Test biologiczny do wykrywania biologicznie czynnych giberelin na chromatogramach

Biological test for detecting biologically active gibberellins in chromatograms

A. ADAMIEC, L. PAŚŚ, P. WIERZCHOWSKI

WSTĘP

W piśmiennictwie podano szereg testów biologicznych do wykrywania substancji biologicznie czynnych, a w szczególności giberelin, na chromatogramach. W wielu wypadkach metody te są trudne do zaadoptowania, ze względu na stosowanie w nich specyficznych warunków doświadczenia, oraz użycie specjalnych gatunków i odmian roślin. Poza tym są one niejednokrotnie zbyt pracochłonne i długotrwałe, a pod względem statystycznym mało pewne.

Y. Murakami (1957) stosował młode siewki ryżu, które kładł na odcinkach bibuły chromatograficznej umieszczonej na dnie zlewki. Siewki naświetlał światłem dziennym i po siedmiu dniach mierzył przyrosty długości drugiego liścia w stosunku do roślin kontrolnych. B. O. Phinney (1957) sporządzał wyciągi acetonowe z poszczególnych odcinków bibuły chromatograficznej. Pozostałość po odparowaniu acetonu rozpuszczał w minimalnej ilości wody z dodatkiem detergentu i nakraplał na wierzchołki liści mutantu kukurydzy Dwarf-1, wrażliwego wyłącznie na gibereliny. G. M. Simpson (1958) nakraplała wyciągi acetonowe (10% wodny aceton) z odcinków chromatogramu na siewki grochu karłowego odmiany Meteor. M. Radley (1958) umieszczała na zwilżonych wodą, pociętych odcinkach chromatogramu, 4-milimetrowej długości skrawki koleoptyli 4-dniowych siewek pszenicy odmiany Victor. Po 48-godzinnej inkubacji w wilgotnej kamerze przy temperaturze 23°C mierzyła liniowy przyrost skrawków.

W poszukiwaniu odpowiednich roślin testowych do wykrywania substancji giberelinowych przebadaliśmy wiele gatunków i odmian roślin łatwo dostępnych w Polsce. Do testów seryjnych wybraliśmy młode siewki sałaty inspektowej, które nadają się doskonale do tego celu, gdyż

na małej przestrzeni można umieścić stosunkowo wiele roślin, co pozwala na statystyczne ujęcie końcowych wyników. W piśmiennictwie spotkać można również prace, w których do testów biologicznych używano siewek sałaty (J. Krekule (1959), B. Frankland (1960).

W pracach tych nie podano jednak jak zachowują się pod wpływem giberelin różne odmiany sałaty oraz różne serie należące do tej samej odmiany sałaty. Jak wykazano (L. Paśś, A. Adamiec) różne odmiany zachowują się w tych samych warunkach doświadczalnych w sposób zasadniczo różny. Wszystkie odmiany sałaty są wprawdzie wrażliwe na gibereliny, lecz przyrosty liniowe hypokotyli oraz całych pędów są dla poszczególnych odmian bardziej lub mniej zróżnicowane. Najlepsze właściwości wzrostowe pod wpływem giberelin wykazują siewki sałaty odmiany Królowa Majowych. Optimum jednorazowego zadziałania giberelin na siewki sałaty tej odmiany uwidacznia się w trzecim dniu doświadczenia. Liniowe przyrosty hypokotyli lub całych pędów są stosunkowo duże. Siewki pod wpływem optymalnych stężeń niektórych giberelin osiągają wzrost dwa a nawet trzykrotnie większy niż rośliny kontrolne. Stosowanie siewek sałaty tej odmiany daje dobre wyniki przy wykrywaniu, a nawet ilościowym oznaczaniu giberelin na chromatogramach, z których można je wyeluować i dodać do podłoża w postaci roztworu wodnego, niskoprocentowego roztworu alkoholowego lub acetonowego. Sporządzanie wyciągów alkoholowych lub acetonowych z każdego odcinka bibuły jest jednak bardzo pracochłonne, a poza tym przy takim postępowaniu nie daje się uniknąć strat, zwłaszcza wtedy, gdy substancje giberelinowe obecne są w ilościach śladowych. Postawiono więc odpowiednie doświadczenia mające na celu wyjaśnienie, czy istnieje możliwość wykrycia, przy pomocy testu sałatowego, substancji giberelinowych bezpośrednio na odcinkach rozwiniętego chromatogramu bez ich uprzedniego wyeluowania rozpuszczalnikami organicznymi. Poza tym należało sprawdzić, w jakiej mierze rozpuszczalniki, zawarte w wysuszonym na powietrzu chromatogramie, mogą wpływać na wzrost siewek sałaty w warunkach doświadczenia oraz ustalić optymalne warunki prowadzenia testu i czasu trwania doświadczenia.

