Działanie kinetyny wyizolowanej z kwasu dezoksyrybonukleinowego (z grasicy) na tkanki roślinne (część I)

The effect of kinetin isolated from thymus DNA on plant tissues (part I)

A. DMOCHOWSKI, W. MACIEJEWSKA-POTAPCZYKOWA, E. SEMPINSKA

W interpretacji procesów wzrostowych roślin coraz więcej uwagi poświęca się dziś roli kwasów nukleinowych.

Niektórzy autorzy (Sk o o g, M i l l e r 1955) uważają, że auksyny w komórkach roślinnych są stymulatorami syntezy kwasów nukleinowych.

W ostatnich latach 1954—56 ukazały się prace Sk o o g a (1955), których przedmiotem badań jest współzależność między działaniem auksyn oraz niektórych składników kwasów nukleinowych: zasad purynowych i pirymidynowych. Badania Sk o o g a wykazały szczególnie wyraźne współdziałanie między kwasem β -indolooctowym (IAA) i adeniną. Autor ten stwierdził na wycinkach łodygi tytoniu, hodowanych *in vitro*, że adenina pobudza, a kwas β -indolooctowy hamuje powstawanie pąków u tej rośliny, a dopiero określona równowaga między stężeniami IAA i adeniny jest czynnikiem decydującym o ich powstawaniu.

Ponieważ w procesach wzrostowych roślin, a szczególnie w formowaniu się nowych organów, czynnikiem bardzo istotnym są podziały komórkowe, przeto wyżej już wspomniani badacze, a także inni autorzy zwrócili szczególną uwagę na drożdże, a ostatnio także na płynny endosperm orzecha kokosowego (S c h a n z a. S t e w a r d 1955, W i g g a n s 1954), które to rośliny okazały się bogatym źródłem nukleinowych substancji wzrostowych o ogromnej aktywności cytogenetycznej, wpływających na zwiększenie intensywności podziałów komórkowych.

Występowanie podobnie biologicznie aktywnych czynników wzrostowych roślin stwierdził także M i l l e r w materiale zwierzęcym, a mianowicie w starych preparatach spermy śledzia oraz w grasicy cielęcej.

Ponieważ aktywne substancje wzrostowe występujące w materiale roślinnym i zwierzęcym wykazywały własności związków purynowych,

fakt ten nasunął myśl użycia kwasu dezoksyrybonukleinowego (KDN) grasicy jako materiału wyjściowego dla izolowania substancji fizjologicznie czynnych przy podziałach komórkowych roślin.

W toku częściowego rozkładu KDN udało się Millerowi, Skoogowi i ich współpracownikom (1955a, 1955b) wyizolować substancję o ogromnej aktywności biologicznej, która okazała się pochodną adeniny, a mianowicie 6-furfurylaminopuryną o wzorze empirycznym $C_{10}H_9N_5O$, a strukturalnym:

i została nazwana kinetyną.

Związek ten otrzymano później także i na drodze syntezy adeniny i dezoksyrybozy (Hall a. de Roppe 1955).

Fizjologiczny efekt kinetyny, która działa tylko w obecności kwasu indoloocetowego polega na stymulacji cytokinezy, przy czym kinetyna jest aktywna jeszcze w stężeniu $1 \mu\text{g/l}$.

Obok kinetyny istnieje szereg substancji o podobnym do niej działaniu, jak np. dwufenylomocznik. Substancje o podobnym jak kinetyna działaniu cytogenetycznym nazwano kininami (Skoog, Miller 1956). Kinetyna jest więc specyficzną kininą, podobnie jak kwas β -indoloocetowy jest specyficzną auksyną.

Obok badań nad działaniem tych związków na rośliny ukazały się również prace poświęcone ich hamującemu działaniu na tkanki zwierzęce (Ham, Lettré 1956).

W Zakładzie Biochemii Uniwersytetu Łódzkiego podjęto ostatnio prace nad kinetyną, a ich etapem wstępnym było przede wszystkim otrzymanie tej substancji z KDN grasicowego, a dalej wyszukanie odpowiednich roślin testowych, szczególnie wrażliwych na jej działanie. Praca niniejsza stanowi punkt wyjścia dla zamierzonych dalszych badań nad kinetyną i jej fizjologicznym działaniem na rośliny.

