Biologiczna metoda ilościowego oznaczania kwasu giberelinowego testem pierwszego liścia owsa

A biological assay for gibberellic acid with the first oat leaf

M. MICHNIEWICZ

WSTĘP

Stwierdzenie u roślin wyższych występowania substancji giberelinopodobnych (Radley 1956, 1958, Murakami 1957, Ritzel 1957, Corcoran i Phinney 1958, MacMillan i Suter 1958, Nickell 1958, Phinney i Neely 1958, West i Murashige 1958, Simpson 1958, Kawarada i Sumiki 1960) wywołało konieczność wynalezienia odpowiednich metod ich ilościowego oznaczania.

Metody chemiczne zarówno kolorymetryczne, jak i fluorescencyjne nie są dostatecznie czułe dla oznaczania tak znikomych ilości tych substancji, jakie występują w roślinach wyższych (Overbeek i współautorzy 1957, Kavanagh i Kuzel 1958, Simpson 1958, Henderson i Graham 1960). Ponadto substancje giberelinopodobne, wyekstrahowane z materiału roślinnego, nie zawsze są identyczne z preparatami, jakimi dysponujemy w chwili obecnej w stanie krystalicznym (Henderson i Graham 1960). Dotychczas wyodrębniono bowiem z roślin wyższych substancję identyczną tylko z gibereliną A_1 (Phinney i Neely 1958, MacMillan i Suter 1958, West i Murashige 1958, Kawarada i Sumiki 1960).

Znacznie czulsze są natomiast metody biologiczne, oparte na stymulującym wpływie gibereliny na wzrost pędów. Pozwalają one ponadto na stwierdzenie obecności każdej substancji o własnościach gibereliny.

Niewątpliwie najbardziej niezawodnymi z tych metod są te, w których jako testu używa się całych roślin. Tak np. test karłowatych mutantów kukurydzy reaguje na kwas giberelinowy już w ilości 0,0001 μg na roślinę, a w granicach od 0,001 do 10 μg umożliwia ilościowe oznaczanie tego związku (Neely i Phinney 1957). Podobnie reagują siewki karłowatego grochu (MacComb i Carr 1957).

Możliwości stosowania tych metod są jednak ograniczone konieczno-

ścią posiadania szklarni, a poza tym wyniki uzyskujemy tu po stosunkowo długim okresie czasu.

Znaczne uproszczenie stanowi niewątpliwie metoda Aytouna i współautorów (1959), w której test stanowią siewki ryżu. Rośliny te zanurza się korzeniami w badanych roztworach i po pewnym czasie mierzy się przyrost lodygi. Test ten jest jednak mniej czuły, reaguje bowiem dopiero na giberelinę w stężeniu $0,1 \mu\text{g/ml}$ i wymaga stosunkowo dużej ilości badanego roztworu (8 ml).

Bardzo wyraźnie reagują na giberelinę nie tylko całe rośliny, ale także i niektóre organy: liścienie ogórka (Kribben 1957), liście, np. *Raphanus* (Kuraishi i Hashimoto 1957), a nawet ich fragmenty, np. krawki wycięte z etiolowanych liści fasoli (Scott i Liverman 1957), dalej odcinki etiolowanych pędów grochu (Purves i Hillman 1959), czy wreszcie odcinki wąsów ogórka (Galun 1959).

Jako testy na giberelinę najbardziej przydatne, okazały się jednak przede wszystkim odcinki pierwszego liścia traw — jęczmienia (Hayashi i Murakami 1954), owsa (Hayashi i Murakami 1954, Harada i Nitsch 1959) i pszenicy (Radley 1958). Metody, które tu stosuje się, przypominają w zasadzie test cylindryczny Bonnera (Audus 1959) z tą różnicą, że uwzględnia się przyrost odcinka pierwszego liścia, a nie koleoptyla, jak to ma miejsce przy oznaczaniu substancji wzrostowych typu auksyny.

Testy te nie są jednak wystarczająco czułe. W doświadczeniach Radley (1958) na przykład liście pszenicy reagowały na stężenie kwasu giberelinowego o stężeniu $0,01 \mu\text{g/ml}$, a różnice w intensywności reakcji wzrostowych dla poszczególnych stężeń, różniących się pomiędzy sobą dziesięciokrotnie, okazały się nieistotne. Test ten, a także testy odcinków pierwszego liścia jęczmienia i owsa opisane przez Hayashi i Murakami (1954) nie są przy tym specyficzne tylko dla gibereliny, lecz reagują również na auksynę.

Podobne wady ma także metoda oparta na pomiarach przyrostu odcinków wąsów ogórka (Galun 1959), a poza tym kłopotliwa wydaje się także uprawa tych roślin.

Doświadczenia Radley (1958), Purvesa i Hillmana (1958) wykazały, że badane fragmenty liści, czy też lodygi reagowały tym silniej na giberelinę, im bliższe było ich położenie w stosunku do merystemu szczytowego. Również Vlitos i Meudt (1957) oraz Brian i Hemming (1958) stwierdzili, że fragmenty pędów, w których zachowano przy cięciu tkankę merystematyczną, są bardziej wrażliwe na działanie gibereliny aniżeli odcinki nie zawierające merystemów. Podobną zależność obserwowali Bojarkin i Dmitriewa (1959), także odnośnie reakcji liści na ten preparat.

