Próba chromatograficznej i biologicznej analizy regulatorów wzrostu w ekstraktach z pyłku leszczyny (*Corylus avellana* L.)

*Versuch einer chromatographischen und biologischen Analyse
von Wuchsstoffen in Extrakten aus Haselstrauch Pollen
(Corylus avellana L.)*

L. MICHALSKI

WSTĘP

Badacz belgijski Massart już w roku 1902 zwrócił uwagę na stymulację wzrostu załazni przez martwy pyłek, dopatrując się w tym fakcie czysto chemicznej natury.

Badania nad charakterem aktywnych substancji zawartych w pyłku roślin zapoczątkowane pracą Fittinga (1910), a rozwinięte następnie przez Laibacha (1932), Thimanna (1934), Yasudę (1934), Gustafsona (1937) i innych, potwierdziły właściwości tych substancji polegające na pobudzaniu komórek do podziału.

Laibach (1932) zaliczył je nawet do hormonów wzrostowych, nazywając „hormonami pyłkowymi”, bowiem przy stosowaniu na testy owsiane wykazują one analogiczne działanie z syntetycznymi substancjami wzrostowymi. Obserwacje te potwierdził Thimann (1934). Doświadczenia ze stosowaniem ekstraktów z pyłku na zawiązki różnych roślin, przeprowadzone przez Yasudę (1934) i Gustafsona (1937), doprowadziły do otrzymania tą drogą owoców partenokarpicznych. Podobne efekty zaobserwowano także przy zadziałaniu na zawiązki roślinne syntetycznymi substancjami stymulującymi wzrost, np. kwasem β -indolooctowym, co nasunęło wielu badaczom przypuszczenia, że hormon pyłkowy jest identyczny z hormonem wzrostu. Nie może być to przyjęte jako pewnik, ponieważ Mitchell i Whitehead (1941) spowodowali na testach intensywniejszy wzrost międzywęźli siewek fasoli pod wpływem zadziałania ekstraktami z pyłku kukurydzy, podczas gdy równolegle sto-

sowane typowe substancje wzrostowe takie jak: kwas β -indoloctowy, kwas fenyloctowy, kwas α -naftalenoctowy, amid kwasu α -naftalenoctowego, wykazały słabsze działanie stymulujące. Jakuszkina (1947) nawiązując do pracy Mitchella i Whiteheada i eksperymentując ekstraktami z pyłku leszczyny i sosny, przyjmuje prawdopodobieństwo istnienia w pyłku obok substancji wzrostowej typu auksyny, jeszcze innej aktywnej substancji, przyspieszającej wzrost.

Stosowana ówczesznie metodyka badań stymulatorów wzrostu z materiału roślinnego nie pozwalała na dokładne rozdzielanie tych substancji. Dopiero wprowadzenie do badań metod chromatografii rozdzielczej przez Linsera (1951), Luckwilla (1952), Bennet-Clarka, Tambiaha i Kefforda (1952), Kefforda (1955) i innych rozszerzyło perspektywy badań nad substancjami wzrostowymi. Sen i Leopold (1954) podają zestawienie wartości R_f i warunki rozdziału na bibule chromatograficznej znacznej liczby związków indolo-, naftaleno-, i benzoeso- pochodnych, o charakterze substancji wzrostowych.

Celem mojej pracy jest, w oparciu o obserwacje Jakuszki (1947), rozdzielenie substancji wzrostowych zawartych w ekstraktach z pyłku leszczyny, przy zastosowaniu metod chromatografii bibułowej.

METODYKA

Ekstrakcję substancji wzrostowych z pyłku leszczyny (*Corylus avellana* L.) przeprowadzono dwoma metodami:

W pierwszym przypadku zastosowano metodę Thimanna (1934) z modyfikacjami podanymi przez Jakuszkę (1947). Metoda ta przedstawia się następująco: Powietrznie suchy pyłek w ilości 1 g starannie rozcierano w moździerzku z 10 ml świeżo oddestylowanego chloroformu z dodatkiem 1 ml 1 n. HCl. Ekstrakt chloroformowy po oddzieleniu w lejku rozdzielczym od frakcji wodnej, przesączono przez sączek piankowy 11 G 3 i zagęszczono pod zmniejszonym ciśnieniem do objętości 1 ml, z czego 0,1 ml naniesiono na bibułę chromatograficzną.

