ACTA SOCIETATIS
BOTANICORUM POLONIAE
Vol. XXVIII — Nr 1
1959

Nowa uproszczona metoda biotestu wygięciowego „Avena Curvature Test" F. W. Wenta: „Coleoptile-Hypocotile Test"

The new easy method F. W. Went's "Avena Curvature Test": "Coleoptile-Hypocotile Test"

K. WILCZYŃSKA

WSTĘP

Ogłoszony przez F. W. Wenta przed 30 laty (Went, 1926, 1927, 1928 i uzupełniony 1935 r.) „Avena test" — biotest wygięciowy na substancje wzrostowe, nazwane później (w 1931 roku) przez Kögla i Haagen Smita auksynami (Went, 1951, str. 72), udowodnił hormonalne podłoże procesów wzrostowych, sugerowane już przez Juliusza Sachsa w 1865 r. Test ten zapoczątkował szeroką skalę badań nad substancjami wzrostowymi, sam zaś przeszedł zaledwie kilka modyfikacji i pozostał testem wyjściowym jako „Standard Avena test" (Linser & Kiermayer, 1957, str. 50). Metoda użyta przez Wenta daje wyniki tym bardziej przekonywające, że łatwo dostrzegalne (ryc. 1, I). Kostka agarowa nasiąknięta dyfuzatem z wierzchołków coleoptile (pochewka liścieniowa) owsa, umieszczona jednostronnie na dekapitowanym prostym coleoptile i oparta o liścień (I liść) wysunięty z pochewki, po upływie około dwóch godzin powoduje wygięcia na stronę „pustą", spowodowane intensywniejszym wzrostem na długość strony zadziałanej dyfuzatem z kostki.

Największą trudność testu stanowi bardzo ograniczony czas na wykonanie tego precyzyjnego doświadczenia, ponieważ, jak stwierdził w 1926 roku Dolk (Skoog, 1937, str. 313), coleoptile pozbawione wierzchołków wytwarza w ciągu 2 godzin w swych górnych częściach nowe auksyny w takiej ilości, że powstaje tu „wierzchołek fizjologiczny". Trudność ta została częściowo usunięta, gdy van der Weij w 1931 roku wprowadził powtórną dekapitację coleoptile, po upływie dwóch godzin od pierwszej (Skoog, 1937, str. 312). Zabieg ten dawał więcej czasu na czynności

przygotowawcze i przez to umożliwiał użycie do doświadczenia większej ilości roślin testowych, lecz nie przedłużał czasu zadziałania substancjami wzrostowymi zawartymi w agarze ponad 2 godziny (do czasu powstania nowego wierzchołka fizjologicznego).

Dopiero modyfikacja F. Skooga (1937) „Deseeded Avena test method" (ryc. 1, II), polegająca na usunięciu całego endospermu z pozostawieniem tylko dolnej części tarczki *(scutellum)*, ograniczająca w znacznym stopniu dopływ z nasienia prekursorów auksyn, umożliwiła przedłużenie czasu zadziałania substancjami wzrostowymi do 5—7 godzin. Przedłużenie zadziałania wzmocniło wyniki testu i tym samym uczuliło go i pozwoliło na wykrywanie auksyn w stężeniach dziesięciokrotnie słabszych niż przy zastosowaniu metody standardowej.

W 2 lata później H. Funke wprowadził nową modyfikację testu standardowego (ryc. 1, III) „Koleoptilen Test" (Söding, 1952). Z kiełka owsianego pozostawiono zaledwie odcinek coleoptile 1,2 cm długości, który całkiem izolowano, przyklejając go żelatyną do szkiełka podstawowego, wysłanego wilgotną bibułą. Przerywano w ten sposób dopływ wstępujący wszelkich substancji w ciągu 24 godzin przed doświadczeniem i przez 18 do 20 godzin zadziałania substancjami wzrostowymi, zawartymi w kostce agarowej (przyklejonej żelatyną jednostronnie do dekapitowanego coleoptile).

Test ten zasadniczo nie różni się od znacznie prostszych testów „odcinkowych" lub „cylindrycznych" coleoptile owsa na wzrost prostoliniowy (Söding, 1952; Thimann, 1952; Linser & Kiermayer, 1957), stawia nawet sam biotest w gorszych warunkach, bo pozbawia go wszechstronnego stykania się z roztworem substancji wzrostowych, zasilonym w dodatku materiałem energetycznym, jak sacharoza lub glukoza. W ten sposób czułość jego nie może być wyższa od biotestów na wzrost prostoliniowy, które z kolei są mniej wrażliwe niż test wygięciowy "Deseeded Avena test" (Nitsch I. P. & Nitsch C., 1956, str. 95, tabl. 1). W tym ostatnim coleoptile zachowuje łodyżkę podliścieniową *(hypocotile)* oraz część tarczki *(scutellum)* i korzeni dostarczających szeregu czynników fizjologicznych, składających się na wzrost.

Z tablicy porównawczej wrażliwości różnych biotestów wygięciowych na auksyny w pracy współczesnej Nitschów (1956) wynika, że "Deseeded Avena test" jest nadal najczulszym testem na substancje wzrostowe, jeżeli jednocześnie weźmie się pod uwagę jasność wyników. Technika przygotowawcza do tej metody wymaga jednak tylu precyzyjnych i czasochłonnych zabiegów, że zmusza do ograniczenia liczby powtórzeń lub zmniejszenia ilości roślin testowych. Nawet praca zbiorowa w tym przypadku nie daje odpowiedniego rozwiązania, bo rozdzielając pracę między kilku pracowników stwarza się większe wahania wartości wyni-

ków, zależnie od indywidualnej zręczności przy preparowaniu roślin testowych.

Opracowana nowa metoda, nazwana "Coleoptile-hypocotile test" (ryc. 1, IV), której opis zostanie podany w tym artykule, w znacznym stopniu zmniejsza trudności techniczne, zachowując wrażliwość na poziomie „Deseeded Avena test". Ponadto podnosi ona stopień wygięć dzięki przedłużeniu czasu zadziałania substancjami wzrostowymi do 24 godzin oraz ujednostajnia wyniki przez objęcie całego dobowego cyklu wzrostu i dopełnienie doświadczeń porównawczymi seriami na wygięcia geotropiczne, wskazujące poziom endogennych auksyn w roślinach testowych. Zastosowany zaś sposób wprowadzania substancji wzrostowych do agaru przez dyfuzję ze zwilżonej nimi bibuły pozwala stosować bezpośrednio chromatogramy do nasiąkania agaru.