CZEŚĆ DOŚWIADCZALNA

Materiały

Roślina testowa

Do testów używano nasion sałaty inspektowej odmiany Królowa Majowych. Część nasion otrzymano z laboratorium Centrali Nasiennictwa Ogrodniczego i Szkółkarstwa w Warszawie, część natomiast za-

kupiono w sklepach nasiennych. Siła kiełkowania u wszystkich nasion była dodatkowo sprawdzona we własnym zakresie.

Preparaty giberelinowe

Stosowane preparaty giberelinowe były produkowane przez Kutnowskie Zakłady Farmaceutyczne w Kutnie. Częściowo używano preparatów otrzymanych drogą fermentacji laboratoryjnych przy pomocy hodowli trzęsawkowej. Preparaty składały się z około 90% kwasu giberelowego, oraz z około 10% innych składników giberelinowych. Temperatura topnienia preparatu wynosiła 225—230°C, skręcalność właściwa $[\alpha]_D^{20} + 86^\circ$.

Bufor

Siewki sałaty hodowano na 0,02 M buforze fosforanowym o pH 6,5. Bufor przygotowano przez rozpuszczenie dwuzasadowego fosforanu potasu w wodzie destylowanej i doprowadzenie pH do wartości 6,5 przy pomocy kilku kropli 85% kwasu o-fosforowego. Używano odczynników czystych do analizy produkcji krajowej.

Źródło oświetlenia

Do naświetlania roślin używano świetlówek „Telam”, wyprodukowanych przez Zakłady Wytwórcze Lamp Elektrycznych im. Róży Luksemburg w Warszawie. Lampy posiadały moc 40 watt. W większości wypadków stosowano lampy dające światło dzienne. Lampy te mogą być również zastąpione świetlówkami dającymi światło barwy białej.

Chromatografia bibułowa

Rozdział giberelin przeprowadzono przy pomocy chromatografii bibułowej zstępującej w komorach szklanych, na bibule Whatmann Nr 1. Do rozwijania chromatogramów używano dwóch solwentów:

Solwent pierwszy — podany przez M. L. Birda i C. T. Puga (1958), składał się z benzenu, kwasu octowego i wody w stosunku 10:2,5:5. Komorę nasycano przez noc dolną fazą tego rozpuszczalnika. Przed rozwinięciem, chromatogram umieszczano w komorze na okres pół godziny, następnie do zbiornika wlewno fazę górną i chromatogram rozwijano oryginalną metodą przepływową przez 48 lub 72 godziny.

Solwent drugi, był solwentem własnym. Sporządzono go w następujący sposób: dokładnie wstrząsano toluen, kwas octowy i wodę zmieszane w stosunku 9:1:10. Po rozwarstwieniu mieszaniny dolną fazę używano do nasycania komory, natomiast do 100 ml fazy górnej dodano 65 ml kwasu octowego lodowatego, oraz 165 ml wody destylowanej. Po ponownym wstrząsaniu i rozdzieleniu mieszaniny otrzymano fazę

górną, którą używano do rozwijania chromatogramu. Fazę dolną odrzucono. Chromatogram zawieszano na jedną godzinę w komorze nasyconej przez noc fazą dolną, a następnie rozwijano go przez trzy godziny fazą górną. Solwent ten porusza się szybko po bibule chromatograficznej i daje dobry rozdział giberelin. Gibereliny A_1 , A_2 , A_3 pozostają na miejscu startu, poruszają się natomiast giberelina A_4 oraz giberelina D podana przez H. Borrissa i S. Schmidta (1961).

Chromatogram, po rozwinięciu w jednym z wymienionych solwentów, suszono na powietrzu i rozdzielano na dwa paski. Pasek przewidziany do testu biologicznego suszono dodatkowo strumieniem zimnego powietrza przy pomocy fenu. Drugi pasek wywoływano przez spryskanie 5%-owym roztworem kwasu siarkowego w etanolu i podgrzanie w suszarce przy temperaturze 70–80°C przez 5 minut. Fluoryzujące plamy obserwowano pod analityczną lampą rtęciową, z filtrem przepuszczającym fale w zakresie 365 mμ.