W drugim przypadku, w celu przebadania kwaśnych i obojętnych substancji wzrostowych, użyto metody Laršana (1939—40). Jeden gram pyłku wytrząsano przez 24 godz. w temperaturze około -4°C z 10 ml eteru etylowego pozbawionego nadtlenków i przedestylowanego. Surowy ekstrakt eterowy zagęszczono pod zmniejszonym ciśnieniem do objętości 1 ml. Zagęszczony ekstrakt ponownie wytrząsano przez 30 min. z 10 ml nasyconego wodnego roztworu cukru gromowego. Po rozdzieleniu frakcji na lejku rozdzielczym, frakcję eterową odrzucono, frakcję zaś wodną przesączono przez sączek piankowy, a następnie po dodaniu 1 ml nasyconego wodnego roztworu NaHCO_3 wytrząsano 3-krotnie po 5 min., każdo-

razowo z 10 ml eteru. W ten sposób otrzymaną neutralną frakcję eterową zagęszczono do objętości 1 ml, z czego 0,1 ml użyto do chromatografii. Pozostałą frakcję wodną zakwaszono 1 ml 15% wodnego roztworu kwasu winowego, a następnie wytrząsano 3-krotnie po 5 min., każdorazowo z 10 ml eteru, w celu otrzymania we frakcji eterowej kwaśnych substancji wzrostowych. Po rozdzieleniu frakcji, eterową zagęszczono i użyto do chromatografii.

Rozdział ekstraktu przedstawia poniższy schemat:

Chromatograficznego rozdziłu ekstraktów dokonano metodą zastosowaną przez Bennet-Clarka, Tambiaha i Kefforda (1952). Na chromatogram zstępujący użyto bibuły Whatmann nr 1, a jako rozpuszczalnika mieszaniny alkoholu izo-propylowego: amoniaku ($d = 0,88$); wody w stosunku 10 : 1 : 1. Chromatogramy rozwijano w komorze zaciemnionej w temperaturze $+23^{\circ}\text{C}$. Po wysuszeniu w temp. pokojowej, paski bibuły podzielono poprzecznie na odcinki w liczbie 15 o powierzchni ca 4 cm^2 i eluowano każdy z nich w 1 ml 1% wodnego roztworu glikozy przez 24 godz. w temp. 23°C .

Aktywność eluatów z poszczególnych odcinków chromatogramu badano za pomocą owsianego testu cylindrycznego. Za materiał testowy posłużyły podwierzchołkowe odcinki koleoptile owsa (Siegeshafer — Svalöf) hodowanego wg metody Södinga (1952), cięte na przyrządzie, o długości początkowej 3,168 mm ze średnią generalną zawartą, z prawdopodobieństwem 0,99 — w granicach $3,168 \pm 0,005$. Cylindry te umieszczono każdorazowo po 10 szt. w eluatach odcinków chromatogramu w temp. 23°C . Po upływie 20 godz. mierzono przyrost długości odcinków koleoptile pod lupą okularową mikrometrycznym.

Wszystkie czynności poczynawszy od ekstrakcji do testowania wykonywano w świetle ciemnoczerwonym.

Dla wyznaczenia wartości R_f dla heteroaksyny, użyto w chromatogramie kontrolnym roztworu alkoholowego kwasu β -indolooctowego. Wybarwienie chromatogramu kontrolnego odczynnikami złożonym z $\text{HClO}_4 + \text{FeCl}_3$ dało plamę różową, odpowiadającą położeniu kwasu β -indolooctowego.

Opracowane wyniki pomiarów posłużyły do wykreślenia histogramów.

WYNIKI I DYSKUSJA

Wyniki pomiarów przyrostu odcinków koleoptile dla każdego odcinka chromatogramu przeliczono na procenty. Średnie błędy średnich przyrostu dla wszystkich doświadczeń zawarte są, z prawdopodobieństwem 0,95, w granicach $\pm 5,7$ i $\pm 1,7\%$. Histogramy wykreślono wykazując za-

Wykres: Przyrost cylindrów koleoptile w zależności od położenia poszczególnych odcinków chromatogramu od linii startowej. Linia przerywana przedstawia przyrost kontrolnych. KIO oznacza położenie plamy kontrolnej kwasu β -indolooctowego.

Histogram 1. Chromatogram z ekstraktu chloroformowego.

Histogram 2a. Chromatogram z frakcji kwaśnej ekstraktu eterowego.