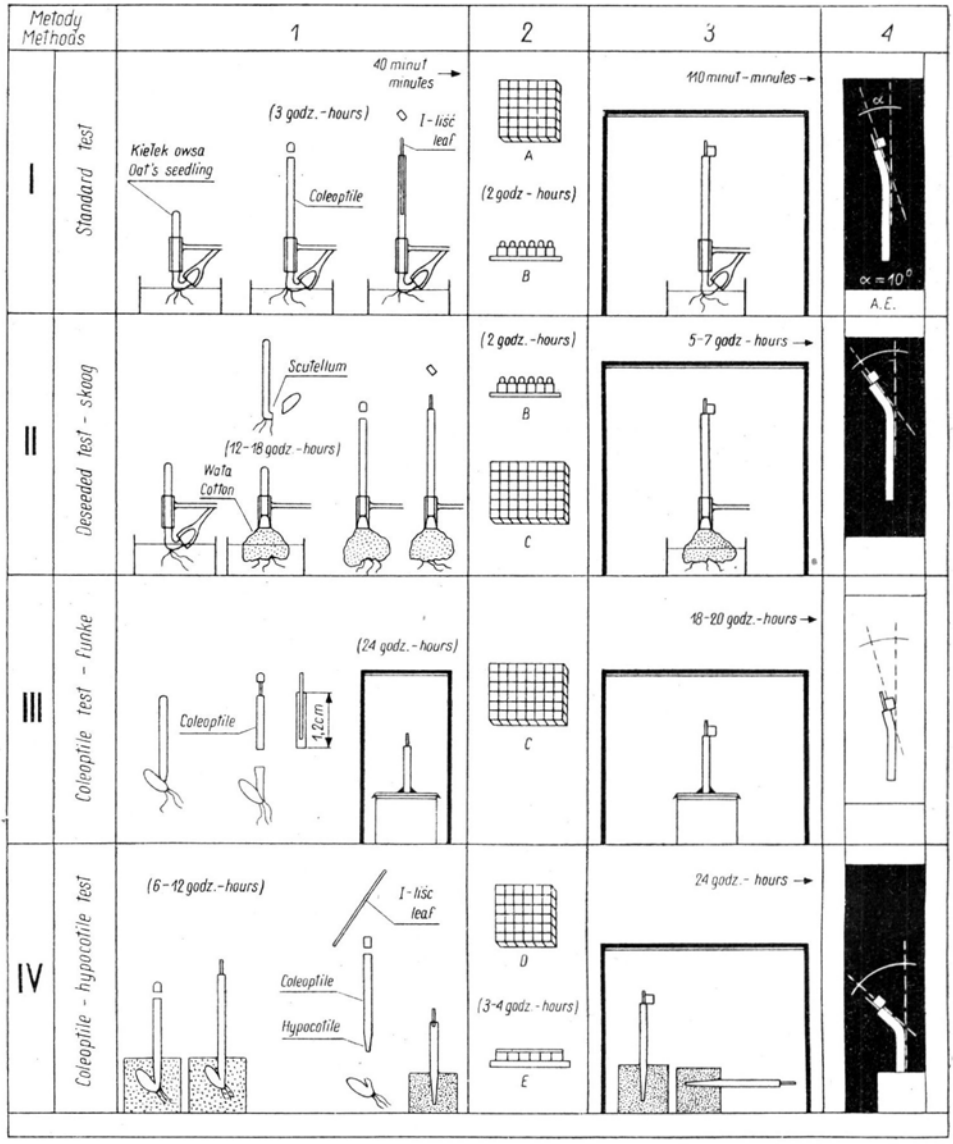
Ograniczyłam się do podania tablicy porównawczej poprzednio wzmiankowanych metod (ryc. 1), ponieważ szczegółowe opisy tych metod, poza autorskimi opisami, znajdują się we wszystkich podręcznikach metodycznych dotyczących substancji wzrostowych, a fotografie i schematy niektórych czynności przygotowawczych tego biotestu podaje L. J. Audus (1953, Fig. 3—9).

W czterech rzędach poziomych tablicy przedstawiono schematycznie poszczególne metody (ryc. 1, I—IV), a w czterech rzędach pionowych podano kolejne stadia przygotowawcze testu (ryc. 1, 1—4).

Nowa metoda: „Coleoptile — hypocotile test" (ryc. 1, IV).

Materiał. Do doświadczeń użyto nasiona owsa tej samej odmiany szwedzkiej Seigeshafer, co w metodzie standardowej (ze Sveriges Utsädesförening, Svalöf, Sweden). Nie łuszczone nasiona moczono przez 3—4 godziny, przy świetle dziennym lub przy świetle elektrycznym białym. Nabrzękłe nasiona układano gęsto na wilgotnych trocinach (z drzew liściastych) w płaskich naczyniach z masy plastycznej (wanienki fotograficzne) i przykrywano warstwą tychże trocin grubości około 1 cm. Naczynia ustawiano w ciemni, w termostacie w temp. 24—25°C, w atmosferze nasyconej parą wodną. Wszystkie dalsze czynności w ciągu doświadczenia wykonywano przy świetle czerwonym lub pomarańczowym. Po trzech dobach, gdy coleoptile miały około 1,5 cm wysokości, obcinano im wierzchołki dł. około 5 mm ostrymi nożycami i wstawiano z powrotem do termostatu na 8—12 godz. (zanim liścień nie wyrośnie na kilka mm nad coleoptile) (ryc. 2a i b).

Roztwory substancji wzrostowych. Do wypróbowania testu używano wodnych roztworów syntetycznego kwasu indolooctowego o różnym stężeniu, otrzymanych przez rozcieńczenie (przeważnie 4, 40 i 400-krotne) zasadniczego roztworu: 10 mg krystalicznego kwasu (3-indolyl-acetic acid, $C_6H_7NH.CH{:}C \cdot CH_2 \cdot COOH = 175.18$, Horticultural quality,

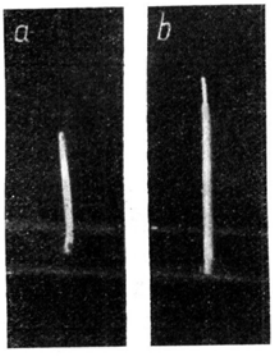


Ryc. 1. Schematyczne przedstawienie kilku metod testu wygięciowego na auksyny „Avena curvature test" F. W. Wenta (rzędy poziome: I—IV)

Diagramatic representation of some methods of F. W. Went's "Avena curvature test" on auxin (horizontal rows: I—IV)

W każdej metodzie (z lewa na prawo) kolejne stadia testu: rzędy pionowe (1—4): 1 — preparowanie roślinki testowej; 2 — przygotowanie kostek agarowych: A — płytka z 1,5% agaru podzielona na kostki (około 10 mm³), B — dyfuzja auksyn z wierzchołków coleoptile do kostek agarowych na szkiełku podstawowym (widziane z boku), C — kostki agarowe z 3% agaru stopionego z równą ilością roztworu auksyn, D — płytka 2% agaru podzielona na kostki (około 11 mm³) i E —

B. D. H., England) w 100 ml gorącej przegotowanej wody o pH około 6 (z wodą destylowaną lub świeżo redestylowaną wyniki były znacznie słabsze). W większości doświadczeń do zasadniczego roztworu kwasu indolo-



Ryc. 2. Kiełki owsa wyhodowane w trocinach w ciemności: a — kiełek ok. 1,5 cm wysokości przed dekapitacją, b — kiełek w osiem godzin po dekapitacji z liścieniem wyrośniętym na kilka milimetrów ponad coleoptile
Oats seedlings cultivated in sawdust in darkness: a — coleoptile of the seedling about 1,5 cm high ready to be decapitated; b — the same 8 hours after decapitation with cotyledon grown some millimetres over coleoptile

octowego (10 mg/100 ml wody) dodawano 2 g glukozy, a rozcieńczano ten roztwór wodnym roztworem 2% glukozy (1)*.