Kinetynę do badań testowych otrzymano według wskazówek Millera i Skooga (1955a, b) ze starego preparatu kwasu dezoksyrybonukleinowego firmy Light, który autoklawowano w buforze o pH 4,3 w 120°C , w ciągu 1 godziny. Otrzymany roztwór zobojętniano do pH 7

i ekstrahowano z niego kinetynę eterem. Eter odparowywano, a pozostałość rozpuszczano w wodzie zakwaszonej H_2SO_4 . Roztwór zadawano azotaniem srebra w celu wytrącenia kinetyny i zanieczyszczeń purynowych (głównie adeniny). Osad soli srebrowych rozkładano kwasem solnym, a następnie poddawano rozdzielowi chromatograficznemu.

Miller i Skoog stosowali przy otrzymywaniu kinetyny chromatografię kolumnową. W naszych badaniach rozdział przeprowadzano na bibule Whatman nr 1 w rozpuszczalniku Wyattta (1956) składającym się z alkoholu izopropylowego, wody i kwasu solnego. Położenie kinetyny na bibule ustalano przy zastosowaniu testu rtęciowego (Vischer, Chargaaff 1948). Test ten polega na przeprowadzeniu związków purynowych w sole rtęciowe, a następnie rozłożeniu kompleksów rtęciowych siarczkiem amonu, powodującym powstawanie ciemno-brunatnych plam siarczku rtęci w miejscach, gdzie znajdowały się puryny lub ich pochodne. W rozpuszczalniku Wyattta kinetyna wędruje szybciej niż adenina i inne puryny, jej R_f wynosi 0,78, podczas gdy adeniny 0,36; plama jest jednakże rozciągnięta.

Eluaty kinetyny z rozwiniętych chromatogramów po przebadaniu spektrofotometrycznym, polarograficznym i kolorymetrycznym używano do badań na testach roślinnych.

Wyniki analiz spektrofotometrycznych zgodne są z danymi Millera i Skooga (1955a, b) oraz Bullocka, Handa i Stokstada (1956), a mianowicie maksimum pochłaniania w 0,1 n HCl zaznacza się przy 274 m μ , podczas gdy adeniny przy 260 m μ .

Polarogramy wykazują podobieństwo do polarogramów adeniny. Bliższe dane chemiczne i polarograficzne ukażą się w r. 1957 w Biuletynie PAN.

Stężenia kinetyny w eluatach wynosiły 1—3 μ g/ml. Eluaty do badań testowych zobojętniano do pH 7.

Skoog, Miller i ich współpracownicy w swych badaniach nad działaniem kinetyny jako stymulatora podziałów komórkowych używali wycinków rdzenia łodygi tytoniu hodowanych in vitro.

Pod wpływem kinetyny z dodatkiem kwasu β -indoloocetowego powstawała na badanych wycinkach tkanka kallusowa dająca początek pąkom.

Reakcją na działanie kinetyny było również korzenie się wycinków łodyg i stymulacja wzrostu siewek tytoniu, jak również przyspieszenie kiełkowania nasion sałaty. Test tytoniowy najczęściej używany przez Skooga i Millera, przy którym to teście miarą aktywności badanych substancji wzrostowych jest intensywność podziałów komórkowych przy tworzeniu się tkanki kallusowej i pąków, wymaga długotrwałych hodowli tkanek in vitro na specjalnych pożywkach.

W naszych badaniach chodziło o wyszukanie odpowiednio czułych roślin testowych, których reakcja na działanie kinetyny byłaby możliwie wyraźna i szybka.

W tym celu przebadano szereg roślin spośród których wybrano kilka najbardziej wrażliwych na działanie kinetyny, a mianowicie: groch, ziemniak, marchew i wątrobowiec *Riccia fluitans* L.

Groch

W literaturze (Bonner i English cyt. przez Bera 1950) spotykamy wzmianki o użyciu niedojrzałych strąków niektórych roślin motylkowych jako testu na obecność jednego z hormonów przyranych — traumatyny.

