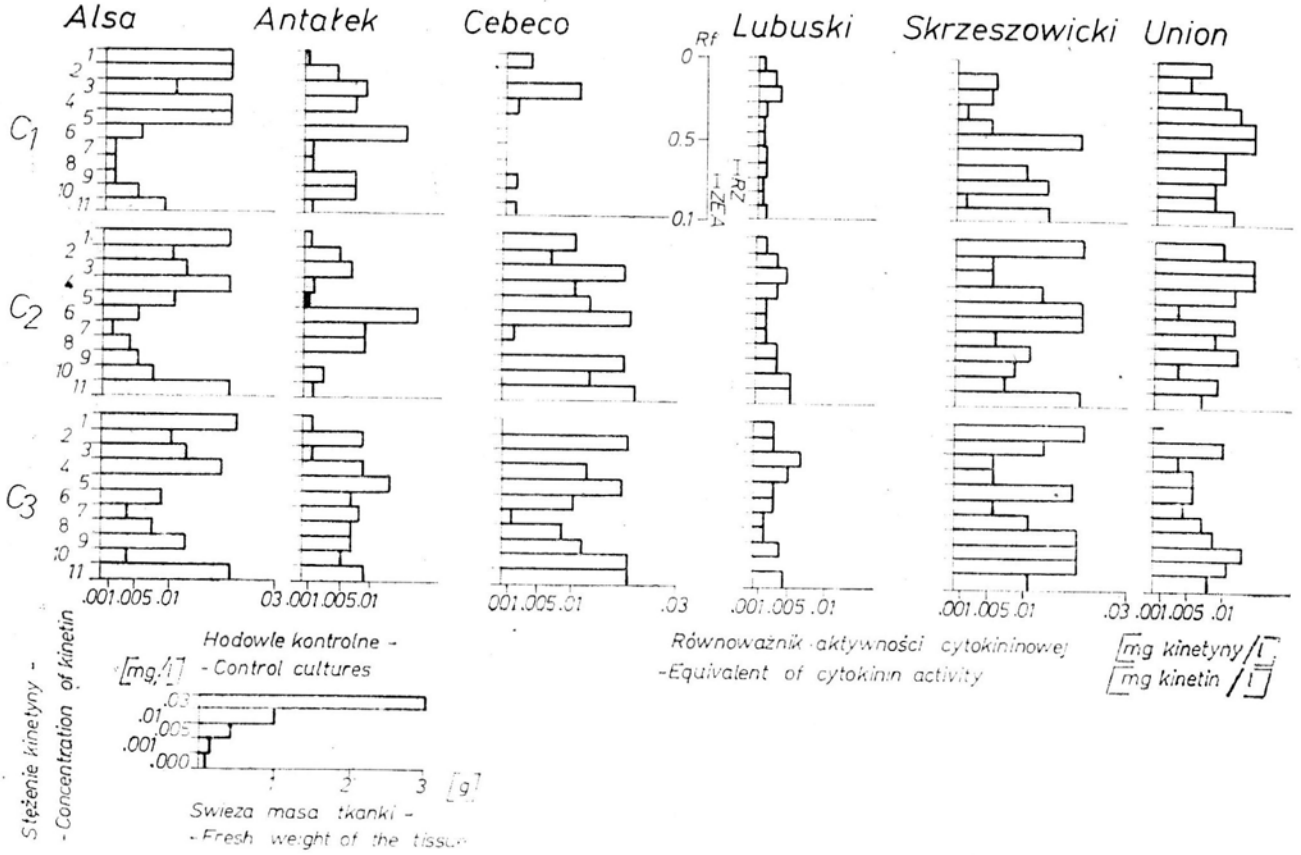
Fig. 3. Histograms of cytokinin activity in analysed weight of crowns

Explanations as Fig. 1.



Rys. 2. Histogramy aktywności cytokininowej w analizowanej masie korzeni młodszych
Objaśnienia jak na rys. 1.

Fig. 2. Histograms of cytokinin activity in analysed weight of younger roots
Explanations as Fig. 1.