Naturalne substancje wzrostowe otrzymywano ze świeżego materiału roślinnego, enzymatycznie inaktywowanego wysoką temperaturą (przy 100°C w sterylizatorze parowym przez 10 minut (2) przez wytłaczanie z niego soku. Roztworami kwasu indolooctowego lub naturalnymi sokami w określonej ilości zwilżano odcinki bibuły, którymi przykrywano odpowiedniej wielkości płytki agarowe pocięte na kostki. Posługiwano się również chromatogramami bibułowymi kwasu indolooctowego (otrzymanymi z roztworów tego kwasu lub z soku naturalnego roślinnego) zwilżonymi 2% glukozą lub wodą. Nasiąkanie płytek agarowych trwało 3—4 godz. w ciemni, w atmosferze wilgotnej, przy temp. 18—20°C. [Bezpośrednie zastosowanie chromatogramów bibułowych z substancji wzrostowych do nasiąkania kostek agarowych ma być tematem następnego doniesienia].

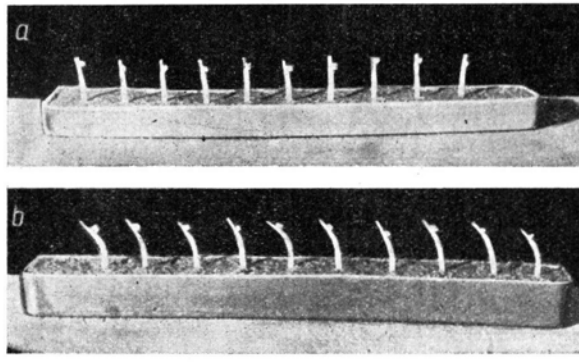
* Kolejne liczby w nawiasach oznaczają innowacje wprowadzone do doświadczenia, które będą uzasadnione w następnym rozdziale.

dyfuzja uksyn z bibuły nasiąkniętej ich roztworem do kostek agarowych na szkiełku podstawowym (widziane z boku); 3 — ustawianie doświadczenia i 4 — utrwalanie wyników wygięć coleoptile

In each method: diagrams of successive stages of the test (from left to right): Columns 1 — preparation of test plant; 2 — preparation of agar blocks: A — 1,5% agar cut up into blocks of about 10 mm³, B — diffusion of auxin from coleoptile tips to agar blocks on glass slide (seen from side), C — agar blocks made from 3% agar melted with the equal volume of auxin solution, D — 2% agar cut up into blocks about 11 mm³ size, and E — diffusion of auxin from paper soacked with auxin solution to agar blocks on glass slide (seen from side); 3 — montage of experiment, and 4 — records of coleoptile curvature responses

Kostki agarowe. Z bakteriologicznego agaru (Agar bacteriological, Gurr's, London) sproszkowanego i wody wodociągowej, w stosunku 1 : 50, otrzymywano w sterylizatorze parowym 2% żel agarowy, który wylewano na szybkę szklaną w takiej ilości, żeby otrzymać po wystudzeniu warstwę agarową grubości około 2 mm. Płytkę agarową dzielono na odpowiedniej wielkości prostokąty (2 cm×2 cm lub 2 cm× 4 cm), umieszczano je na osobnych szkiełkach podstawowych i krajano na kostki kwadratowe około 11 mm^3 objętości (przy pomocy zestawu równolegle umocowanych żyletek w odstępach 2,4 mm).

Przygotowywanie biotestu. Gdy dekapitowany kiełek (patrz Materiał, str. 113) osiągał około 2 cm wysokości, a liścień wyrastał na kilka milimetrów ponad brzeg coleoptile (3), odrywano ten liścień od nasady i wyciągano z pochewki, którą wówczas obcinano ostrą żyletką na 2—3 mm, a odwrócony liścień (4) wsuwano z powrotem do pochewki na kilka mm głębokości. Wystający z coleoptile liścień obcinano na długość około 5 mm, a całe coleoptile z częścią prostą hypocotile (łodyżki podliścieniowej) (5) około 5 mm długości odcinano od nasienia. Tak spreparowane pędy wysadzano rzędem do wilgotnych drobnych trocin (przesianych i dobrze ubitych) w podłużnych wąskich pudełkach z masy plastycznej (pudełka do



Ryc. 3. Serie roślinek testowych z kostkami agarowymi zawierającymi auksyny: a — zaraz po nałożeniu kostek agarowych; b — po 24 godzinach zadziałania

Bioessays with agar blocks containing auxin: a — at the beginning of experiment; b — 24 hours after auxin application

szczotek do zębów), przy samej ściance, w odstępach około 1,5 cm, w ilości 10—12 sztuk w rzędzie (ryc. 3). Żeby nie uszkodzić hypocotile przy wsadzaniu do trocin i równomierniej rozmieścić roślinki, wsadzano je do

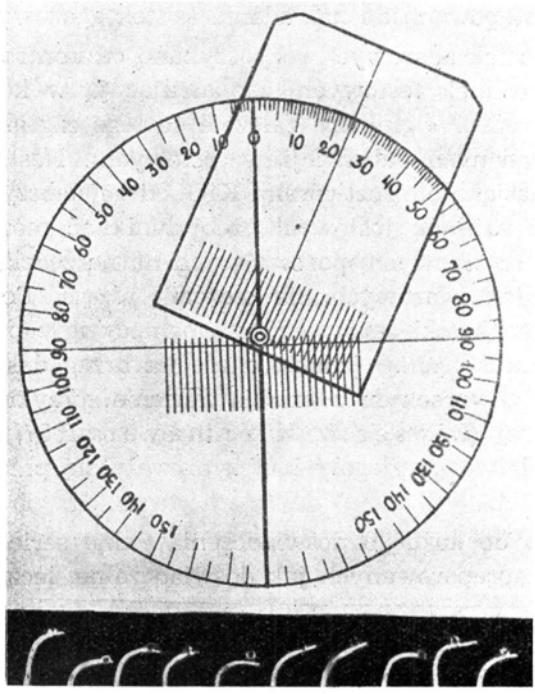
dołków zrobionych igłą preparacyjną. Przy wsadzaniu roślinek testowych ustawiano je tak, żeby dłuższa średnica poprzecznego przekroju łącząca dwie wiązki naczyniowe miała kierunek równoległy do długich ścianek pudełka. Pudełka z wysadzonymi w rząd roślinkami wstawiano do komory wilgotnej i przystępowano do nakładania kostek agarowych.