Usuwa się ze strąka nasiona, a na wewnętrznej wyściółce rozpołowionego strąka umieszcza się badaną substancję. Reakcją na obecność traumatyny było powstawanie brodawkowatych zgrubień na wewnętrznej wyściółce strąka bobu. Brodawki te składały się z komórek mięksiszowych, dzielących się intensywnie, ustawionych prostopadle do osi strąka.

W badaniach naszych przeprowadzono szereg podobnych prób z kinetyną na różnych roślinach motylkowych.

Najodpowiedniejsze do tego testu okazały się niedojrzałe strąki grochu polnego (*Pisum sativum*) w pierwszej połowie sierpnia. Ze strąków usuwano nasiona. Jednej połowy tego samego strąka używano jako kontrolnej, drugiej jako doświadczalnej. Do zagłębień po nasionach wpuszczano

Ryc. 1. Otwarty strąk grochu
Open pea siliqua

po kilka kropel: do połówki kontrolnych wody destylowanej, do połówki doświadczalnych roztworów o stężeniach 10^{-5} — 10^{-9} % a) kinetyny b) kwasu β -indolooctowego c) mieszaniny kinetyny i kwasu β -indolooctowego d) adeniny wyeluowanej z chromatogramów. Strąki umieszczano w atmosferze wilgotnej, w zamkniętych krystalizatorach na bibule zwilżonej wodą destylowaną. Już po 18—48 godzinach doświadczenia można było obserwować na strąkach zadziałanych kinetyną powstawanie zgru-

bień wypełniających zagłębienia po nasionach i stanowiących jak gdyby błonkę na powierzchni wyściółek także poza zagłębieniami.

Obserwacja mikroskopowa preparatów epidermy z miejsc strąka, na których powstały zgrubienia, wykazała obecność silnie wydłużonych pal-

czastych komórek, ustawionych prostopadłe do osi strąka. Komórki takie spotykano bardzo rzadko na preparatach epidermy strąków kontrolnych, względnie potraktowanych samą adeniną czy kwasem β -indolooctowym.

Ryc. 2. Preparaty epidermy wewnętrznej wyściółki strąków a — kontrolny; b, c — traktowane kinetyną w stęż. 10^{-6} ;
Preparates of epiderm of the internal halves of the siliquas,
a — control; b, c — treated with kinetin (conc. 10^{-6});

Czy te silnie wydłużone, palczaste komórki powstały na skutek rozrostu komórek epidermy czy też w wyniku ich podziału, wykaże analiza cytologiczna.

Używając opisanego testu najlepsze wyniki osiągnięto przy zastosowaniu kinetyny w stężeniach 10^{-5} i 10^{-6} ‰, ale substancja ta była czynna jeszcze w stężeniu 10^{-9} ‰. Przy dodaniu do kinetyny kwasu β -indolooctowego otrzymano podobną reakcję strąków, ale nie stwierdzono jej wzmocnienia ani przyspieszenia.

Być może kwas β -indolooctowy występuje w strąkach w takich ilościach, że dodanie jego z zewnątrz pozostaje już bez wpływu.

Test grochowy jest bardzo wygodny i czuły, ale ogromną jego wadą jest to, że można stosować go tylko przez kilka tygodni letnich, kiedy strąki grochu są zupełnie niedojrzałe. Strąki bardziej dojrzałe zupełnie się do tej próby nie nadają.

Ziemniak

Do badań użyto kłąbów ziemniaka *Solanum tuberosum*. Ścinano szczytową część kłąbu ziemniaka z „oczkami“. Odcinki przemywano przez kilka godzin bieżącą wodą, aby wypłukać możliwie dokładnie wytwarzane przez uszkodzone komórki hormony przyrannne. Woda wodociągowa silnie w tym czasie chlorowana stanowiła jednocześnie czynnik odkażający. Po obsuszeniu powierzchnie przekroju ziemniaków zwilżano roztworami o stężeniach 10^{-5} — 10^{-9} % a) kinetyny, b) kwasu β -indolooctowego c) mieszaniną kinetyny i kwasu β -indolooctowego d) adeniny. Po przesuszeniu odcinki ziemniaków umieszczano na wilgotnej bibule w kryształizatorach nakrytych szklanymi płytkami (kryształizatory, płytki, bibuła i woda były uprzednio sterylizowane).