Spostrzeżenia te dały podstawę Bojarkinowi i Dimitriewie (1959) do opracowania nowego zmodyfikowanego testu liściowego na giberelinę, w którym roślinę testową stanowią młode siewki kukurydzy o przebitych koleoptylach. Siewki takie ucina się powyżej i poniżej węzła tak, że uzyskane w ten sposób odcinki mają zarówno część koleoptyla z liściem, jak i górną część pierwszego międzywęzła. Odcinki te umieszcza się międzywęzłem do naczynek z badanym roztworem, a następnie mierzy się przyrost pierwszego liścia.

Metoda ta jest bardzo prosta, szybka i wymaga małej ilości roztworu tak, że mogłaby znaleźć zastosowanie w badaniach chromatograficznych i elektroforetycznych materiału roślinnego. Ważny przy tym jest fakt, że test ten reaguje na auksynę tylko w małym stopniu i to hamowaniem wzrostu. Czułość tej metody nie jest jednak duża, umożliwia bowiem ilościowe oznaczanie gibereliny w granicach stężeń od 0,2 do 1,0 $\mu\text{g/ml}$.

W badaniach chromatograficznych i elektroforetycznych materiału roślinnego chodzi jednak zwykle nie tylko o oznaczenie związków gibberelinopodobnych, ale także o rozdział poszczególnych regulatorów wzrostu, zwłaszcza związków indolowych, które określa się w tym przypadku głównie przy pomocy testu owsianego. Wydaje się więc bardziej celowe stosowanie testu owsianego także przy oznaczaniu gibereliny.

Konieczne jest również, z uwagi na znikome ilości związków gibberelinopodobnych, jakie uzyskuje się przy rozdziale chromatograficznym i elektroforetycznym substancji aktywnych zawartych w materiale roślinnym, podjęcie prób mających na celu zwiększenie czułości tego prostego testu biologicznego.

Dla osiągnięcia tego uzasadnione wydaje się zbadanie wpływu czynników środowiska zewnętrznego warunkujących reakcję rośliny na giberelinę oraz odpowiednie przygotowanie materiału testowego pozwalające na maksymalne zwiększenie jego czułości.

Przebadanie więc przydatności owsianego testu liściowego do ilościowego oznaczania gibereliny oraz ustalenie najbardziej optymalnych warunków wzrostu owsa, pozwalających na uzyskanie najwyższego stopnia czułości testu, było celem niniejszej pracy.

OPIS METODY OZNACZANIA GIBERELINY PRZY POMOCY TESTU PIERWSZEGO LIŚCIA OWSA

Test owsiany okazał się bardzo przydatny do ilościowego oznaczania gibereliny, a wyniki szeregu doświadczeń opisanych w dalszej części niniejszej pracy pozwoliły na osiągnięcie znacznej czułości rośliny na tę substancję wzrostową.

Szczegóły metody przedstawiają się następująco.

Materiał testowy uzyskuje się tu tak samo jak przy oznaczaniu auk-syny. Nasiona owsa odmiany „Zwycięzca“ (Svalöf), wyselekcjonowane uprzednio pod względem wielkości i moczone przez dwie godziny na świe-tle, wysiewa się do wilgotnych trocin i kiełkuje w ciemności w tempera-turze około 25°C, w atmosferze nasyconej parą wodną do około 95%. Po czterech dniach kiełkowania, gdy tylko koleoptyle zostaną przebite, ro-sliny pozostawia się przez 6 godzin w świetle dziennym, a następnie w tych samych warunkach świetlnych tnie się je na odcinki obejmujące fragment tkanki 20 mm nad i 5 mm pod węzłem. Istotne jest, aby wszyst-kie rośliny testowe użyte w doświadczeniu były dobrze wyrosnięte, zwłaszcza zaś, aby były w tej samej fazie wzrostu.

Odcinki zawierające dolną część koleoptyla z pierwszym liściem oraz górną część pierwszego międzywęźla umieszcza się międzywęźlem w ma-lutkich probówkach z $\frac{1}{2}$ —1 ml badanego roztworu. Do każdej probówki wkłada się po 12 takich odcinków. Roztwory przygotowuje się na 2% glu-kozie.

Inkubację prowadzi się w ciemności, w temperaturze 30°C przez okres doby, a następnie mierzy się przyrost pierwszego liścia. Przyrost określa się na podstawie pomiaru 10 odcinków z każdej probówki odrzucając po 2 odcinki skrajnej wielkości najbardziej odbiegające od średniej. Ce-lem uzyskania bardziej miarodajnych danych, doświadczenie wykonuje się w dwu powtórzeniach, uzyskując ostateczny wynik na podstawie 20 po-miarów.