Nakładanie kostek agarowych rozpoczynano od kontrolnej serii (każda seria z 10—12 roślinek testowych) zaopatrując ją w kostki nasiąknięte wodą lub roztworem 2% glukozy (zależnie od tego czy glukoza wchodziła do roztworów badanych substancji wzrostowych). Następnie nakładano kostki agarowe nasiąknięte roztworami KIO, od najsłabszych do wyższych, na kolejne serie roślinek testowych, żeby uniknąć możliwości wpływu wyższych stężeń resztkowych, pozostających na narzędziach służących do przenoszenia kostek agarowych, na stężenia niższe. Po zdjęciu bibuły z agaru nakładano kostki agarowe (przy pomocy igły preparacyjnej lub małej łopatki dentystycznej) jednostronnie na brzeg dekapitowanego coleoptile w kącie utworzonym z częścią liścienia, przykrywając przekrój wiązki naczyniowej (Linser & Kiermayer, 1957, str. 52, Abb. 19). Wilgotne kostki łatwo przylegały i utrzymywały się przez całe doświadczenie (ryc. 3 a i b).

Wprowadzono do każdego doświadczenia jedną serię „pustych" kiełków testowych (,spreparowanych jak doświadczalne, lecz bez kostek agarowych) na wygięcia geotropiczne (6), które wskazywały poziom endogennych auksyn pozostałych w coleoptile lub powstających w ciągu trwania doświadczenia. Roślinki przeznaczone do tej serii wsadzano do trocin tak, żeby dłuższa średnica przecięcia coleoptile, łącząca dwie wiązki naczyniowe, była pionowa do długich ścianek pudełka. Naczynia z tak wsadzonymi roślinkami przechylano o 90°; w ten sposób stały one na jednej z podłużnych ścianek pudełka, a roślinki testowe znajdowały się w położeniu poziomym z wiązkami naczyniowymi po stronie dolnej i górnej, w położeniu analogicznym do płaszczyzny wygięć innych serii (ryc. 1, IV, 3). Wszystkie serie jednego doświadczenia ustawiano w płaskim naczyniu wysłanym wilgotną bibułą, przykrywano szklaną płytką ze zwilżoną bibułą i wstawiano do termostatu na 24 godz. (7), przy temp. 24—25°C.

Utrwalanie i mierzenie wyników. Po zakończeniu doświadczenia kładziono pudełka z roślinami bokiem na światłoczuły papier fotograficzny tak, żeby coleoptile znalazły się w położeniu równoległym do powierzchni papieru, i naświetlano je od góry przez parę sekund białym światłem elektrycznym. Przed odbijaniem cieni biotestu na wygięcia geotropiczne, obracano każdą roślinkę o 90° tak, żeby płaszczyzna wygięć była równoległa do papieru. Po wywołaniu i utrwaleniu cieni coleoptile wszystkich serii, mierzono wygięcia przy pomocy odpowiednio przystoso-

wanego kątomierza (ryc. 4). Jest to kątomierz z przejrzystej masy plastycznej, posiadający ruchomą płytkę umocowaną w środku. Płytka jest podzielona podłużnie czerwonymi równoległymi kreskami, w odstępach



Ryc. 4. Kątomierz przystosowany do mierzenia wygięć na cieniach coleoptile odbitych na papierze fotograficznym (poniżej)
Goniometet adjusted to measure the curvatures of coleoptiles in degrees from their shadowgraphs (below)

1,5 mm (czarne kreski nie są widoczne na czarnym tle fotografii cieni), odpowiednio do przebiegu takichże kresek na nieruchomej części kątomierza.

UZASADNIENIE INNOWACJI WPROWADZONYCH DO DOŚWIADCZENIA

Nowa modyfikacja — „Coleoptile-hypocotile test" — powstawała stopniowo w ciągu doświadczeń metodą „Coleoptile test" Funkego*). Po

* Metoda Funkego była stosowana w Pracowni Fizjologii Roślin Uniwersytetu Toruńskiego, gdzie na wiosnę 1956 roku rozpoczęłam pracę nad substancjami wzrostowymi. Od jesieni 1956 roku dalsze doświadczenia prowadzę w pracowni prywatnej (Toruń, Rybaki 55).

całkowitym opanowaniu tej metody i przeprowadzeniu szeregu doświadczeń okazało się, że wyniki były zbyt słabe w stosunku do czasochłonnych czynności przy ustawianiu doświadczenia. Szukając przyczyn małej efektywności testu przeanalizowano krytycznie każdy składowy element testu i wymaganych czynności, dążąc do uczulenia testu przy jednoczesnym uproszczeniu czynności przygotowawczych i dostosowaniu do posługiwania się bezpośrednio chromatogramami bibułowymi, z substancji wzrostowych.

Uzasadnienie innowacji:

1. Dodawano glukozę do wodnych roztworów kwasu indolooctowego wychodząc z założenia, że skoro w doświadczeniach na wzrost prostoliniowy cylindrycznych odcinków coleoptile szereg autorów stwierdziło dodatni wpływ cukrów dodawanych do roztworów substancji wzrostowych (Schneider C. L., 1938 i inni), mogą one również w testach wygięciowych podnosić wartość wygięć bądź jako materiał energetyczny potrzebny do oddychania, bądź jako czynnik fizyczny, np. wpływający na lepsze zwilżanie powierzchni lub podnoszący szybkość przesuwania się i przenikania substancji wzrostowych. Doświadczenia, przeprowadzone w celu wykazania wpływu 2% glukozy w roztworach kwasu indolooctowego jednej i tej samej koncentracji, dały następujące wyniki:

Roztwory	glukoza 2%	KIO + 2% glukoza	KIO
Średnie wygięcia coleoptile w stopniach:	0	70	55

(Dane z 2 doświadczeń na 72 kiełkach w każdej serii, z dn. 14—15.XI.1957 r. i 3—4.I.1958 r.).

Wyniki wskazują, że dodanie 2% glukozy do roztworu KIO podnosi stopień wygięć coleoptile. Pozostaje do oznaczenia wysokość optymalnych stężeń glukozy w roztworach KIO oraz wpływ innych cukrów jako substancji dodatkowych, bezpośrednio nieczynnych wzrostowo.