Wykonanie testu biologicznego

Wysuszony chromatogram pocięto na poprzeczne paski o odpowiedniej szerokości. Paski ponumerowano i umieszczono na dnie zlewki o objętości 100 ml i rozmiarach 5,5×7,5 cm. W zlewce kontrolnej umieszczono pasek bibuły identycznych rozmiarów, zanurzony uprzednio w rozpuszczalniku, którym był rozwijany chromatogram i suszony w identycznych warunkach. Do każdej zlewki wiano 3 ml buforu fosforanowego i 2 ml wody wodociągowej. W roztworze zanurzono, równomiernie na całą przestrzeń dna, niewielką ilość waty, którą przykryto dopasowanym do średnicy zlewki krążkiem gazy. Gazę wraz z watą przyprasowano do dna przy pomocy płasko zakończonych bagietki, a na powierzchni gazy umieszczono siewki sałaty. Nasiona sałaty pozostawiono do kiełkowania na zwilżonej bibule ułożonej w dużej szalce Petriego, w temperaturze pokojowej i normalnych warunkach świetlnych, przez 48 godzin. Dwudniowe siewki poddano selekcji i po wybraniu w miarę możliwości równomiernie rozwiniętych siewek ułożono je, po 10 sztuk, w uprzednio przygotowanych zlewkach. Zlewki przykryto płytkami szklanymi lub szkiełkami zegarkowymi i umieszczono w świetle ciągłym, pod trzema świetłówkami dającymi światło dzienne lub białe o łącznej mocy 120 watt, w odległości 20 cm od lampy. Doświadczenie przeprowadzano w pomieszczeniu o średniej temperaturze 15°C. Okres doświadczenia trwał trzy dni. Po tym czasie rośliny wyjęto ze zlewki i zmierzono długość hypokotyli oraz całych pędów, odkładając odpowiednie odcinki tych roślin na papierze milimetrowym. Z każdych dziesięciu wartości obliczono wartość średnią.

Wyniki badań

W tabeli 1 podane są wyniki uzyskane po podaniu do podłoża różnych rozpuszczalników w zmiennych stężeniach. Dane cyfrowe wykazują, że wpływ badanych rozpuszczalników na rozwój siewek sałaty jest minimalny. Średni wzrost hypokotyli i całych pędów pokrywa się, w granicach rozrzutu statystycznego, ze średnim wzrostem roślin kontrolnych. Różnica w przyrostach pod wpływem samych rozpuszczalników jest znikoma w porównaniu z przyrostem liniowym tych części roślin pod wpływem preparatu giberelinowego.

Tabela 1 — Table 1

Wpływ rozpuszczalników organicznych na wzrost siewek sałaty inspektowej odmiany Królowa Majowych

The influence of organic solvents on the growth of lettuce seedlings
(hotbed variety Królowa Majowych)

Roz- pusz- czalnik Sol- vent	Stężenie procentowe rozpuszczalników organicznych w jednej zlewce* Concentration of the organic solvents in one dish*						Kontrola Control	
	2 10 ⁻¹		2 10 ⁻²		2 10 ⁻³			
	śr. długość av. length of		śr. długość av. length of		śr. długość av. length of		śr. długość av. length of	
	hypoko- tylu (cm) hypoco- tyle cm.	pędu (cm) shoot cm.	hypoko- tylu (cm) hypoco- tyle cm.	pędu (cm) shoot cm.	hypoko- tylu (cm) hypoco- tyle cm.	pędu (cm) shoot cm.	hypoko- tylu (cm) hypoco- tyle cm.	pędu (cm) shoot cm.
Butanol	0,80	1,60	0,80	1,60	0,85	1,60	0,85	1,60
Benzen	0,80	1,50	0,75	1,45	0,70	1,65	0,90	1,65
Toluen	0,75	1,50	0,80	1,60	0,90	1,60	0,90	1,60

* 0,2 ml poszczególnych, chemicznie czystych rozpuszczalników rozpuszczono w 100 ml roztworu, służącego jako podłoże dla siewek sałaty. Dwa dalsze stężenia uzyskano przez odpowiednio 10 i 100-krotne rozcieńczenie roztworu pierwszego. Przy wyższych stężeniach rozpuszczalniki nie rozpuszczają się w podłożu.

0.2 ml of different chemically pure solvents were dissolved in 100 ml of the medium on which lettuce was grown. Two other concentrations are 10 and 100 times diluted. In higher concentrations the solvents do not dissolve in the medium.

W tabeli 2 ujęte są wyniki doświadczenia, w którym badano zależność przyrostu liniowego hypokotyli i pędów od stężenia preparatu giberelinowego. Zależność tę przebadano w szerokim zakresie stężeń. Z danych cyfrowych podanych w rubrykach d oraz f wynika, że dla całych pędów istnieje szerszy zakres zależności liniowej przyrostów od logarytmu stężenia, niż dla samych hypokotyli. Różnica ta może być związana z nieco odmienną dynamiką rozwoju liści w porównaniu z rozwojem hypokotyli pod wpływem różnych stężeń giberelin. Optymalne stężenie giberelin wynosi około 5 µg/ml podłoża. Stężenie to zależy oczywiście od ilości siewek hodowanych na danym podłożu. Stężenia wyższe od optymalnego dają mniejsze przyrosty hypokotyli i pędów.