Ryc. 1. Wzrost pierwszego liścia owsa w zależności od stężenia kwasu giberelinowego; linia ciągła — różnice istotne; linia przerywana — różnice nieistotne

The growth of the first oat leaf in relation to the concentration of gibberellic acid; the continuous line — significant differences; the broken line — lack of significant differences

Tabela 1 — Table 1

Wzrost pierwszego liścia owsa w zależności od stężenia kwasu giberelinowego

The growth of the first oat leaf in relation to the concentration of gibberellic acid

Przyrost liścia w: Growth in- crease of leaf in:		Stężenie GA w $\mu\text{g/ml}$ — GA concentration in $\mu\text{g/ml}$											
		0	0,0001	0,0005	0,001	0,005	0,01	0,05	0,1	0,5	1,0	5,0	10,0
mm		13,07	13,86	13,98	14,52	15,47	17,05	22,42	23,62	24,87	26,07	26,25	25,80
%		100	106,04	106,96	111,09	118,36	130,45	171,53	180,71	190,28	199,46	200,84	197,39

Najmniejsza różnica udowodniona — The least signif. differ.:

 $P_{0,1} = 0,783$ $P_{0,05} = 0,933$ $P_{0,01} = 1,127$

Przykładowe wyniki z doświadczeń nad zależnością wzrostu pierwszego liścia owsa od stężenia kwasu giberelinowego (Kyowa Fermentation Industry Co., LTD. Tokio) uzyskane przy pomocy wyżej opisanej metody zebrane są w tabeli 1 i przedstawione graficznie na wykresie ryc. 1.

Dane te wskazują, że test reaguje już na kwas giberelinowy w stężeniu 0,0001 $\mu\text{g/ml}$, jednak różnica w stosunku do kontroli istotna jest w tym przypadku dopiero przy $P=0,1$, tj. przy dopuszczalnym błędzie $=10\%$.

Najniższe stężenie gibereliny, przy którym ujawnia się różnica istotna przy $P=0,05$ wynosi tu 0,001 $\mu\text{g/ml}$.

Istotne różnice przy $P=0,05$ występują także pomiędzy wariantami różniącymi się pięciokrotnym stężeniem gibereliny. Tylko w przedziałach stężeń od 0,01 do 0,05 $\mu\text{g/ml}$ dadzą się ujawnić różnice mniejsze.

Widzimy także, że w miarę wzrostu stężenia kwasu giberelinowego przyrost liści zwiększa się, osiągając maksymalną wartość w roztworze o stężeniu 1,0—5,0 $\mu\text{g/ml}$; w wyższych stężeniach przyrost ten maleje.

Wyżej opisana metoda pozwala zatem na ilościowe oznaczanie gibereliny w granicach stężeń od 0,001 do 1 $\mu\text{g/ml}$, co stawia ją w rzędzie najbardziej czułych metod określania tej substancji wzrostowej.

WPLYW AUKSYNY NA WZROST PIERWSZEGO LIŚCIA OWSA

Wśród naturalnych regulatorów wzrostu roślin, obok związków gibberinopodobnych, występuje przede wszystkim auksyna — kwas indoliloctowy i jego pochodne. Istotne jest więc stwierdzenie, czy i w jakim stopniu test na giberelinę reaguje na auksynę.

Tabela 2 — Table 2

Wpływ auksyn na wzrost pierwszego liścia owsa
The effect of auxin on the growth of the first oat leaf

Stężenie IAA w $\mu\text{g/ml}$ — IAA concentration in $\mu\text{g/ml}$						
	0	0,001	0,01	0,1	1,0	10,0
Przyrost liścia w mm	12,45	13,10	12,30	11,80	11,05	11,00
Growth increase of leaf in mm						

Najmniejsza różnica udowodniona. — The least signif. differ.: $P_{0,1} = 0,914$

$P_{0,05} = 1,095$

$P_{0,01} = 1,460$

Wyniki specjalnego doświadczenia z kwasem indoliloctowym, wykonanego ściśle według metody opisanej w poprzednim rozdziale, zebrane są w tabeli 2. Wskazują one, że substancja ta wywiera tylko bardzo nieznaczny wpływ hamujący na test liściowy, obniżając w sposób istotny przyrost pierwszego liścia dopiero w stężeniu 1,0 $\mu\text{g/ml}$.

CZYNNIKI WPLYWAJĄCE NA EFEKTYWNOŚĆ TESTU PIERWSZEGO LIŚCIA OWSA

1. Wielkość odcinków i ilość roztworu

Jak wynika z literatury cytowanej we wstępie, odcinki rośliny tym silniej reagują na giberelinę, im bliższe jest ich położenie w stosunku do merystemu. Zależność tę badano również w niniejszej pracy.

Stwierdzono, że wielkość pierwszego międzywęźla nie ma istotnego wpływu na reakcję rośliny. Istotny wpływ ma natomiast początkowa długość pierwszego liścia (tab. 3). Im odcinki te są krótsze, tym efekt działania gibereliny jest wyższy. Przy bardzo krótkich odcinkach obserwuje się jednak zbyt dużą zmienność w przyroście poszczególnych odcinków w obrębie wariantów. Wielkość odcinków pierwszego liścia nie ma jednak wpływu na granicę czułości testu.