2. Inaktywowanie enzymów świeżego materiału roślinnego wysoką temperaturą stosował Kefford (1955), gotując go przez 5 minut w wodzie. Zamiast gotowania w wodzie stosowano inaktywację w parze wodnej przy temp. 100°C przez 10 minut. Miazga otrzymana przez roztarcie inaktywowanego materiału lub sok wyciśnięty z niej oraz chromatogramy bibułowe z soku (w obrębie Rf odpowiadającej KIO) miały właściwości auksyny. Ponieważ chromatogramy bibułowe otrzymane z tego soku były

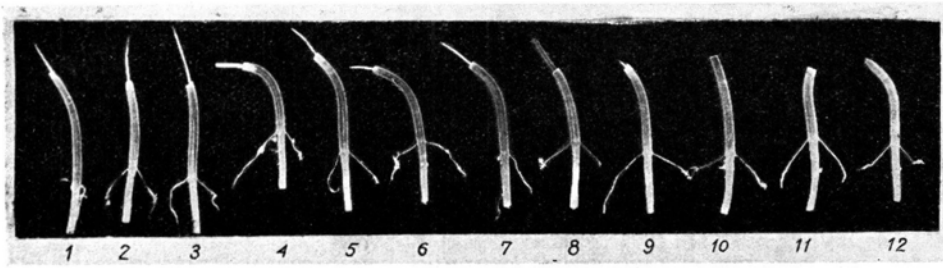
aktywne w strefie odpowiadającej wartości Rf kwasu indolooctowego, można było wyciągnąć wniosek, że KIO dzięki inaktywowaniu enzymów w parze wodnej przy temp. 100° C nie ulega oksydacji, ponieważ nie traci specyficznych własności auksyny. Szczegóły chromatografii bibułowej do wykrycia KIO z naturalnych soków roślinnych oraz bezpośrednie zastosowanie chromatogramów do testu wygięciowego będą podane w osobnym doniesieniu.

3. Obcięcie wierzchołka coleoptile, koncentrującego substancje wzrostowe, zatrzymywało lub obniżało intensywność wydłużania się coleoptile aż do czasu powstania nowego wierzchołka fizjologicznego, podczas gdy pierwszy liść (liścień), rosnący nasadą, z intensywnością nie zmienioną, przerastał w tym okresie coleoptile. Na wysunięcie się liścienia o kilka milimetrów ponad coleoptile potrzeba było od 8 do 12 godzin czasu, przypuszczalnie zależało to od okresu dobowego rytmu wzrostu. Możliwe, że w okresie intensywnego wzrostu, gdy kiełki mają około 1,5—2 cm, wierzchołek coleoptile (koncentrujący substancje wzrostowe) hamuje rozwój liścienia (I-go liścia) wyrastającego z hypocotile, czyli — jak można powiedzieć przez analogię — dominuje nad czynnościami hypocotile, jak pąk wierzchołkowy dominuje nad bocznymi pąkami w układzie pędu rozgałęzionego. Usuwając wierzchołek coleoptile (długości około 5 mm) znoszono jego dominację nad hypocotile, które stając się aktywne, pobudzało liść do intensywniejszego wzrostu i do prześcignięcia na wysokość dekapitowane coleoptile o kilka mm w ciągu 8—12 godzin.

4. Przed wsunięciem liścienia z powrotem do coleoptile, obracano go o 180° i wsuwano końcem wierzchołkowym ku dołowi. Przekonano się, że liścień, pozostawiony w pozycji naturalnej, nawet oderwany od hypocotile, wydłuża się rosnąc jeszcze przez pewien czas od nasady i wysuwa się z pochewki unosząc przylegającą do niego kostkę agarową ponad powierzchnię ścięcia coleoptile. Ponadto przez wyjęcie liścienia z pochewki i wsunięcie go z powrotem wierzchołkiem na kilka zaledwie mm, unikano możliwości „sprężynowania" przez niego wygięć coleoptile pod wpływem jednostronnie zastosowanych auksyn.

5. Pozostawiona przy roślince testowej, zasadzonej do wilgotnych trocin, część hypocotile już po 2 dobach wytwarza na granicy z coleoptile dwa dostrzegalne gołym okiem zaczątki korzonków przybyszowych (w miejscu przebiegu dwóch bocznych wiązek naczyniowych), które po tygodniu osiągają długość 5—10 mm (ryc. 5). Hypocotile wytwarza jednocześnie drugi liść (I-szy liść — liścień był usunięty), wyrastający ponad dekapitowane coleoptile. Sądząc z powyższych czynności organotwórczych, hypocotile pozostawione przy coleoptile posiada nie tylko zdolność przetwarzania zawartych w sobie materiałów, czerpiąc tylko wodę z podłoża na budowę nowych komórek, lecz jednocześnie i zdolność podtrzymywania

na pewnym poziomie niezbędnych do wzrostu czynności fizjologicznych, a przede wszystkim oddychania (Bünning, 1953, str. 80—89). Bezpośrednie połączenie coleoptile z wysoce fizjologicznie czynnym hypocotile wpływa znacznie na podniesienie wyników wygięć coleoptile w doświadczeniach. Porównując maksymalne wygięcia w doświadczeniach stawia-



Ryc. 5. Rośliny testowe po tygodniu od zakończenia doświadczenia metodą „Coleoptile-hypocotile test". Każde hypocotile wytworzyło po 2 korzonki przybyszowe na granicy z coleoptile oraz drugi liść (z wyjątkiem rośliny 8, 10, 11 i 12), który usunął resztkę pierwszego liścia i wyrósł ponad coleoptile

The test plants in a week after the experiment with "Coleoptile-hypocotile test" method: every hypocotile formed two adventive roots in the limit zone with the coleoptile and the second leaf, which removed the remaining piece of primary leaf and emerged from the coleoptile (except. 8, 10, 11 i 12 test plants)

nych metodą „Coleoptile test" i „Coleoptile-hypocotile test" pod wpływem jednakowego stężenia KIO, możemy stwierdzić, że druga metoda jest przynajmniej 7-krotnie efektywniejsza niż pierwsza.

Zestawienie porównawcze wygięć maksymalnych w testach: „Coleoptile" i „Coleoptile-hypocotile" pod wpływem roztworu 0,2 mg % KIO (z 2% glukozą) przedstawia się następująco:

Metoda	Maksymalne wygięcia w stopniach	Średnia 6-ciu maksymalnych wygięć
„Coleoptile test"	21	18
„Coleoptile-hypocotile test"	150	130

6. Wprowadzono do wszystkich doświadczeń jedną serię na wygięcia geotropiczne dla oznaczenia poziomu endogennych auksyn, pozostałych w coleoptile po dekapitacjach. Poziom ich wykazuje duże wahania zależnie od warunków hodowli, pory roku i okresu rytmu dobowego i wpływa

na wrażliwość coleoptile na auksyny wprowadzane z zewnątrz. W ten sposób wartość wygięć otrzymanych w doświadczeniu można podawać jako stopień wrażliwości względnej w procentach od wygięć geotropicznych, co stwarza lepszą porównywalność wyników różnych doświadczeń (ryc. 6, wykresy I i II).