Tabela 2 — Table 2

Wpływ stężenia preparatu giberelinowego na wzrost hypokotyli i liści dwudniowych siewek sałaty inspektovej odmiany Królowa Majowych

The influence of gibberellin preparation on the growth of the hypocotyle and leaves of two-days old seedlings of lettuce hotbed variety Królowa Majowych

Stężenie giberelin ($\mu\text{g/ml}$ podłoża) The concentration of gibberellins $\mu\text{g/ml}$ of the medium	log stężenia log of the concentration	Pęd Shoot		Hypokotyl Hypocotyle		Liść Leaves		Wartość proporcji: l/h^{**} (cm) Ratio: l/h^{**} (cm)
		śr. długość (cm) mean length cm.	przyrost w stos. do kontroli (cm) increase in comparison with the control cm.	śr. długość (cm) mean length cm.	przyrost w stos. do kontroli (cm) increase in comparison with the control cm.	śr. długość (cm) mean length cm.	przyrost w stos. do kontroli (cm) increase in comparison with the control cm.	
a	b	c	d	e	f	g	h	i
kontrola control	—	2,12	—	1,18	—	0,94	—	0,79
0,05	1,3011	2,65	0,53	1,64	0,46	1,01	0,07	0,61
0,5	0,3011	3,01	0,89	1,98	1,98	1,03	0,09	0,52
5,0	0,6989	3,44	1,32	2,23	1,05	1,21	0,27	0,54
10,0	1,0000	3,14	1,02	2,02	0,84	1,12	0,18	0,55
15,0	1,1760	3,13	1,01	2,01	0,83	1,12	0,18	0,55
20,0	1,3010	3,05	0,94	2,00	0,82	1,06	0,12	0,54
25,0	1,3979	3,05	0,93	1,99	0,81	1,06	0,12	0,53
3	1,9771	2,92	0,80	1,87	0,65	1,05	0,15	0,56

* Pomiar przeprowadzono w trzecim dniu doświadczenia. Różnica we wzroście roślin w obrębie jednej zlewki jest stosunkowo mała. „Odchylenie przeciętne” (d) od wartości średniej ($\bar{x}$) (obliczone ze wzoru $d = \frac{2r}{n} (\bar{x}_{II} - \bar{x})$) waha się dla roślin dla całej serii zlewek od 0,004—0,025 cm.

The measurements were done in the third day of the experiment. The differences in one dish in the growth of the plants are relatively small. The mean deviation (d) from the average ($\bar{x}$) (calculated from the formula $d = \frac{2r}{n} (\bar{x}_{II} - \bar{x})$) range for the whole series of dishes from 0,004 to 0,025 cm.

** l/h proporcja liść/hypokotyl (ratio leaf/hypocotyl).

W miarę zwiększania stężenia giberelin przyrosty ustawicznie maleją.

W tabeli 3 podane są przyrosty hypokotyli i pędów siewek sałaty w zależności od czasu, przy stałym stężeniu giberelin 5 $\mu\text{g/ml}$ podłoża. Maksymalny przyrost liniowy hypokotyli i pędów występuje w trzecim dniu doświadczenia. W czwartym i piątym dniu zachodzi wyraźny spadek przyrostów, a rozpoczynając od piątego dnia doświadczenia spadek ten przebiega bardziej łagodnie. Zaznaczyć należy, że w rozpatrywanym okresie czasu liniowe rozmiary całych roślin, zarówno kontrolnych, jak i doświadczalnych, ustawicznie zwiększały się (rubryka b i e na tablicy 3). Końcowych pomiarów przyrostów w doświadczeniach seryj-

nych, dokonywano w trzecim dniu doświadczenia, w którym przyrosty są największe. Wartości liczbowe przyrostów hypokotyli i pędów nie są stałe. Zależą one od warunków nasświetlania, od temperatury w pomieszczeniu doświadczalnym, a także od serii nasion danej odmiany. Ogólny charakter krzywych przyrostów, oraz wzajemny stosunek między przyrostami hypokotyli i liści, pozostają jednak stałe. Przy badaniach jakościowych wahania w przyrostach pod wpływem wspomnianych czynników nie posiadają większego znaczenia.