Histogram 2b. Chromatogram z frakcji neutralnej ekstraktu eterowego.

Der von der Lage der einzelnen Chromatogrammabschnitte im Verhältnis zur Startlinie abhängige Längenzuwachs der Koleoptilzylinder. Die unterbrochene Linie gibt den Zuwachs von Kontrollwerten an. KIO bezeichnet die Lage des Kontrollflecks der β -Indolylessigsäure.

Histogramm 1. Das Chloroformextraktchromatogramm.

Histogramm 2a. Das aus der sauren Ätherextraktfraktion hergestellte Chromatogramm.

Histogramm 2b. Das aus der neutralen Ätherextraktfraktion hergestellte Chromatogramm.

ależność przyrostu cylindrów koleoptile od odległości położenia poszczególnych odcinków chromatogramu od linii startowej. Przyrost cylindrów kontrolnych przyjęty jako 0% wykreślono linią przerywaną. Wszystkie więc

wyniki leżące powyżej tej linii wskazują na stymulację wzrostu, a leżące poniżej na hamowanie wzrostu. Położenie kwasu β -indolooctowego, otrzymane z chromatogramu kontrolnego, oznaczono symbolem KIO.

Wydaje się, na podstawie otrzymanych wyników, że poszczególnych odcinków chromatogramu nie można interpretować indywidualnie, lecz w zespołach. Te zespoły wyraźnie różnicują układy stymulatorów i inhibitorów na strefy, eliminując dodatkowo ewentualnie usterki w rozdziale chromatograficznym ekstraktów.

Histogram 1 przedstawia układ stymulatorów i inhibitorów wzrostu rozdzielonych z ekstraktu chloroformowego. Układ ten charakteryzuje się dużym zróżnicowaniem aktywności wzrostowej. Szczególną uwagę zwraca tu położenie stymulatorów i inhibitorów względem położenia kwasu β -indolooctowego, którego wartość R_f , jak wynika z barwnej plamy na chromatogramie kontrolnym, wynosi aktualnie 0,43. Strefa o wartości R_f niższej od KIO odpowiada inhibitorom wzrostu (0,03—0,16). Położenie natomiast bardzo aktywnego stymulatora powyżej KIO (R_f 0,63) a przede wszystkim jego obecność zdaje się potwierdzać obserwacje Jakuszkiny (1947) co do występowania w ekstrakcie chloroformowym z pyłku leszczyny, obok kwasu β -indolooctowego, drugiej aktywnej substancji wzrostowej.

Histogramy 2a i 2b wykreślają aktywność biologiczną stymulatorów i inhibitorów z frakcji kwaśnej i neutralnej ekstraktu eterowego. Na chromatogramie z frakcji kwaśnej (2a) zaznacza się wyraźny podział na strefy o znacznie zróżnicowanej aktywności w układzie typowym dla aktywatora α , kwasu β -indolooctowego i inhibitora β (Kefford (1955). Luckwill (1952), Alexander (1953) i in. stwierdzają w różnorodnym materiale roślinnym występowanie aktywatorów o wartości R_f niższej od kwasu β -indolooctowego i inhibitorów o wartości R_f wyższej od KIO. Bennet-Clark i Kefford (1953) badając frakcje kwaśne ekstraktów eterowych podają, że pobudzanie wzrostu odpowiadające aktywatorowi α przypada na strefę R_f 0,0—0,2, a hamowanie wzrostu charakterystyczne dla inhibitora β na R_f 0,57, przy utrzymaniu warunków rozwijania chromatogramu w mieszaninie alkoholu izo-propylowego — amoniaku (10 : 1). Pewne różnice w otrzymanych wynikach, R_f 0,23—0,36 dla aktywatora α i R_f 0,83 dla inhibitora β , w porównaniu z obserwacjami Bennet-Clarka i Kefforda przypisać można niepowtarzalności wszystkich warunków rozdziału chromatograficznego. Umiejscowiony na czole chromatogramu jeszcze jeden stymulator wzrostu, wykazujący aktywność auksyny (R_f 0,9—1,0), mógłby być identyfikowany wg Kefforda (1955) jako nitryl kwasu β -indolooctowego, przechodzący wg Thimanna (1953) przy sprzyjających warunkach w kwas β -indolooctowy. Nitryl kwasu β -indolooctowego wg Sena i Leopolda (1954)

w warunkach naszego rozdziału powinien posiadać wartość R_f 0,99, a po opryskaniu odczynnikiem $\text{HClO}_4\text{—FeCl}_3$ dać charakterystyczną dla tego związku plamę zieloną. Nieuzyskanie tego efektu, jak należy przypuszczać, jest następstwem zbyt niskiej koncentracji substancji wzrostowych w badanych ekstraktach, leżącej poniżej stężenia warunkującego otrzymanie barwnej reakcji (10^{-6}), podczas gdy aktywność biologiczna związków indolowych sięga rzędu 10^{-8} .