Tabela 3 — Table 3

Wpływ kwasu giberelinowego na wzrost pierwszego liścia owsa w zależności od jego długości początkowej

The effect of gibberellic acid on the growth of the first oat leaf in relation to its initial length

Stężenie GA w µg/ml GA Concentration in µg/ml	Przyrost liścia w Growth increase of leaf in		Długość początkowa w mm Initial length in mm					
			10		20		30	
			mm	%	mm	%	mm	%
0			8,11	100	13,01	100	17,83	100
0,001			10,16	125,27	14,62	112,37	19,03	106,73
0,01			13,76	169,66	16,94	130,20	21,26	119,23
0,1			16,87	208,01	21,37	164,25	26,34	147,72
Najmn. różn. udowod. The least signif. differ. P = 0,05			2,107	—	1,584	—	1,187	—

Wykazano dalej brak istotnej różnicy w reakcji roślin testowych w zależności od ilości roztworu. Bez znaczenia okazał się również poziom zanieczyszczenia odcinków.

W wyniku tych doświadczeń ustalono, że najbardziej odpowiednie są odcinki uzyskane przez ucięcie kielka 20 mm powyżej i 5 mm poniżej węzła (oddzielającego koleoptyl od pierwszego międzywęźla), a ilość roztworu ustalono na $\frac{1}{2}$ —1 ml.

2. Zawartość cukru w roztworze

Jak wynika z danych z literatury, 2% sacharoza (Nitsch i Nitsch 1956) i 2% glukoza (Wilczyńska 1958) wzmagają czułość testów na auksynę. Stwierdzono także dodatni wpływ sacharozy na efektywność działania gibereliny (Hayashi i Murakami 1957, Purves i Hillman 1959).

Tabela 4 — Table 4

Wpływ kwasu giberelinowego na wzrost pierwszego liścia owsa w zależności od zawartości cukru w roztworze
The effect of gibberellic acid on the growth of the first oat leaf in relation to the sugar content in the solution

Stężenie GA w $\mu\text{g/ml}$ GA concentration in $\mu\text{g/ml}$	Przyrost liścia w Growth increase of leaf in	Warianty Variants						Najmn. róż- nica udowod. The least signif. differ. P = 0,05
		bez cukru without sugar		2% glukoza 2% glucose		2% sacharoza 2% saccharose		
		mm	%	mm	%	mm	%	
0		13,07	100	13,29	100	13,47	100	1,027
0,001		13,96	106,80	15,38	115,72	14,92	110,76	1,004
0,01		15,92	121,80	17,31	130,24	17,84	132,44	1,285
0,1		20,39	156,00	23,77	178,85	23,60	175,20	1,625

Fakty te znajdują również potwierdzenie w wynikach niniejszej pracy (tab. 4). Wskazują one, że cukier wzmagą efekt, jaki wywiera giberelina na test pierwszego liścia owsa. Rezultaty, jakie uzyskano przy zastosowaniu 2% glukozy i 2% sacharozy, są zasadniczo podobne.

3. Temperatura

Efekt wzrostowy wywołany działaniem regulatorów wzrostu zależy w znacznej mierze od temperatury (Audus 1959). Czynniki te wpływają również na efektywność działania gibereliny. Wskazują na to Hayashi i Murakami (1957) oraz Neely i Phinney (1957), którzy stwierdzili, że w temperaturze 30°C giberelina stymulowała wzrost w większym stopniu aniżeli w temperaturze pokojowej. Temperatura 30°C okazała się także bardziej odpowiednia dla wywołania silniejszej reakcji wzrostowej odcinków pierwszego liścia owsa przy teście na giberelinę opisanym w niniejszej pracy (tab. 5).

Tabela 5—Table 5

Wpływ kwasu giberelinowego na wzrost pierwszego liścia owsa w zależności od temperatury inkubacji odcinków -

The effect of gibberellic acid on the growth of the first oat leaf in relation to the temperature of incubation of sections

Stężenie GA w $\mu\text{g/ml}$ GA concentration in $\mu\text{g/ml}$	Przyrost liścia w Growth increase of leaf in	Temperatura Temperature			
		20°C		30°C	
		mm	%	mm	%
0		7,16	100	13,35	100
0,001		7,70	107,54	15,40	115,35
0,01		8,79	122,76	16,80	125,84
0,1		9,58	133,79	20,33	152,28

4. Wiek kielków i okres trwania inkubacji odcinków

Reakcja rośliny na regulatory wzrostu zależy niewątpliwie od wieku i fazy rozwoju rośliny (A u d u s 1959).