Ryc. 1. Wzrost siewek sałaty inspektowej odmiany Królowa Majowych na odcinkach chromatogramu nr 1

Chromatogram preparatu giberelinowego, otrzymanego z brzeczki pochodzącej z fermentacji hodowli trzęsawkowej *Gibberella fujikuroi*. Rozwijano dwie równoległe próbki solwentem toluenowym. Po godzinnym nasyceniu chromatogramu w komorze z fazą dolną solwentu, rozwijano go fazą górną przez 3 godz. Chromatogram rozcięto na dwa oddzielne paski. Jeden pasek wywołało 5% roztworem kw. siarkowego w etanolu, drugiego używano do testu biologicznego.

The growth of the lettuce seedlings hotbed variety Królowa Majowych on chromatogram No. 1

Chromatogram of gibberelline preparation from the culture of *Gibberella fujikuroi*. Two parallel samples were developed in toluene solvent. After one hour saturation of the chromatogram with lower phase of the solvent it was unfold during 3 hours with upper phase. It was cut in two stripes. One was developed with 5% solution of sulphuric acid in ethanol and the second was used for biological test

Ryc. 2. Wzrost siewek sałaty inspektowej odmiany Królowa Majowych na odcinkach chromatogramu Nr 2

Chromatogram preparatu otrzymanego przez wyeluowanie odcinka Nr 14 chromatogramu Nr 1 (plama o R_f 0,93). Dwie równoległe próbki rozwijano w solwencie toluenowym. Po godzinnym nasyceniu chromatogramu w komorze z fazą dolną solwentu, rozwijano go fazą górną przez 3 godz. Chromatogram rozcięto na 2 paski. Jeden pasek wywoływało 5% roztworem kw. siarkowego w etanolu, drugiego używano do testu biologicznego.

The growth of the lettuce seedlings hotbed variety Królowa Majowych on chromatogram No. 2

The chromatogram was obtained by elution of the segment 14 of the chromatogram 1 (spot with R_f 0,93). Two parallel samples were unfold in toluene solvent. After one hour saturation in the lower phase of the solvent it was unfold during three hours in the upper phase of the solvent. The chromatogram was cut in two stripes. One stripes was developed with 5% solution of sulphuric acid in ethanol and the second was used for biological test

Na rysunku 1 przedstawiony jest jeden z typowych testów biologicznych przeprowadzony przy pomocy siewek sałaty, w celu wykrycia giberelin na chromatogramie nr 1. Na dnię ponumerowanych zlewek znajdowały się odpowiednio ponumerowane odcinki chromatogramu. Chromatogram ten rozwijano w solwencie toluenowym. Gibereliny rozwinięte na chromatogramie otrzymano z brzeczki pochodzącej z fermentacji hodowli trzęsawkowej grzyba *Giberella fujikuroi*. Średnie wartości wzrostu hypokotyli i pędów podane są w postaci słupków odpowiedniej wysokości obok chromatogramu na rysunku 1. Przy pomocy testu fluorescencyjnego na chromatogramie nr 1 wykryto trzy wyraźne plamy posiadające R_f odpowiednio 0,00, 0,35 i 0,51, oraz plamę o R_f 0,93 dającą bardzo słabą fluorescencję koloru niebieskiego. Wysokość słupków wzdłuż chromatogramu wskazuje jednak, że substancji tych jest więcej. Poza odcinkami 11 i 13, biologicznie aktywne substancje znaleźć można na wszystkich pozostałych odcinkach chromatogramu.

Różnica we wzroście sałaty w poszczególnych zlewkach nie jest spowodowana fluktuacją wzrostu siewek sałaty w danych warunkach. Wiadć to z danych przytoczonych na rysunku 2, przedstawiającym rechromatografię plamy o R_f 0,93 z chromatogramu nr 1. Wzrost siewek sałaty na odcinkach od nr 2 do nr 6 jest praktycznie jednakowy. Słaby wzrost wysokości sałaty zaczyna się na odcinkach nr 7 i nr 8. Maksymalny wzrost, jak tego należało oczekiwać, ma miejsce na odcinku nr 9. Z przyczyn nie wyjaśnionych nastąpił pewien przyrost na odcinku nr 1,

Ryc. 3. Wzrost siewek sałaty inspektowej odmiany Królowa Majowych na odcinkach chromatogramu nr 3

Dwie równoległe próbki krystalicznego preparatu giberelinowego rozwijano, na chromatogramie, w solwencie benzenowym o składzie podanym przez M. L. Birda i C. T. Pugh'a (1953). Po półgodzinnym nasycaniu w komorze z fazą dolną chromatogram rozwijano fazą górną solwentu metodą przepływową przez 72 godziny. Następnie chromatogram rozcięto na dwa paski. Jeden pasek wywołało 5% roztworem kwasu siarkowego w etanolu, a drugi używano do testu biologicznego