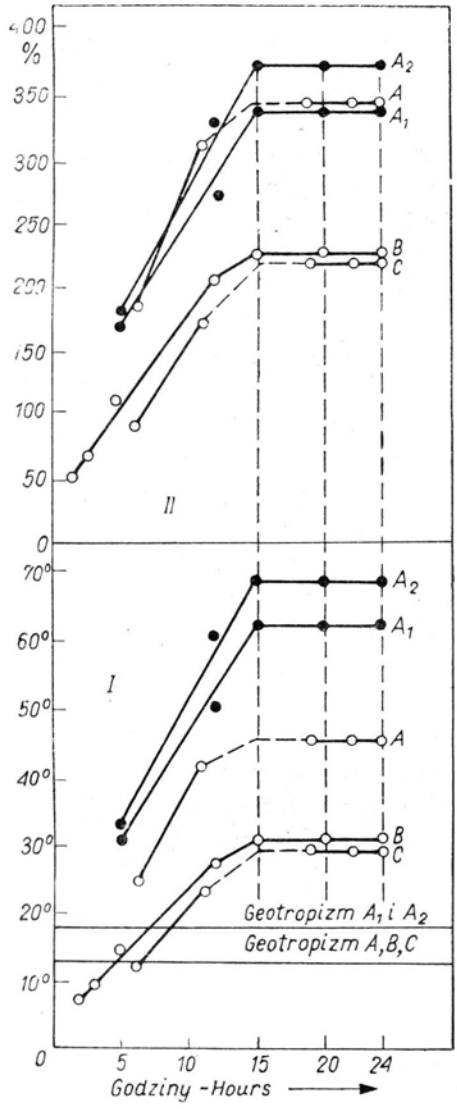
7. Przedłużenie czasu zadziałania do 24 godzin miało na celu objęcie doświadczeniem całego cyklu rytmu dobowego wzrostu, który, łącznie z innymi czynnościami fizjologicznymi, podlega rytmice „dziennej" („Tagesrythmik", Bünning, 1953, str. 80), a na poszczególnych odcinkach doby różni się intensywnością, związaną najściślej z oddychaniem. W poprzednich efektywnych metodach testu czas zadziałania nie przekraczał 7 godzin („Deseeded test", Skoog, 1937), powstawała teraz obawa, czy w nowej modyfikacji testu, przedłużającej zadziałanie do 24 godz., nie pojawią się wcześniej czynniki ograniczające wzrost zarówno endogenne, jak egzogenne, np.: fizjologiczne starzenie się („physiological aging", Skoog, 1937, str. 323) wykluczające dalszy wzrost lub wyczerpanie się auksyn, zawartych w kostce agarowej.

W celu wyjaśnienia powyższych wątpliwości przeprowadzono doświadczenia na oznaczenie: najdłuższego efektywnego czasu zadziałania oraz wpływu rozmiarów kostki agarowej na czas jej czynnego wpływu na wygięcia.

WPŁYW CZASU ZADZIAŁANIA KWASEM INDOLOOCTOWYM (KIO) I ROZMIARÓW KOSTKI NA WYGIĘCIA COLEOPTILE W OKRESIE 24 GODZIN

W pierwszych doświadczeniach metodą „Coleoptile-hypocotile test" przekonano się, że wygięcia coleoptile wzmagały się pod wpływem kostki agarowej z substancjami wzrostowymi poza okres 5—7 godzin, wyznaczony dla metody „Deseeded test", a osiągnąwszy maksymalne wartości wygięć dla danej serii, nie zmieniały ich przez szereg godzin. Dlatego przedłużono doświadczenie do 24 godzin. W celu otrzymania danych liczbowych wykonano trzy kolejne doświadczenia, w których każda seria po 12 roślin testowych miała trzy powtórzenia: dwa z nich odbijano jako cienie na światłoczułym papierze 5—7 razy w pewnych odstępach czasu w ciągu 24 godzin, trzecie zaś służyło jako kontrolne dla stwierdzenia wpływu kilkurazowego krótkiego naświetlania i zabiegów związanych z odbijaniem cieni coleoptile. To trzecie powtórzenie fotografowano po 20 i 24 godzinach.

Do doświadczenia użyto kilku różnych, dostatecznie wysokich stężeń, 25 mg/l, 2,5 mg/l i 0,25 mg/l, żeby czynnikiem ograniczającym wygięcie nie było wyczerpanie się auksyn w kostce agarowej lub zbyt niski ich poziom. W tym też celu postawiono ponadto jedno doświadczenie o dwóch



Ryc. 6. Przebieg wygięć coleoptile w ciągu 24 godzin zadziałania kwasem indolooctowym (KIO) oraz wpływ podwójnych kostek agarowych

Curvature responses of coleoptiles during the 24 hours application period of indoleacetic acid (IAA) and the effect of double agar blocks

Wykres I przedstawia krzywe wygięć w stopniach (wygięcia serii kontrolnych = 0). Wykres II: te same wygięcia w procentach od średniej wygięć geotropicznych (dla krzywych: A, B, C = 13 stopni, dla A_1 i A_2 = 18 stopni). Stężenia KIO — krzywe A, A_1 i A_2 = 2,5 mg/l. B = 0,25 mg/l i C = 25 mg/l (hamujące)

Diagram I represents curves of curvatures in degress (curature of control series = 0). Diagram II: the same in per cent of medial of geotropical curvatures (for curves: A, B, C = 13 degrees, A_1 and A_2 = 18 degrees). Concentrations of IAA — curves A, A_1 and A_2 = 2,5 mg/l, B = 0,25 mg/l and C = 25 mg/l (inhibitant)

równoległych seriach (w dwóch powtórzeniach) z kostkami agarowymi pojedynczymi i podwójnymi (jedna kostka na drugiej).

Wyniki — jako średnie dwóch powtórzeń — przedstawiono na wykresach (ryc. 6, wykresy I i II). Na wykresie I na osi odciętych podano czas w godzinach, na osi rzędnych — wygięcia ujemne, na stronę „pustą", w stopniach. Widzimy, że wygięcia coleoptile wzrastają w ciągu 15 godzin zadziałania i nie zmieniają się w ciągu następnych dziewięciu godzin dla wszystkich stężeń i rozmiarów kostki. Krzywe A i A_1, przedstawiające średnie wyników wygięć jednego stężenia KIO z różnych doświadczeń, są od siebie oddalone z powodu różnej przypuszczalnie zawartości endogennych auksyn, na co wskazuje średnia wygięć geotropicznych dla odnośnego doświadczenia, przy krzywej A wynosi ona 13 stopni, przy krzywej A_1 — 18°. Gdy przeliczono wartości wygięć procentowo w stosunku do wygięć geotropicznych (ryc. 6, wykres II), to krzywe tego samego stężenia A i A_1 z różnych doświadczeń, poprzednio oddalone od siebie o 16 stopni, prawie się zlały. Nie zostało jeszcze wyjaśnione, jaki jest optymalny poziom endogennych auksyn dla otrzymania maksymalnych wygięć w różnych stężeniach KIO. Stwierdzono, że przy bardzo niskich wartościach geotropicznych wygięć wrażliwość na auksyny, wprowadzone z kostki agarowej, również jest niska.