Na chromatogramie z frakcji neutralnej ekstraktu eterowego (2b) maksimum wzrostu leży (R_f 0,7) poza położeniem KIO (R_f 0,5), minimum natomiast, które odpowiada położeniu inhibitorów, posiada wartości R_f 0,03 i 0,16. Porównując omówione histogramy, zauważyć można pewne podobieństwo w układzie stymulatorów i inhibitorów wzrostu na chromatogramach z ekstraktu chloroformowego i z frakcji neutralnej ekstraktu eterowego. Ułożenie się w czołe chromatogramu z frakcji neutralnej, podobnie jak i z frakcji kwaśnej ekstraktu eterowego, stymulatora wzrostu (R_f 0,9—1,0) o identycznych wartościach R_f i aktywności wzrostowej zdaje się wskazywać na analogiczność tych substancji wzrostowych.

STRESZCZENIE WYNIKÓW

1. Maksimum aktywności wzrostowej (R_f 0,63) dla chromatogramu z ekstraktu chloroformowego z pyłku leszczyny leży poza położeniem kwasu β -indolooctowego (R_f 0,43), wskazując na występowanie drugiej aktywnej substancji wzrostowej.

2. Maksimum wzrostu odcinków koleoptile dla chromatogramu z frakcji kwaśnej ekstraktu eterowego, leżące (R_f 0,36) poniżej położenie kwasu β -indolooctowego (R_f 0,50), oraz minimum wzrostu odpowiadające inhibitorowi wzrostu (R_f 0,83), leżące poniżej KIO, zdają się odpowiadać typowemu układowi: aktywator α , kwas β -indolooctowy, inhibitor β .

3. Przypuszcza się, że stymulatorem wzrostu ułożonym na czołe chromatogramów (R_f 0,9—1,0) z frakcji kwaśnej i neutralnej ekstraktów eterowych jest nitryl kwasu β -indolooctowego.

Zakład Fizjologii Roślin UMK
w Toruniu

(Wpłynęło dn. 14.6.1957)

ZUSAMMENFASSUNG

Zur Verteilung der Wachstumsregulatoren aus Haselstrauch-Pollenextrakten wurde die Papierchromatographiemethode angewandt. Neben der nach der Thimannmethode (1934) mit Hilfe von Chloroform durchgeführten Extraktion des Pollenmaterials wurde zwecks Untersuchung

der sauren und neutralen Wuchsstoffe ebenfalls die Ätherextraktion (Larsen 1939—40) angewandt. Zum Absteigchromatogramm benutzte man Whatmannpapier no. 1 und als Lösungsmittel nahm man das Gemisch von Isopropanol-Wasser-Ammoniak (10:1:1). Das im verdunkelten Behälter entwickelte Chromatogramm teilte man in 15 Abschnitte, von denen jeder 24 stundenlang in Glucoselösung eluiert wurde.

Die Aktivität der Eluate der einzelnen Chromatogrammschnitte wurde mit Hilfe des Avenazylindertest untersucht. Als Testmaterial dienten die jedesmal zu 10 Stück in den Eluaten eingetauchten Koleoptilzylinder des nach der Methode von Söding (1952) gezüchteten Hafers (Siegeshafer — Svalöf). Nach Verlauf von 20 Stunden wurde der Längenzuwachs der Koleoptilzylinder gemessen. Der R_f — Wert für Heteroauxin wurde auf Grund des mit HClO_4 — FeCl_3 Reagens gefärbten Kontrollchromatogramm festgesetzt. Die bearbeiteten Ergebnisse der Messungen dienten zur Ausfertigung von Histogrammen.