The growth of the lettuce seedlings hotbed variety Królowa Majowych on chromatogram No. 3

Two parallel samples of crystalline gibberelline preparation were unfold on chromatogram in benzene solvent after M. L. Bird and C. T. Pugh'a (1958). After half an hour saturation in the lower phase of the solvent the chromatogram was unfold with the upper phase of the solvent during 72 hours (flowing method). The chromatogram was cut in two stripes. One was developed with 5% solution of sulphuric acid in ethanol and the second was used for biological test

to jest na miejscu nałożenia preparatu o R_f 0,93, przed rozwinięciem chromatogramu. Zjawisko to powtórzyło się wielokrotnie i można przypuszczać, że aktywność na miejscu startu pochodzi od produktów izomeryzacji preparatu o R_f 0,93.

Table 3 — Table 3

Wzrost siewek sałaty inspektowej odmiany Królowa Majowych w zależności od czasu, po jednorazowej dawce preparatu giberelinowego (5 $\mu\text{g/ml}$ podłoża)

The growth of seedlings of the lettuce hotbed variety Królowa Majowych in dependence of time after one dose of gibberellin preparation (5 $\mu\text{g/mg}$ of the medium)

Czas (dni) Time (days)	Pęd — Shoot			Hypokotyl — Hypocotyle		
	śr. dług. rośliny traktowanej (cm)	śr. dług. rośliny kontrolnej (cm)	przyrost w stos. do kontroli (cm)	śr. dług. rośliny traktowanej (cm)	śr. dług. rośliny kontrolnej (cm)	przyrost w stos. do kontroli (cm)
	mean length of the treated plant	mean length of the control plant	Increase in comparison with the control	mean length of the treated plant	mean length of the control plant	increase in comparison with the control
	(cm)	(cm)	(cm)	(cm)	(cm)	(cm)
a	b	c	d	e	f	g
2	2,14	1,27	0,70	1,49	0,71	0,60
3	3,53	1,94	1,35	2,27	1,11	1,00
4	4,13	2,71	1,20	2,60	1,54	0,90
5	4,35	3,08	1,05	2,72	1,81	0,76
6	4,71	3,44	1,04	3,00	2,05	0,75
7	4,69	2,48	1,00	2,81	1,94	0,73
8	5,13	2,93	0,98	2,91	2,04	0,71

Na rysunku 3 przedstawiony jest chromatogram krystalicznego preparatu giberelinowego, który rozwinięto metodą przepływową w solwencie M. L. Birda i C. T. Pugh'a (1958), przez 72 godziny. Przy pomocy testu fluorescencyjnego wykryto na tym chromatogramie trzy plamy. Jedna, słabo fluoryzująca plama pozostała na miejscu startu, dwie natomiast odsunęły się na nieznaczną odległość od miejsca startu. Test biologiczny wykazał, że dwie z tych plam (odcinek nr 1 i nr 4) są nieaktywne. Występują natomiast trzy wyraźne strefy aktywności biologicznej na odcinkach nr 3, nr 5 i 6 oraz nr 13 chromatogramu. Wartości liczbowe rozmiarów liniowych roślin testowych hodowanych na tym chromatogramie podane są w tabeli 4. Tabela ta zawiera dwie dodatkowe rubryki: w jednej podane są średnie długości samych liści, otrzymane przez odjęcie długości hypokotyli od długości pędów, w drugiej stosunek średniej długości liści (l) do średniej długości hypokotyli (h).

Tabela 4 — Table 4

Wzrost siewek sałaty inspektowej odmiany Królowa Majowych na odcinkach chromatogramu nr 3
(patrz rysunek 3)

The growth of seedlings of the lettuce hotbed variety Królowa Majowych on the segments
of the chromatogram no. 3 (see fig. 3)

Nr odcinka chromatogramu No. of the chromatogram segment	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Śr. dł. pędu (cm) Mean shoot length (cm)	1,85	1,85	2,05	1,85	2,15	2,00	1,75	1,70	1,65	1,70	1,60	1,60	2,20	1,65
Śr. dł. hypokotyli (h) (cm) Mean hypocotyle length (cm)	0,95	0,95	1,20	0,90	1,20	1,10	0,90	0,80	0,85	0,80	0,80	0,80	1,00	0,80
Śr. dł. liścia (l) (cm) Mean leaves length (l) (cm)	0,90	0,92	0,85	0,95	0,95	0,90	0,85	0,85	0,85	0,85	0,80	0,80	1,30	0,85
l/h	0,95	0,97	0,71	0,75	0,79	0,82	0,95	1,00	1,03	1,00	1,00	1,00	1,30	1,03