Tabela 6—Table 6

Wpływ kwasu giberelinowego na wzrost pierwszego liścia owsa w zależności od wieku i fazy wzrostu kielków

The effect of gibberellic acid on the growth of the first oat leaf in relation to the age and the growth phase of shoots

Stężenie GA w $\mu\text{g/ml}$ GA concentration in $\mu\text{g/ml}$	Przyrost liścia w Growth increase of leaf in	Wiek kielków w dniach The age of shoots in days					
		3		4		5	
		Koleoptyl nie przebitý non-perforated coleoptile		Koleoptyl ledwie przebitý hardly perforated coleoptile		Koleoptyl w dzień po przebicciu coleoptile one day after perforation	
		mm	%	mm	%	mm	%
0		10,70	100	10,65	100	12,55	100
0,001		10,92	102,05	11,89	111,64	13,64	108,68
0,01		12,49	116,72	14,62	137,27	15,85	126,29
0,1		15,00	140,18	20,30	190,61	20,65	164,54
Najm. różnica udowodniona The least signific. differd.	P = 0,1	1,356	—	0,991	—	1,001	—
	P = 0,05	1,622	—	1,185	—	1,198	—

Dane zebrane w tabeli 6 wskazują, że przy oznaczaniu gibereliny testem pierwszego liścia owsa najbardziej przydatne są kielki o zaledwie przebitych koleoptylach. Fazę tę osiągają rośliny po czterech dniach hodowli w temperaturze około 25°C w komorze o 95% wilgotności względnej powietrza. Kielki młodsze i starsze słabiej reagują na tę substancję wzrostową.

W testach biologicznych ważne jest również ustalenie odpowiedniego okresu, po którym należy określać przyrost rośliny po zadziałaniu preparatem, aby uzyskać najbardziej wyraźne wyniki. W zależności od metody wprowadzania substancji i gatunku rośliny okres ten może być bardzo różny.

Tabela 7 — Table 7

Wpływ kwasu giberelinowego na wzrost pierwszego liścia owsa w zależności od długości okresu inkubacji odcinków

The effect of gibberellic acid on the growth of the first oat leaf in relation to the length of incubation period of sections

Stężenie GA w $\mu\text{g/ml}$ GA concentration in $\mu\text{g/ml}$	Przyrost liścia w Growth increase of leaf in		Okres inkubacji w godz Incubation period in hrs.					
			24		48		72	
	mm	%	mm	%	mm	%	mm	%
0	13,35	100	31,00	100	38,05	100		
0,001	15,40	115,35	33,27	107,32	40,35	106,04		
0,01	16,80	125,84	38,35	123,70	46,20	121,41		
0,1	20,33	152,28	43,50	140,32	52,30	137,45		

Wyniki specjalnego doświadczenia przedstawione na tabeli 7 wskazują, że w przypadku testu pierwszego liścia owsa, najwyraźniejszy efekt wzrostowy osiąga się po 24 godzinach inkubacji odcinków. Krótszych okresów czasu nie uwzględniano, z uwagi na konieczność objęcia doświadczeniem całego cyklu dobowego rytmu wzrostu (B ü n n i n g 1953).

5. Wiek nasion

Jak wynika z pracy T y c e (1957) pochwarki liściowe wyrosłe z nasion starszych są mniej czułe na kwas indoliloctowy aniżeli rośliny wyrosłe z nasion pochodzących z wcześniejszego zbioru.

Tabela 8 — Table 8

Wpływ kwasu giberelinowego na wzrost pierwszego liścia owsa w zależności od wieku nasion.
(Dośw. wykonano w październiku 1960 r.)

The effect of gibberellic acid on the growth of the first oat leaf in relation to the age of seeds
(Experiment period — October 1960)

Przyrost liścia w Growth increase of leaf in Stężenie GA w $\mu\text{g/ml}$ GA concent- ration in $\mu\text{g/ml}$	Rok zbioru nasion The year of harvesting					
	1957		1958		1959	
	mm	%	mm	%	mm	%
0	14,03	100	14,00	100	11,94	100
0,001	15,10	107,62	15,30	109,28	13,33	111,64
0,01	15,21	108,41	16,26	116,14	15,41	129,06
0,1	23,05	164,29	21,36	152,57	23,44	196,31
1	26,21	186,81	26,63	190,21	27,33	228,89
Najmn. różn. udowod.	P = 0,1		1,103 —		1,206 —	
The least sig- nific. differ.	P = 0,05		1,319 —		1,442 —	
	1,319 —		1,442 —		1,199 —	

Zależność tę zbadano także w niniejszej pracy. Dane zebrane w tabeli 8 wskazują, że kielki owsa wyrosłe z nasion starszych reagują na giberelinę słabiej.

6. Odczyn roztworu

Pobieranie regulatorów wzrostu przez roślinę uzależnione jest w znacznym stopniu od odczynu środowiska. Hansen i Bucholtz (1952) oraz Hauser (1955) stwierdzili to odnośnie do kwasu 2,4-D, a wyniki nie opublikowanych dotychczas prac, prowadzonych w Zakładzie Fizjologii Roślin U.M.K., wykazały taką samą zależność w przypadku kwasu indoliloctowego.

Fakt różnej reakcji rośliny na substancje wzrostowe w zależności od odczynu środowiska brany jest pod uwagę w testach biologicznych na auksynę. Celem utrzymania najbardziej odpowiedniego pH roztworu stosuje się tu często bufory (Nitsch i Nitsch 1956).

W niniejszej pracy uwzględniono także to zagadnienie, badając wpływ pH roztworu na reakcję pierwszego liścia owsa na giberelinę. Jak widać z danych zebranych w tabeli 9, reakcja ta jest w dużym stopniu nie-

zależna od odczynu roztworu. Tylko w roztworze najbardziej kwaśnym (pH 1,7) i w mniejszym stopniu, w roztworze najbardziej zasadowym (pH 11,0) reakcja testu na giberelinę jest wyraźnie słabsza.