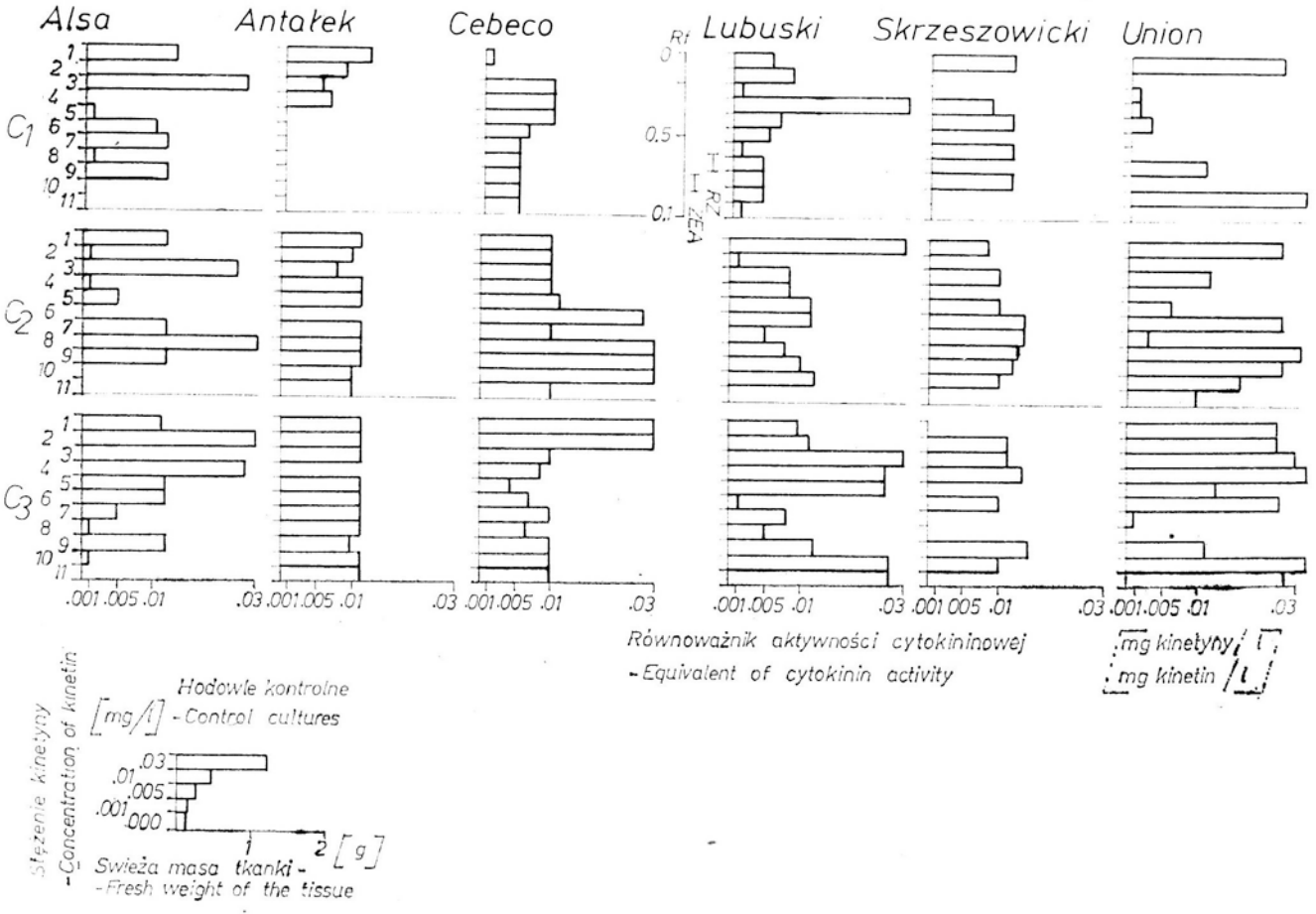


Rys. 3. Histogramy aktywności cytokininowej w analizowanej masie węzłów

Objaśnienia jak na rys. 1.

Fig. 3. Histograms of cytokinin activity in analysed weight of crowns

Explanations as Fig. 1.



Rys. 4. Histogramy aktywności cytokininowej w analizowanej masie kłosów
Objaśnienia jak na rys. 1.

Fig. 4. Histograms of cytokinin activity in analysed weight of ears
Explanation as Fig. 1.

wienia najbardziej zasobną w tę frakcję okazała się odmiana 'Skrzeszowicki', najmniej — 'Lubuski'.

W zakresie frakcji V znajduje się zeatyna o $R_f = 0{,}75$ (patrz rys. 1, 2, 3, 4). W korzeniach młodszych najwyższą aktywność tej frakcji wykazywały odmiany 'Alsa' i 'Union', w korzeniach starszych odmiana 'Cebeco', w węzłach odmiana 'Skrzeszowicki', a w kłosach 'Alsa' i 'Lubuski'.

Porównując wartości ogólnej aktywności cytokininowej dla odmian 'Alsa', 'Lubuski' i 'Skrzeszowicki' uzyskane w pracy Jeske i in. (1977) z wartościami sumarycznej aktywności pięciu frakcji uzyskanymi w niniejszej pracy możemy stwierdzić, że uszeregowania tych trzech odmian pod względem wzrastającej aktywności nie są zgodne. Różnice te mogą wynikać z występowania kilku substancji o aktywności cytokininowej, które w przypadku rozdzielenia wykazują inny poziom aktywności, niż gdy występują łącznie, ponieważ wartość aktywności ogólnej może być wyrazem nakładania się działania typu addytywnego lub synergistycznego.