Charakterystyczną reakcją ziemniaka na działanie kinetyny było silne zarysowanie się i jakby rozcięcie przetchlinek. Również w doświadczeniach przeprowadzanych w trakcie okresu spoczynkowego zaobserwowano pobudzenie kiełkowania kłąbów. Doświadczenie to przeprowadzano w kwietniu i maju na ziemniakach znajdujących się w stanie aktywności fizjologicznej i silnie już kiełkujących oraz w sierpniu, wrześniu i październiku na ziemniakach świeżo wykopanych, znajdujących się w okresie spoczynku.

Na podkreślenie zasługuje fakt, że o ile na jesieni dla wywołania rozęcia przetchlinek u ziemniaków znajdujących się w okresie spoczynkowym wystarczało zastosowanie samej kinetyny już w stężeniu 10^{-7} % w ciągu 24—48 godzin, to na wiosnę u ziemniaków już kiełkujących rozdymanie przetchlinek można było wywołać dopiero mieszaniną kinetyny w stężeniu 10^{-5} i kwasu β -indolooctowego w stężeniu 10^{-7} % po upływie 10—14 dni.

Zjawisko to wiąże się prawdopodobnie z towarzyszącym stanowi spoczynku większym stężeniem kwasu β -indolooctowego w kłąbach ziemniaka. Zastosowanie samego kwasu β -indolooctowego w okresie spoczynkowym pozostawało bez widocznego wpływu zarówno na kiełkowanie, jak i na reakcję przetchlinek ziemniaka.

Fakt, że u ziemniaków świeżo wykopanych rozcięcie przetchlinek następuje szybciej, wiąże się prawdopodobnie z tym, że u ziemniaków tych korek dopiero tworzy się, a fellogen z natury rzeczy znajduje się w stanie większej aktywności.

Jeśli chodzi o porównanie aktywności działania samej adeniny i jej pochodnej — kinetyny, to adenina była również czynnikiem pobudzającym kiełkowanie i rozcięcie przetchlinek ziemniaka, ale dopiero w stężeniach 10—20-krotnie wyższych niż kinetyna, a efekt jej działania nawet przy tych wyższych stężeniach był mniej wyraźny.

Podkreślić należy, że stymulujące działanie kinetyny na kiełkowanie ziemniaków nie jest specyficzne. Przeprowadzone porównawczo doświadczenia z zastosowaniem tiomocznika i chlorhydryny etylenu jako znanych od dawna substancji przerywających okres spoczynkowy ziemniaka wykazały, że pobudzenie kiełkowania kłąbów można osiągnąć równie szybko kinetyną, jak tiomocznikiem i chlorhydryną etylenu.

Reakcja jednak przetchlinek na działanie kinetyny jest dość specyficzna. Polega ona prawdopodobnie na pobudzeniu aktywności felloge-nu, które daje w efekcie przyrost komórek wypełniających, a w związku z tym rozdęcie przetchlinek.

Ryc. 3. a — Ziemniak kontrolny; b — ziemniak traktowany kinetyną, kiełki i rozdęte przetchlinki (stęż. 10^{-6});
a — The control potato; b — Enlarged sprout and lenticelles (conc. 10^{-6})

W doświadczeniach z ziemniakami, które uległy infekcji, zauważono, że kłęby zaatakowane drobnoustrojami również dość szybko zaczynają kiełkować, a przetchlinki zarysowują się bardzo silnie.

Obserwacja ta może mieć związek z najnowszym poglądem B r a u n a (1956), który tłumaczy nagły, wzmożony podział drobnoustrojów chorobotwórczych w organizmie tym, że w wyniku rozpadu martwych bakterii tworzy się kinetyna, która pobudza podział drobnoustrojów pozostałych jeszcze przy życiu.