Wyniki doświadczenia tego wskazują więc, że stosowanie buforów w teście pierwszego liścia owsa na giberelinę jest niecelowe.

7. Światło

Szybkość wzrostu rośliny jest w znacznym stopniu uzależniona od światła. Są dane, które wskazują, że wpływa ono w znacznym stopniu na poziom i przemieszczanie się kwasu indoliloocetowego w roślinie. Wiadomo także, że światło może wywołać fotochemiczną inaktywację auksyn (Strebecko 1956).

Wiele autorów wykazało także współzależność w działaniu światła i gibereliny na wzrost rośliny (Curry i Wassink 1956, Lockhart 1956, 1958a, b). Konieczne wobec tego było przebadanie reakcji wzrostowej pierwszego liścia owsa na giberelinę, w zależności od warunków świetlnych, zarówno w okresie poprzedzającym zadziałanie preparatem, jak i w momencie jego działania.

Doświadczenie mające na celu wyjaśnienie tego zagadnienia prowadzono w luminostatach, na świetle białym zbliżonym składem do naturalnego, o intensywności promieniowania na wysokości roślin około $3500 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ (około 6000 lux).

Działanie światłem w okresie inkubacji odcinków nie wpływało w sposób istotny na reakcję testu na giberelinę. Wyraźny efekt wzrostowy zaobserwowano natomiast w przypadku naświetlania roślin, przed cięciem kielków.

Dane obrazujące tę zależność zebrane są w tabeli 10. Wskazują one, że naświetlanie roślin w okresie poprzedzającym cięcie potęguje działanie gibereliny, przy czym najlepszy efekt daje naświetlanie 6-godzinne. W wyniku tych doświadczeń stwierdzono dalej, że wszystkie prace związane z przygotowaniem testu pierwszego liścia mogą być wykonywane na świetle.

WNIOSKI

Opisano metodę ilościowego oznaczania gibereliny przy pomocy testu pierwszego liścia owsa. Wszystkie szczegóły metody opracowano na podstawie wyników specjalnych eksperymentów, w których zbadano wpływ czynników środowiska zewnętrznego warunkujących reakcję rośliny na giberelinę oraz określono sposób przygotowania materiału testowego, pozwalający na zwiększenie jego czułości.

Tabela 9 — Table 9

Wpływ kwasu giberelinowego na wzrost pierwszego liścia owsa w zależności od pH roztworu
 The effect of gibberellic acid on the growth of the first oat leaf in relation to solution pH

Stężenie GA w µg/ml GA concentration in µg/ml	Przyrost liścia w Growth increase of leaf in	pH roztworu pH of solution																			
		1,7		2,5		3,6		3,9		4,4		5,6		6,3		7,7		9,7		11,0	
		mm	%	mm	%	mm	%	mm	%	mm	%	mm	%	mm	%	mm	%	mm	%	mm	%
0		13,35	100	12,05	100	11,35	100	12,35	100	11,75	100	12,40	100	13,71	100	12,41	100	13,11	100	12,92	100
0,1		17,10	128,08	21,85	181,32	21,70	191,27	21,91	177,40	21,62	184,00	22,01	177,50	23,28	169,80	22,07	177,84	21,27	162,24	20,31	157,19

pH 1,7 — 4,4 — uzyskano przez dodanie HCl (obtained by adding HCl).

pH 6,3 — 11,0 — uzyskano przez dodanie NaOH (obtained by adding NaOH).

pH roztworu 2% glukozy — 5,6 (pH of 2% glucose — 5,6).

Tabela 10 — Table 10

Wpływ kwasu giberelinowego na wzrost pierwszego liścia owsa w zależności od warunków świetlnych podczas hodowli kielków

The effect of gibberellie acid on the growth of the first oat leaf in relation to the light conditions during the growth of shoots

Przyrost liścia w Growth increase of leaf in Stężenie GA w $\mu\text{g/ml}$ GA concent- ration in $\mu\text{g/ml}$	Czas naświetlania kielków bezpośrednio przed cięciem w godz. The time of lighting of shoots immediately before the cutting, in hrs.													
	0		1		3		6		12		24		48	
	mm	%	mm	%	mm	%	mm	%	mm	%	mm	%	mm	%
0	15,95	100	15,62	100	14,37	100	13,09	100	13,01	100	12,81	100	11,27	100
0,001	16,55	103,76	16,51	105,69	15,55	108,21	14,55	111,09	14,58	112,17	13,48	105,23	11,29	100,17
0,01	19,32	121,12	18,80	120,35	18,17	126,44	17,10	130,45	16,55	127,20	15,95	124,51	14,10	125,11
0,1	24,97	156,55	23,56	150,83	24,11	167,78	23,85	180,71	22,93	176,24	21,16	165,18	18,51	164,24
1,0	27,55	172,72	27,04	173,11	27,28	189,83	25,95	198,24	24,65	189,46	22,83	178,22	19,18	170,18

Przedstawiona w niniejszej pracy metoda pozwala na ilościowe oznaczanie gibereliny w granicach stężeń od 0,001 do 1,0 $\mu\text{g/ml}$, co stawia ją w rzędzie najbardziej czułych metod określania tych substancji wzrostowych. Metoda ta jest przy tym bardzo prosta, szybka i może znaleźć zastosowanie w badaniach chromatograficznych i elektroforetycznych materiału roślinnego. Służyć może także jako bardzo prosty i wygodny test w doświadczeniach fizjologicznych nad współzależnością różnych czynników i gibereliny we wzroście rośliny.