Stosunek l/h może służyć do dodatkowego zróżnicowania rozdzielonych substancji biologicznie czynnych pod względem ich działania fizjologicznego. Okazało się, że rośliny rosnące na paskach bibuły nie zawierających substancji biologicznie czynnych posiadają wartość l/h zbliżoną do jedności. Rośliny rosnące na paskach 3, oraz 5 i 6 posiadają wartość l/h znacznie niższą od jedności (średnio około 0,75), natomiast wartość l/h dla roślin rosnących na pasku 13 wynosi 1,30, to jest znacznie powyżej jedności. Wartości l/h dla roślin kontrolnych jednak nie zawsze równe są jedności. Zależą one od serii i odmiany sałaty, od warunków naświetlania i od innych czynników. Natomiast bez zmian pozostaje stosunek wartości l/h rośliny rosnącej na podłożu z giberelinami do wartości l/h rośliny rosnącej na podłożu bez giberelin. Pozwala to na dodatkowy podział giberelin pod względem ich czynności fizjologicznej, a mianowicie na gibereliny powodujące zwiększony wzrost hypokotyli, na gibereliny powodujące zwiększony wzrost liści i na gibereliny, lub substancje wzrostowe, powodujące zwiększenie wzrostu roślin w tej samej proporcji, jaka występuje u roślin kontrolnych.

DISKUSJA WYNIKÓW

Młode siewki sałaty można z dobrymi wynikami stosować do testu biologicznego na gibereliny rozdzielone na chromatogramach. Powszechnie stosowane w chromatografii giberelin rozpuszczalniki, takie jak butanol, benzen i toluen, w małych stężeniach nie wywierają ujemnego wpływu na rozwój siewek sałaty, co pozwala na przeprowadzenie testu bezpośrednio na rozwiniętych i wysuszonych chromatogramach. Przeprowadzenie testu tą metodą zaoszczędza bardzo wiele czasu, a poza tym unika się strat, zwłaszcza wtedy, gdy substancja biologicznie czynna znajduje się na chromatogramie w ilościach śladowych. Test jest łatwy do przeprowadzenia i trwa stosunkowo krótko. Stwierdzono, że do testu najlepiej nadają się nasiona o prawie 100%-wej sile kiełkowania, gdyż odpada wtedy zagadnienie doboru siewek pod względem fazy rozwoju. Siewki sałaty są bardzo wrażliwe na preparaty giberelinowe; w przypadku kwasu giberelowego wydłużanie się hypokotyli i liści następuje przy stężeniu 0,0025 $\mu\text{g/ml}$. Maksymalne przyrosty hypokotyli i całych pędów uzyskuje się po trzech dniach od początku doświadczenia.

Wyraźne przyrosty można stwierdzić już w drugim dniu doświadczenia i gdy ilościowa ocena rozdzielanego preparatu i charakter jego działania odgrywają drugorzędną rolę, likwidacja testu może nastąpić już po 48 godzinach. Istotne znaczenie ma wiek siewek sałaty. Najlepsze wyniki uzyskuje się, gdy siewki przenosi się do zlewek testowych po upływie 48 godzin od wyłożenia nasion na wilgotnym podłożu, do kiełkowania. Największe przyrosty uzyskuje się, gdy siewki ułożone na podłożu z preparatami giberelinowymi umieszcza się od początku doświadczenia pod silnym źródłem światła. Trzy świetlówki, ułożone równolegle obok siebie, a łącznej mocy 120 watt, dają dostatecznie silny strumień światła. Przy optymalnych warunkach świetlnych rośliny kontrolne rosną bardzo słabo: są niskie i posiadają liście koloru ciemnozielonego. Rośliny w obecności preparatu giberelinowego rosną znacznie szybciej. Następuje u nich (w zależności od stężenia preparatu giberelinowego) silne wydłużenie się hypokotyli, poza tym liście tych roślin wykazują charakterystyczne dla działania giberelin objawy chlorozy. Chloroza występuje już przy bardzo niskich stężeniach giberelinu i pozwala na ich wykrycie nawet przy małych przyrostach hypokotyli.