Marchew

Korzenie marchwi krajano prostopadle do jej osi na odcinki o grubości około 5 mm. Odcinki płukano podobnie jak ziemniak przez kilka godzin bieżącą wodą, a następnie po przesuszeniu górne powierzchnie przekrojów zwilżano roztworami o stężeniach 10^{-5} — 10^{-9} : a) kinetyny b) kwasu β -indolooctowego, c) mieszaniną kinetyny i kwasu β -indolooctowego, d) adeniny. Odcinki kontrolne zwilżano wodą destylowaną. Po przeschnięciu wycinki marchwi umieszczano podobnie jak ziemniaki w warunkach sterylnych w wilgotnej atmosferze, w krystalizatorach zakrytych szklanymi płytkami. Po upływie 3—4 dni można było obserwo-

wać silny przyrost tkanek walca osiowego marchwi i jego uwypuklenie. Wypukłości takie powstawały niekiedy i na wycinkach marchwi kontrolnej, ale najsilniej rysowały się one na odcinkach potraktowanych kinetyną w stężeniach 10^{-5} — 10^{-8} . Reakcja na kinetynę widoczna była jeszcze przy stężeniu 10^{-13} . Najwyraźniej reagowały odcinki, na które działano mieszaniną kinetyny w stężeniu 10^{-6} i kwasu β -indolooctowego w stężeniu 10^{-11} .

Ryc. 4. Poprzeczny przekrój korzenia marchwi (kontrolny i traktowany kinetyną stęż. 10^{-7})

The carrot (cross section) control and treated with kinetin (conc. 10^{-7})

Jeśli chodzi o sam kwas β -indolooctowy, to na potraktowanych nim wycinkach można było obserwować głównie rozrost pierścienia cambium, przy czym stężenia symulujące ten rozrost wynosiły 10^{-9} — 10^{-13} . Stężenia 10^{-7} i 10^{-8} stymulowały powstawanie korzonków bocznych. Rozrost tkanek walca osiowego pod działaniem adeniny zachodził przy zastosowaniu jej w stężeniu 10^{-4} , przy czym reakcja była mniej wyraźna niż przy kinetynie.

Doświadczenia ze strąkami grochu, ziemniakiem i marchwią wykonywano tak na świetle, jak i w ciemności. Nie stwierdzono przy tym żadnych uchwytnych różnic w obu seriach doświadczeń z tym jednakże, że rozrośnięte walce osiowe wycinków marchwi, szczególnie potraktowanych kinetyną, ulegały na świetle zazielenieniu.

Riccia fluitans L.

Rośliną szczególnie wrażliwą na działanie kinetyny okazał się wątrobowiec hodowany pospolicie w akwariach — *Riccia fluitans* L. Roślina ta posiada charakterystyczne dichotomiczne rozgałęzienia, a pod wpływem kinetyny rozgałęzia się jeszcze silniej.

Do doświadczeń używano osobników możliwie podobnych pod względem wielkości, posiadających jednakową ilość rozgałęzień. Po 10 osobników wątrobowca umieszczano w wodzie destylowanej (kontrola) oraz w roztworach o stężeniach 10^{-6} — 10^{-9} : a. kinetyny, b. kwasu β -indolooctowego, c. mieszaniny kinetyny i kwasu β -indolooctowego, d. adeniny. Wszystkie próby umieszczano na świetle.

Już po 48 godzinach można było obserwować pod mikroskopem, że wątrobowce potraktowane kinetyną zaczynają rozgałęziać się bardzo silnie. Odgałęzienia boczne powstawały w wielu miejscach plechy. Po kil-

ku (5—8) dniach można było zauważyć ogromną różnicę w wyglądzie osobników kontrolnych i potraktowanych substancjami wzrostowymi. Rośliny potraktowane kinetyną oraz mieszaniną kinetyny i kwasu β -indolooctowego były bardzo silnie rozrośnięte i rozgałęzione. Reakcja zaznaczała się najwyraźniej przy koncentracji kinetyny 10^{-7} .

Ryc. 5. *Riccia fluitans*. a — kontrola; b — okaz traktowany kinetyną o stężeniu 10^{-7} ;
a — control; b — treated with kinetin
(conc. 10^{-7})

Dodatek do kinetyny kwasu β -indolooctowego nie wywierał na badane rośliny żadnego widocznego wpływu. Rośliny potraktowane samą adeniną wykazywały podobną reakcję, ale dopiero przy użyciu 20-krotnie większego stężenia adeniny. Sam kwas β -indolooctowy wywoływał u wątrobowców silne wydłużanie się plechy, ale stymulacji rozgałęziania się nie mogliśmy zauważyć.