*Zakład Fizjologii Roślin
Uniwersytetu M. Kopernika
w Toruniu*

(Wpłynęło dn. 14.4.1961.)

SUMMARY

A quantitative method of gibberellic acid determination with the first oat leaf is described. All details of the method are based on the results of special experiments. In these experiments the effect of several factors influencing oat leaf sensitivity to gibberellin was investigated namely that of the shoots and seeds age, the sections length, the solutions quantity and its pH, sugar addition, light, the period of incubation of the sections and of temperature conditions.

The details of the method are as follows.

The plant material is obtained in the same way as in the method of auxin determination. The same size oat seeds of Victory variety (Svalöv) soaked in water for 2 hours, in daylight, are sowed in wet sawdust. They are germinated in darkness at about 25°C and at about 95 p.c. air humidity. After 4 days of germination, as soon as the coleoptiles are just pierced, the plants are set for 6 hours in daylight and immediately after they are cut into sections containing parts 20 mm above and 5 mm below the node. All test plants should be in the same growth phase and well developed.

The sections containing the part of coleoptile with the first oat leaf and part of the first internode are put into small test-tubes with $\frac{1}{2}$ —1 ml of determined solutions. The gibberellic solutions are prepared in 2 p.c. glucose. Twelve such sections are put into every test-tube with their basal part down.

The incubation of sections lasts 24 hours at 30°C. After this period the elongation of the first leaf is measured. For the measurement only 10 most typical sections from every test-tube are taken.

In order to make the results more reliable, experiments are repeated twice. In this way definitive results of 20 measurements of sections in every variant are obtained.

The results of gibberellic acid quantity determination obtained by using the method described above are illustrated in the table and in figure 1.

The outcome of the present investigations show a very high sensitivity of first oat leaf test to gibberellin. This test allows to determine gibberellic acid in concentration of 0.001 $\mu\text{g/ml}$ assuming the significant differences at $P = 0.05$ or even in a concentration of 0.0001, at $P = 0.1$. (Details in the table and in figure 1).

The oat leaf test is not sensitive to IAA. The inhibitory effect appears only in high concentration, starting from 1.0 μg IAA in ml. (Tab. 2).

The biological test for gibberellic acid presented in this paper is very sensitive, simple, quick and can be used in chromatographic and electrophoretic study of plant material. It can be also used as a convenient and simple test in physiological experiments, especially in researches on the interactions of some factors and gibberellin in plant growth.

Department of Plant Physiology
Copernicus University, Toruń
Poland

LITERATURA

- Audus L. J., 1959, Plant growth substances, L. Hill Lim., London.
- Aytoun R. S. C., Dunn A. T., Seiler D. A. L., 1959, A biological assay for gibberellic acid with rice seedlings, *The Analyst*. 84: 216—221.
- Bojarkin A. N., Dmitriewa M. I., 1959, Biologiczeskaja proba na gibberelliny, *Fizjol. rast.* 6: 741—747.
- Brian P. W., Hemming H. G., 1958, Complementary action of gibberellic acid and auxin in pea internode extension, *Ann. Bot.* 22: 1—17.
- Bünning E., 1953, *Entwicklung und Bewegungsphysiologie der Pflanze. Lehrbuch der Pflanzenphysiologie*, 3. Aufl., Springer, Berlin.
- Corcoran M. R., Phinney B. O., 1958, An inhibitor of gibberellin induced growth, *Plant Physiol.* 33, suppl.: 40.
- Curry G. M., Wassink E. C., 1956, Photoperiodic and formative effects of various wavelength regions in *Hyoscyamus niger* as influenced by gibberellic acid, *Meded. Landbouwhogeschool, Wageningen* 56 (14): 1—8.
- Galun E., 1959, The cucumber tendril — a new test organ for gibberellic acid. *Experientia* 15: 184—185.
- Hansen J. R., Bucholtz K. P., 1952, Absorbtion of 2,4-D by corn and pea seeds, *Agron. Journ.* 44: 493—496.
- Harada H., Nitsch I. P., 1959, Changes in endogenous growth substances during flower development, *Plant Physiol.* 34: 409—415.
- Hauser E. W., 1955, Absorbtion of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid by soybean and corn plants, *Agron. Journ.* 47: 32—36.
- Hayashi T., Murakami Y., 1954, Biochemistry of the bakane fungus. XXX. The physiological action of gibberellin (6). The effect of gibberellin on straight growth of isolated sections of cereal coleoptiles, *J. Agric. Chem. Soc. Japan* 27. 675—680 (wg Briana P. W., 1959, *Biolog. Rev.* 34: 37—84).
- Hayashi T., Murakami Y., 1957, Badania nad fizjologicznym wpływem gibereliny; *Bull. Nat. Inst. Agric. Sci. Ser.* 1958 D, Nr 7: 159—197 (po japońsku — wg Refer. *Żurn.* 1959, 15: 138).
- Henderson J. H. M., Graham H. D., 1960, Correlation of chemical and bioassay determination for gibberellic acid, *Plant Physiol.* 35 suppl.: 34.
- Kavanagh F., Kuzel N. R., 1958, Fluorometric determination of gibberellic and gibberellenic acids in fermentation products, commercial formulations, and purified materials, *Agric. a. Food Chemistry* 6: 459—463.