Wpływ rozmiarów kostki agarowej na wygięcia przedstawiają krzywe A_1 i A_2: pojedyncze kostki agarowe — A_1 i podwójne kostki agarowe — A_2. Serie o podwójnych kostkach agarowych osiągnęły nieco wyższe wartości wygięć (w końcowym wyniku różnica wynosi 6 stopni), lecz również nie przedłużyły czasu efektywnego zadziałania. Wyniki te świadczą, że czynnikiem ograniczającym wygięcia do 15 godzin nie było wyczerpanie się lub zbyt małe stężenie auksyn w kostce, gdyż nawet kostki podwójne, które wywołały wygięcia silniejsze niż kostki pojedyncze, nie mogły aktywować strony zadziałanej do wzrostu po upływie 15 godzin od początku doświadczenia.

Sądząc z otrzymanych wygięć w seriach (trzecie powtórzenie) analogicznych do omawianych, fotografowanych tylko przy końcu doświadczenia po 20 i 24 godzinach, wpływ kilkakrotnego krótkiego naświetlania i zabiegów związanych z odbijaniem cieni coleoptile nie był istotny.

DYSKUSJA

Przedłużenie efektywnego czasu zadziałania w modyfikacji „Coleoptile-hypocotile test" do 15 godzin, podczas gdy w metodzie „Deseeded test" wynosiło 5—7 godzin, możliwe było przypuszczalnie z następujących powodów: 1. obniżenie możliwości regenerowania auksyn w aktywnych stężeniach po stronie „pustej" coleoptile przez całkowite odcięcie tarczki

i korzeni u biotestu, 2. użycie młodszych kiełków do doświadczenia, których „fizjologiczne starzenie się" następowało później.

Korzenie są pewnego rodzaju, jak określa K. Mothes (1956), chemicznym warsztatem („Chemische Werkstatt besonderer Art"), gdyż syntetyzują szereg złożonych związków organicznych, w tym również przypuszczalnie tzw. kompleksy auksynowe (Auxin-Komplex, Mothes, 1956, str. 9). Możliwe, że pozostawienie w teście „deseeded" części tarczki z korzeniami powodowało powstawanie po stronie nie zadziałanej „pustej", w ciągu 5—7 godzin doświadczenia, ilości auksyn dostatecznej nie tylko do wyrównania wygięć strony zadziałanej, lecz i powstawanie wygięć dodatnich na stronę kostki (w stężeniach słabych i kontrolnych, Skoog, 1937, str. 320). Według Skoога po stronie zadziałanej prekursory wchodzą do kostki agarowej i nie są natychmiast przemieniane w auksyny. W teście „coleoptile-hypocotile", pozbawionym całkowicie korzeni, wygięcia dodatnie nie powstawały zarówno w seriach kontrolnych z „pustymi" kostkami agarowymi, jak i w seriach o stężeniach słabych. Świadczyłoby to, że kiełek pozbawiony korzeni nie zawierał wcale prekursorów dopływających do coleoptile lub zawierał je w stężeniach tak minimalnych, że nie mogły one regenerować auksyn i przeciwdziałać wygięciom ujemnym powstającym pod wpływem auksyn z kostki.

W teście „deseeded" posługiwano się kiełkami starszymi, gdyż nakładano kostki agarowe na kiełki długości około 3—4 cm, w teście zaś „coleoptile-hypocotile" kiełki miały przy nakładaniu kostek około 2—3 cm długości. W ten sposób w teście „deseeded" kiełki mogły kończyć okres wyginania się pod wpływem egzogennych auksyn nie tylko na skutek wyrównywania się lub przewagi endogennych auksyn po stronie nie zadziałanej (powstających z prekursorów w ciągu doświadczenia), lecz również z powodu fizjologicznego starzenia się tkanki coleoptile głównie po stronie uboższej w auksyny (Skoog, 1937, str. 323). W tekście „coleoptile-hypocotile" fizjologiczne starzenie się musiałoby również się rozpoczynać od strony nie zadziałanej — „pustej", która nie otrzymując prekursorów auksyn nie produkuje endogennych auksyn, staje się sztywna i przeciwstawia się wygięciom strony zadziałanej.

Zdawałoby się, że używając do doświadczenia kiełków bardzo młodych można przedłużyć czas efektywnego zadziałania znacznie poza 15 godzin, jednak zbyt młode kiełki nie wykazują jeszcze dostatecznego fizjologicznego zróżnicowania wierzchołka coleoptile. Kiełek wysokości poniżej 1,5 cm po dekapitacji tylko nieznacznie obniża szybkość swego wzrostu i rośnie równomiernie z liścieniem, co wskazuje na rozproszony stan auksyn, podczas gdy w starszych kiełkach są one zlokalizowane głównie w wierzchołku coleoptile, którego obcięcie zatrzymuje wzrost na pewien czas całkowicie. Przypuszczalnie niedostatecznym skoncentrowaniem auk-

syn w wierzchołku coleoptile można wytłumaczyć mniejszą wrażliwość dekapitowanych zbyt młodych kiełków na auksyny wprowadzane z zewnątrz, zanotowaną przez Skooga (1937, str. 317). Ograniczenie czasu wyginania się coleoptile do 15 godzin zadziałania w wielu doświadczeniach metodą „coleoptile-hypocotile test" ulega lekkim wahaniom w obie strony w poszczególnych doświadczeniach, zależnie również od okresu cyklu rytmu dobowego wzrostu, dlatego przedłużenie czasu zadziałania do 24 godzin daje wyniki łatwiej porównywalne.

Wyniki pozytywnego wpływu zdwojonych kostek agarowych na stopień wygięcia coleoptile nasuwają zadanie znalezienia optymalnych rozmiarów kostek w doświadczeniach trwających całą dobę.

STRESZCZENIE

Opisano nową uproszczoną metodę testu owsianego wygięciowego na auksyny — „Avena curvature test" W. F. Wenta pod nazwą „Coleoptile-hypocotile test". Podano schematy porównawcze wyjściowego testu Wenta „Standard test" i jego trzech modyfikacji: „Deseeded test" — F. Skooga, „Coleoptile test" — H. Funkego i nowej metody „Coleoptile-hypocotile test" (ryc. 1).