Jeżeli podsumujemy aktywność cytokininową tych pięciu frakcji dla korzeni młodszych, to możemy powiedzieć, że najniższą aktywność wykazała odmiana 'Antałek' i 'Skrzeszowicki'. W korzeniach starszych najmniejszą aktywnością charakteryzowała się odmiana 'Lubuski', największą zaś odmiana 'Cebeco'.

Charakterystyczną cechą odmiany 'Cebeco' jest względnie wysoka i mniej więcej równa aktywność cytokininowa w korzeniach młodszych i starszych. Odmiany 'Antałek' i 'Skrzeszowicki' posiadają niską aktywność cytokininową w obu częściach systemu korzeniowego. U odmian 'Alsa' i 'Union' bardzo wysoką aktywność mają korzenie młodsze. W węzłach krzewienia najwyższą aktywnością odznaczają się odmiany 'Alsa' i 'Skrzeszowicki'. Spośród analizowanych części rośliny największą aktywność cytokininową wykazują kłosy, szczególnie u odmian 'Alsa' i 'Lubuski'. Kłosy odmiany 'Skrzeszowicki' miały w porównaniu z innymi odmianami niską aktywność.

WNIOSKI

Wyniki uzyskane w poprzedniej pracy na temat ogólnej aktywności cytokininowej w korzeniach, węzłach krzewienia, źdźbłach i kłosach trzech odmian jęczmienia dowiodły, że aktywność taka występuje i jest zróżnicowana w poszczególnych częściach rośliny oraz zmienia się w zależności od fazy wzrostu. Zaznaczyły się też różnice międzyodmianowe (Jeske i in. 1977).

Wyniki uzyskane w tej pracy potwierdziły istnienie tych różnic, jak również fakt występowania maksymalnej aktywności cytokininowej w kłosach w fazie kłoszenia oraz potwierdziły przypuszczenia, że badana

substancja jest mieszaniną związków wykazujących aktywność w teście cytokininowym.

Dla większości badanych odmian uszeregowanie części roślinnych pod względem wzrastającej aktywności sumarycznej było następujące: korzenie młodsze < korzenie starsze < węzły krzewienia < kłosy.

Z uszeregowania wartości aktywności cytokininowej wynika, że kłosy są najbardziej zasobne w substancje cytokininopodobne przy jednocześnie niskiej aktywności oksydazy IAA i peroksydazy (Krzywański i in. 1976).

Uszeregowanie odmian według wartości aktywności cytokininowej frakcji o R_f=0,0-0,18 dla korzeni starszych i młodszych wykazuje pewną zbieżność do uszeregowania odmian przez wartości aktywności peroksydazy, natomiast frakcja o R_f=0,36-0,45 wykazuje podobną zbieżność do szeregu odmian utworzonego przez wartości aktywności oksydazy IAA (Krzywański i in. 1976).

Brak natomiast zależności pomiędzy uszeregowaniem wartości świeżej masy a aktywnością cytokininową badanego materiału.

Opierając się na pracach Letham a (1973) możemy przypuszczać, że badane ekstrakty zawierały, poza zeatyną i rybozydem zeatyny, ich bardziej polarne pochodne, jak np. 5′-mono-fosforan rybozydu zeatyny, 9-glukozyd zeatyny, czy 2-hydroksyzeatynę.

LITERATURA

Heide O. M., Skoog F., 1967, Cytokinin activity in *Begonia* and *Bryophyllum*. Physiol. Plant. 20.

Jeske G., Borys M. W., Krzywański Z., Stroiński A., 1977, Dziedziczenie systemów korzeniowych jęczmienia. VI. Aktywność cytokininowa korzeni i części nadziemnych jęczmienia. PTPN. Prace Kom. Nauk Roln. i Kom. Nauk Leśn. 43: 99-107.

Krzywański Z., Stroiński A., Wójcik-Wojtkowiak D., Borys M. W., 1976, Dziedziczenie systemów korzeniowych jęczmienia. IV. Aktywność oksydazy IAA i peroksydazy w różnych częściach roślin sześciu odmian jęczmienia. PTPN. Prace Kom. Nauk Roln. i Kom. Nauk Leśn. 41: 245-250.

Krzywański Z., Wójcik-Wojtkowiak D., Borys M. W., Stroiński A., Wojciechowski J., 1976, Dziedziczenie systemów korzeniowych jęczmienia. II. Wskaźniki rozmiarów systemu korzeniowego jęczmienia odmian Gryf, Lubuski i Skrzeszowicki, rosnących w kulturach wodnych. PTPN. Prace Kom. Nauk Roln. i Kom. Nauk Leśn. 41: 231-238.

Letham D. S., 1973, Cytokinins from *Zea Mays*. Phytochemistry 12: 2445-2455.

Linsmaier E. M., Skoog F., 1965, Organic growth factory requirements of tobbaco tissue culture. Physiol. Plant. 18: 100-127.