Jako kontrola służyć może pasek bibuły o tej samej szerokości co badany chromatogram, lecz bez preparatu, rozwinięty w tej samej komorze i w tych samych warunkach co chromatogram z preparatem. Jednak przy badaniach jakościowych za kontrolę uważać można odcinki bibuły z badanego chromatogramu, na których średni wzrost siewek sałaty jest najmniejszy. O tym, że kontrola taka jest wystarczająca

świadczą wykresy aktywności obok chromatogramów na rysunkach 1, 2 i 3. Siewki sałaty nadają się do testu biologicznego również z tego względu, że występuje u nich wyraźne rozgraniczenie części morfologicznych: korzenia, hypokotylu i liścia, co pozwala na łatwy pomiar długości każdej z tych części. Jednoczesny pomiar długości obu części nadziemnych pozwala na zróżnicowanie substancji biologicznie czynnych, odkrytych na chromatogramie, pod względem ich działania na budowę morfologiczną młodych siewek sałaty.

STRESZCZENIE

Opracowano prosty i szybki test biologiczny do wykrywania biologicznie czynnych substancji, a w szczególności giberelin na chromatogramach. Pocięte paski rozwiniętego chromatogramu można bezpośrednio umieszczać w podłożu, na którym rosną siewki sałaty. Wykazano, że solwenty organiczne powszechnie stosowane w chromatografii giberelin, takie jak butanol, benzen i toluen w stężeniu do 0,2% nie wywierają, w warunkach testu, ujemnego wpływu na normalny rozwój siewek. Stwierdzono, że największe przyrosty w stosunku do roślin kontrolnych można uzyskać przy użyciu siewek sałaty inspektowej odmiany Królowa Majowych. Test sałatowy jest łatwy do przeprowadzenia, gdyż nasiona sałaty są łatwo dostępne, poza tym na małej przestrzeni umieścić można większą ilość siewek, co umożliwia statystyczne ujęcie wyników. Metodyka testu nie wymaga używania specjalnych urządzeń. Wyniki doświadczenia zależą od serii danej odmiany sałaty. Użycie siewek sałaty do testu biologicznego pozwala na dodatkowe zróżnicowanie preparatu biologicznie czynnego pod względem jego działania na odpowiednią część morfologiczną rośliny.

Zakład Biochemii Instytutu Antybiotyków
w Warszawie
(Dyrektor mgr inż. F. Ulak)

(Wpłynęło dn. 15.I.1962 r.)

SUMMARY

A simple and quick biological test for detecting biologically active substances especially gibberellins on chromatograms was worked out. The stripes of developed chromatograms were placed directly on medium on which lettuce seedlings are grown. It was proved that such usual organic solvents as butanol, benzene and toluene in concentrations to 0,2% do not interfere in this test with the normal growth of seedlings. The most sensitive test plant was Królowa Majowych hotbed variety of the lettuce. The lettuce test is easy to perform the seeds are easy to get and many seedlings can be grown on small surface which makes possible statistical treatment of the experiments. This method is very simple. Lettuce seedlings test gives also the possibility for disinction of the action of biologically active preparations on different parts of the plants.

LITERATURA

- Bird M. L., Pugh C. T., 1958, A Paper Chromatographic Separation of Gibberellic Acid and Gibberellin A, *Plant Physiology* 33; 45.
Borris H., Schmidt S., 1961, Die Bildung Keimungsfördernder Stoffwechsel-

- produkte in Submerskulturen von *Gibberella fujikuroi* (Saw.) Wr., Naturwissenschaften 48; 483.
- Frankland B., Warcing P. F., 1961, Effect of Gibberellic Acid on Hypocotyl Growth of Lettuce Seedlings, Nature 185; 255.
- Krekule J., Ullmann J., 1959, The Influence of Gibberellic Acid on the Growth of Overground Parts and Roots of Wheat, Lettuce and Oats, J. Biologia Plantarum 1:22.
- Murakami Y., 1957, The Effect of Extract of Immature Bean Seeds on the Growth of Coleoptile and Leaf of Rice Plant, The Botanical Magazine Tokyo 7:333.
- Phinney B. O., West C. A., Ritzel M., Neely P. M., 1957, Evidence for "Gibberellin-like" Substances from Flowering Plants, Proceedings of the National Academy of Sciences 43:398.
- Radley M., 1958, The Distribution of Substances to Gibberellic Acids in Higher Plant, Annals of Botany 22: 297.
- Schmidt S., 1961, Isolation eines neuen Gibberellins aus dem Kulturfiltrat von *Gibberella fujikuroi* (Saw.) Wr., Naturwissenschaften 48:484.
- Simpson G. M., 1958, A Colorimetric Test for Gibberellic Acid and Evidence from a Dwarf Pea Assay for the Occurrence of Gibberellin-like Substance in Wheat Seedlings, Nature 182, 528.

Autorzy dziękują p. A. Łojek i p. St. Kiełczewskiej za wydatną pomoc techniczną.