Główne cechy nowej metody są następujące:

1. Jest łatwiejsza pod względem preparowania roślinek testowych i ustawiania całego doświadczenia i daje dłuższy okres czasu na odczytywanie i utrwalanie wyników.

2. Sposób wprowadzania auksyn do kostek agarowych z bibuły nasiąkniętej ich roztworem umożliwia posługiwanie się bezpośrednio bibułowymi chromatogramami z substancji wzrostowych do nasiąkania agaru.

3. Daje bardziej porównywalne wyniki z różnych doświadczeń dzięki: zastosowaniu 24-godzinnego testu obejmującego cały dobowy cykl rytmu wzrostowego i dzięki wprowadzeniu do każdego doświadczenia serii kontrolnej na wygięcia geotropiczne. Te ostatnie określają poziom endogennych auksyn w roślinkach testowych i pozwalają obliczać wygięcia w procentach od wygięć geotropicznych.

4. Jest pośrednią pomiędzy metodą "deseeded test" a metodą "coleoptile test" co do morfologicznych składników samej rośliny testowej, która składa się z dekapitowanego coleoptile (pochewki liścieniowej), pozbawionej liścienia (I-go liścia) i części hypocotile (łodyżki podliścieniowej).

5. Jest wrażliwsza na auksyny, ponieważ daje wygięcia przynajmniej siedmiokrotnie większe niż metoda „Coleoptile test" i nawet przekracza intensywnością wygięć metodę „Deseeded test" przez przedłużenie czasu zadziałania z 5—7 godzin do około 15 godzin efektywnych w całkowitym cyklu dobowego wzrostu. Obecność 2% glukozy w roztworach KIO podnosi intensywność wygięć.

Wyniki doświadczeń przeprowadzonych w celu oznaczenia czasu skutecznego wpływu kwasu indolooctowego (zawartego w kostkach agarowych) na wygięcia pochewki liściennej w ciągu 24-godzinnego testu wykazały okres czynny około 15 godzin i następne zatrzymanie się wygięć do końca doświadczenia. Z doświadczeń tych wyciągnięto wniosek, że przyczyną zatrzymania się wygięć jest osiągnięcie „fizjologicznej starości" głównie przez stronę „pustą" (przeciwległą kostce agarowej) coleoptile. Fizjologiczne starzenie się nie obejmuje hypocotile, które pozostaje aktywne znacznie dłużej, wytwarzając po parze korzonków przybyszowych na granicy z coleoptile i drugi liść, który przerasta (w 5—6 dni) dekapitowane coleoptile.

(Wpłynęło dn. 8.8.1958 r.)

SUMMARY

In this article the new method of F. W. Went's "Avena curvature test" for auxin has been described as "Coleoptile-hypocotile test". The comparative drawing schema of Went's "Avena test" as "Standard test" method and its three modifications: F. Skoog's "Deseeded test", H. Funke's "Coleoptile test", and the new "Coleoptile--hypocotile test" methods have been presented (Fig. 1).

The main features of the new method are as follows:

1. It is easier than the previous method of preparing the test plante as in th montage of whole experiments (Fig. 2—4) and gives a longer period of time to record the results.

2. The way of introducing auxin to agar blocks from paper soaked with its solution makes it possible to use directly the paper chromatograms of growth substances to introduce them in agar.

3. It gives more comparative results from different experiments by the application of the 24 hours test, which records the whole day cycle growth rhythm and by the investigation in every experiment of the comparative series for geotropical curvatures registering the level of the endogeneous auxin in the test plants, which influences in a considerable degree the sensibility of biotest to outside auxin (Fig. 6).

4. As to the morphological components of the test plant it is midway between the "Deseeded test" and the "Coleoptile test" methods, it is composed of the decapitated coleoptile (without the cotyledon — primary leaf) and of the part of hypocotile, while in the "deseeded test" there remains almost the whole decapitated seedling with the lower half of the scutellum (with some roots), and in the "coleoptile test" the test plant is limited to the upper part of the decapitated coleoptile 1,2 cm of length (with the primary leaf in it).

5. As to the sensibility to auxin applied unilaterally, it gives curvatures at least seven times greater than the "coleoptile test" method and even surpasses by the intensity of the curvatures the "deseeded test" method by means of extending the time of auxin action from 5—7 hours to about 15 hours. effective in the complete cycle of 24 hours growth experiment.

The presence of 2% glucose in the solutions of IAA increased the intensity of curvatures.

The results of experiments undertaken to determine the time of the effective activity of the indoleacetic acid (IAA) included in agar blocks on curvatures of coleoptiles showed its duration of about 15 hours and further stopping of curvatures till the end of the test (Fig. 6). In the same way behaved all series of various IAA concentrations with single and double blocks (put one on the other). This stopping of curvatures at the same time in about 15 hours of the test, independently of the concentrations of IAA or the size of agar blocks, and the stability of the achieved curvatures in the last hours of the experiments seems to be due to the "physiological aging" of the "empty" side of coleoptiles. This physiological period is connected with the stiffness of the tissues because of lack of auxin for several hours in the empty side, which probably balances the strength of the curvature of the opposite "induced" side. The physiological aging of the coleoptiles does not attain hypocotiles, they remain active several days longer producing each a pair of adventige roots in the limiting zone with the coleoptile and the second leaf, which emerges in the decapitated test plant in five or six days (Fig. 5).

The direct application of paper chromatograms of auxin from natural saps will be discussed in a separate report.

LITERATURA

Audus L. J., 1953, Plant Growth Substances, Leonard Hill Ltd. London.

Bünning E., 1953, Entwicklung und Bewegungphysiologie der Pflanze, 3. Aufl. Lehrbuch der Pflanzenphysiologie, Springer, Berlin.

Kefford N. P., 1955, Journ. Exper. Bot. 6 (16): 129—151.

Linser H., Kiermayer O., 1957, Methoden zur Bestimmung pflanzlicher Wuchsstoffe, Springer, Wien.

Nitsch J. P. and Nitsch C., 1956, Plant Physiol. 31 (2): 94—111.

Mothes K., 1956, Wissenschaft. Ann. 5 Jahrgang 1: 1—24.

Skoog F., 1937, Journ. General Physiol. 20 (3): 311—334.

Söding H., 1952, Die Wuchsstofflehre, Georg Thieme, Stuttgart.

Thimann K. V., 1952, The action of hormones in plants and invertebrates, Academic Press, New York.

Went F. W., 1926, Proc. Koninkl. Nederland, Akad. Wetenschap. 30: 10.

Went F. W., 1927, Wuchsstoff und Wachstum, Utrecht.

Went F. W., 1928, Rec. trav. botan, néerl. 25: 1—116.

Went F. W., 1935, Bot. Rev. 1: 162.

Went F. W., 1951, Twenty Years of Plant Hormone Research, edit. Skoog F. (Symposium), Plant Growth substances, Univ. Wisconsin Press, Madison.