Indem man die Ergebnisse interpretiert, darf man annehmen, dass das Maximum der Wachstumsaktivität (R_f 0,63) für das aus dem Chloroformextrakt des Haselstrauchpollens angefertigte Chromatogramm ausserhalb der Lage der β -Indolylessigsäure liegt (R_f 0,43). Diese Tatsache zeigt das Vorkommen eines zweiten sehr aktiven Wuchsstoffes an, welches die Beobachtungen von Jakuszkin a (1947), gleichsam bestätigt. Die einen niedrigeren R_f — Wert, als die β -Indolylessigsäure aufweisende Zone entspricht der Lage der Inhibitoren (0,03—0,16).

Das unterhalb der Lage der β -Indolylessigsäure (R_f 0,50) sich befindende (R_f 0,36) Wachstumsmaximum der Koleoptilzylinder für das aus der sauren Fraktion des Ätherextrakts hergestellte Chromatogramm gleichwie das oberhalb der Zone der β -Indolylessigsäure liegende, dem Wachstumsinhibitor (R_f 0,63 und 0,83) entsprechende Minimum scheinen auf das typische System: Accelerator α , β -Indolylessigsäure, Inhibitor β [Bennet-Clark, Kefford (1953), Kefford (1955)] hinzuweisen.

Auf dem aus der neutralen Fraktion des Ätherextrakts hergestellten Chromatogramm befindet sich das Wachstumsmaximum (R_f 0,70) oberhalb, das Minimum dagegen (R_f 0,03 und 0,16) unterhalb der Lage der β -Indolylessigsäure (R_f 0,50).

An der Front der aus der sauren und neutralen Fraktion der Ätherextrakte angefertigten Chromatogramme (R_f 0,9—1,0) liegt noch ein Wachstumsstimulator der sich als β -Indolyl-Acetonitril (Kefford 1955) identifizieren liesse.

LITERATURA

- Bennet-Clark T. A., Tambiah M. S. a. Kefford N. P., 1952, Estimation of Plant Growth Substances by Partition Chromatography, *Nature* 169: 452—453.
Bennet-Clark T. A. a. Kefford N. P., 1953, Chromatography of Growth Substances in Plant Extracts, *Nature* 171: 645—647.
Fitting H., 1910, Weitere Entwicklungsphysiologische Untersuchungen an Orchideenblüten, *Zeitschr. f. Bot.* 2: 225—267.
Gustafson F. G., 1937, Parthenocarp induced by Pollen Extracts, *Amer. Jour. Bot.* 24: 102—107.

- Jakuszkina N. N., 1947, O rostowych wieszczestwach pylcy rastienji, Dokl. Akad. Nauk SSSR. 56: 549—552.
- Kefford N. P., 1955, The Growth Substances separated from Plant Extracts by Chromatography I, Jour. Exper. Bot. 6: 129—151.
- Laibach F., 1932, Pollenhormon und Wuchsstoff, Ber. Deutsch. Bot. Gesell. 50: 383—390.
- Larsen P., 1939/40, Über Hemmung des Streckungswachstums durch natürlich vorkommende ätherlösliche Stoffe, Planta 30: 160—167.
- Lexander K., 1953, Growth-Regulating Substances in Roots of Wheat, Physiol. Plant 6: 406—411.
- Linser H., 1951, Versuche zur chromatographischen Trennung pflanzlicher Wuchsstoffe, Planta 39: 377—401.
- Luckwill L. C., 1952, Application of Paper Chromatography to the Separation and Identification of Auxins and Growth-Inhibitors, Nature 169: 375.
- Mitchell J. a. Whitehead M., 1941, Responses of Vegetative parts of Plants following Application of Extract of Pollen from *Zea Mays*, Bot. Gaz. 102: 770—791.
- Sen S. P. a. Leopold A. C., 1954, Paper Chromatography of Plant Growth Regulators and Allied Compounds, Physiol. Plant. 7: 98—108.
- Söding H., 1952, Die Wuchsstofflehre, Stuttgart G. T. H. Verl.
- Thimann K. V., 1934, Studies on the Growth Hormone of Plants. VI. The Distribution of the Growth Substance in Plant Tissues, Jour. Gen. Physiol. 18: 23—24.
- Thimann K. V., 1953, Hydrolysis of Indoleacetonitrile in Plants, Arch. Biochem. 44: 242.
- Yasuda S., 1934, The Second Report on the behaviour of the Pollen Tubes in the Production of seedless Fruits caused by interspecific Pollination, Japan. Jour. Genet. 9: 118—124.