- Kawarada A., Sumiki Y., 1959, The occurrence of gibberellin A₁ in water sprouts of citrus, Bull. Agric. Chem. Soc. Japan 23: 343—344 (wg Refer. Žurn. 1960, 24: 119).
- Kribben F. J., 1957, Gibberellinsäure und Blattwachstum. Naturwiss. 44: 429.
- Kuraishi S., Hashimoto T., 1957, Promotion of leaf growth and acceleration of stem elongation by gibberellin, Bot. Mag. Tokyo 70: 86—92. (Wg Briana P. W. Biolog. Rev. 34: 37—84).
- Lockhart J. A., 1956, The effect of light and the gibberellins on stem elongation in dwarf and normal pea seedlings, Plant Physiol. 31, suppl.: 12.
- Lockhart J. A., 1958a, The response of various species of higher plants to light and gibberellic acid. Physiol. Plant. 11: 478—486.
- Lockhart J. A., 1958b, The influence of red and far red radiation on the response of *Phaseolus vulgaris* to gibberellic acid, Physiol. Plant. 11: 487—492.
- MacComb A. J., Carr D. J., 1958, Evidence from a dwarf pea bioassay for naturally occurring gibberellins in the growing plant, Nature 181: 1548—1549.
- MacMillan J., Suter P. J., 1958, The occurrence of gibberellin A₁ in higher plants: isolation from the seed of runner bean (*Phaseolus multiflorus*), Naturwiss. 45: 46.
- Murakami Y., 1957, The effect of extract of immature bean seeds on the growth of coleoptile and leaf of rice plant, Bot. Mag. Tokyo 70: 376—382 (wg Refer. Žurn. 1959, 11: 145).
- Neely P. M., Phinney B. D., 1957, The use of the mutant dwarf — 1 of maize as quantitative bioassay for gibberellin activity, Plant Physiol. 32, suppl.: 31.
- Nickell L. G., 1958, Production of gibberellin-like substances by plant tissue cultures, Science 128: 88—89.
- Nitsch J. P., Nitsch C., 1956, Studies on the growth of coleoptile and first internode section. A new sensitive, straight-growth test for auxins. Plant Physiol. 31: 94—111.
- Overbeek J., Racusen D. W., Tagamii M., Hughes W. I., 1957, Simultaneous analysis of auxin and gibberellin, Plant Physiol. 32, suppl.: 32.
- Phinney B. O., Neely P. M., 1958, Differential biological properties of gibberellin-like factors isolated from beans and peas, Plant Physiol. 32, suppl.: 38.
- Purves W. K., Hillman W. S., 1958, Response of pea stem sections to indoleacetic acid, gibberellic acid and sucrose as affected by length and distance from apex, Physiol. Plant. 11: 29—35.
- Purves W. K., Hillman W. S., 1959, Experimental separation of gibberellin and auxin actions in etiolated pea epicotyl sections, Physiol. Plant. 12: 786—798.
- Radley M., 1956, Occurrence of substances similar to gibberellic acid in higher plants, Nature 178: 1070—1071.
- Radley M., 1958, The distribution of substances similar to gibberellic acid in higher plants, Ann. Bot. 22: 297—307.
- Ritzel M. B., 1957, The distribution and time of occurrence of gibberellin — like substances from flowering plants, Plant Physiol. 32, suppl.: 31.
- Scott R. A. Jr., Liverman J. L., 1957, Control of etiolated bean leaf-disk expansion by gibberellins and adenine, Science 126: 122—123.
- Simpson G. M., 1958, Colorimetric test for gibberellic acid and evidence from a dwarf pea assay for the occurrence of a gibberellin — like substance in wheat seedlings, Nature 182: 528—529.
- Strebeyko P., 1956, Woda i światło w życiu rośliny, PWN, Warszawa.

- Tyce G. M., 1957, The growth of segments of *Avena* coleoptiles in distilled water and in IAA during different months of the year, *Ann. Bot.* 21: 461—464.
- Vlitos A. J., Meudt W., 1957, Relationship between shoot apex and effect of gibberellic acid on elongation of pea stems, *Nature* 180: 284.
- West C. A., Murashige K. H., 1958, The isolation of gibberellin A₁ from beans and chemical properties of other gibberellin-like factors from beans and peas, *Plant. Physiol.* 33, suppl.: 38.
- Wilczyńska K., 1959, Nowa uproszczona metoda biotestu wygięciowego "Avena curvature test" F. W. Went: "Coleoptile — hypocotile test", *Acta Soc. Bot. Pol.* 28: 111—128.