Wszystkie opracowane przez nas testy roślinne oparte głównie na obserwacjach morfologicznych stanowić mogą jedynie punkt wyjścia dla badań nad mechanizmem działania kinetyny. Czy związek ten wpływa na rozrost tkanek poprzez stymulację cytokinezy, czy też jest aktywatorem różnicowania się tkanek, wyjaśnić może analiza cytologiczna, będąca przedmiotem naszej następnej pracy.

STRESZCZENIE

Praca niniejsza stanowi etap wstępny do dalszych badań nad kinetyną — 6-furfurylaminopuryną oraz jej fizjologicznym działaniem na rośliny.

Celem jej było przede wszystkim otrzymanie kinetyny z kwasu dezoxyrybonukleinowego grasicowego, a dalej wyszukanie odpowiednich roślin testowych, szczególnie wrażliwych na jej działanie.

Kinetynę otrzymano, opierając się częściowo na wskazówkach Millera i Skooga z autoklawowanego starego preparatu KDN grasicowego w toku częściowego jego rozkładu.

Jako roślin testowych użyto: niedojrzałych strąków grochu, kłębów ziemniaka, korzeni marchwi oraz wątrobowca *Riccia fluitans*. Reakcją wymienionych roślin na działanie kinetyny było: u grochu — powstawanie na wewnętrznej wyściółce niedojrzałych strąków wydłużonych, palczastych komórek, u ziemniaka przyspieszenie kiełkowania kłębów oraz charakterystyczne rozdymanie przetchlinek, u marchwi rozrost tkanek walca osiowego, u *Riccia* silne rozgałęzianie się i rozrost plechy.

Fotografie do pracy wykonał Roman Antoszewski, za co składamy mu serdeczne podziękowanie.

Zakład Biochemii
Uniwersytetu Łódzkiego

(Wpłynęło dn. 22.XII.1956 r.)

SUMMARY

The paper is an introduction to further studies on kinetin — 6-furfurylaminopurine and its physiological action on plant tissues.

The object was to isolate kinetin from thymus desoxyribonucleic acid and to find test plants, especially sensitive to its action.

Kinetin has been isolated according to the modified method of Miller and Skoog from an old thymus DNA preparate subjected to hydrolyse in an autoclave.

Pea siliquas, potato tubers, carrot roots and *Riccia fluitans* (*Hepaticae*) were used as test plants.

The effects of kinetin were as follows:

1. Pea — elongated, digitated cells growing in the internal part of the immature siliqua.
2. Potato — acceleration of sprouting of the tubers and enlargement of the lenticelles.
3. Carrot — enlargement of the tissues of the central cylinder.
4. *Riccia* — the growth and enlargement of the thallus.

LITERATURA

- Ber A., 1950, Hormony wzrostu roślin zielonych, grzybów i bakterii (Hormony przyranne: 155—156), Warszawa.
- Braun W., 1956, *Angewandte Chemie* 19: 627.
- Bullock M. W., Hand J. J., Stokstad L. R., 1956, *J. Amer. Chem. Soc.* 78: 3693.
- Hall R. S., Roeppe R. S., 1955, *J. Amer. Chem. Soc.* 77: 6400.
- Ham R., Eakin R., Skinner Ch., 1956, *J. Amer. Chem. Soc.* 78: 2648.
- Lettré H., Endo H., 1956, *Die Naturwissenschaften* (4): 84.
- Miller O., Skoog F., Saltza M., Strong T., 1955a, *J. Amer. Chem. Soc.* 77: 1392.
- Miller O., Skoog F., Okumara F., Saltza M., Strong T., 1955b, *J. Amer. Chem. Soc.* 77: 2662.
- Miller O., Skoog F., Okumura F., Saltza M., Strong T., 1956, *J. Amer. Chem. Soc.* 78: 1375.
- Schanz E., Steward T., 1955, *Annales of Botany* 19 (73): 49—58.
- Skoog F., 1955, *L'année biologique*, 1, 2, 3, 4.
- Wiggans S., 1954, *American Journal of Botany* 41 (4).
- Vischer E., Chargaff E., 1948, *J. Biol. Chem.* 176, 703.
- Wyatt G., 1951, *Biochem. J.* 48: 584.