Badania nad rolą endogennych giberelin w procesie jaryzacji pszenicy ozimej

*Studies on the role of endogenous gibberellins during the process of vernalization
of winter wheat*

T. KENTZER

WSTĘP

Próby wyjaśnienia mechanizmu jaryzacji na zasadzie działalności czynnika natury hormonalnej podejmowane były już niejednokrotnie przez wielu badaczy.

Wielkie nadzieje na możliwość ustalenia istoty tego procesu wzbudziły wyniki prac Langa (1956), który zdołał zastąpić proces jaryzacji u lulka czarnego działaniem gibereliny.

Nie wszystkie jednak rośliny wymagające jaryzacji reagują w jednakowym stopniu na ten związek. Do grupy roślin słabo reagujących na giberelinę należą przede wszystkim zboża. Doświadczenia przeprowadzane na tym materiale roślinnym dały wyniki bardzo różne. Znane są prace w których uzyskano zdecydowanie negatywne rezultaty (Lona i Bocchi 1956; Lang 1957; Krekule i Martinovska 1958; Weibel i Futrell 1958; Paleg i Aspinall 1958; Beldenkova 1962; Fedorov i Szinkarowa 1966). Z drugiej strony istnieją fakty, które wskazują na pozytywny efekt działania gibereliny w przypadku jej zastosowania przy niepełnej jaryzacji (Weibel 1960; Razumov i wsp. 1960; Markowski i Jurkow-Pawłowska 1963; Pop i wsp. 1963; Suge i Yamada 1963; Rejowski 1965). Ostatnio wykazano również możliwość całkowitego zastąpienia efektu jaryzacji u żyta, działając gibereliną na rośliny ulistnione (Caso i wsp. 1960; Purvis 1960; Bruinsma i Patil 1963).

Różnorodność uzyskiwanych wyników nie pozwoliła dotąd na definitywne określenie roli giberelin w procesie jaryzacji. Na podstawie szeregu faktów można jednak przypuszczać, że podobnie jak przy zastosowaniu pewnych bodźców zewnętrznych możliwe jest zahamowanie lub całkowite niwelowanie efektu jaryzacji, tak poprzez zastosowanie gibereliny proces ten może w pewnych warunkach ulegać przyspieszeniu.

Obok wielu prac dotyczących wpływu egzogennych giberelin na przebieg jaryzacji, znajdujemy nieliczne tylko dane na temat endogennych giberelin w tym procesie. W doświadczeniach z chryzantemą wymagającą jaryzacji stwierdzono, że w trakcie działania niskiej temperatury zwiększa się ilość tych związków (Ha-

rada i Nitsch 1959). Istotne zmiany natury ilościowej i jakościowej w zawartości substancji giberelinopodobnych pod wpływem działania chłodu wykazały doświadczenia Reinharda i Langa (1961), u łulka czarnego. Podobnie Czajłachjan i Łożnikowa (1962) stwierdzają, że jedną z zasadniczych zmian, jakie zachodzą podczas jaryzacji, jest akumulacja substancji giberelinopodobnych lub ich prekursorów (Czajłachjan 1966).

Michniewicz (1965) stosując chlorek 2-chloroetylotrójmetyloamoniowy (CCC) obserwował zahamowanie efektu jaryzacji u pszenicy ozimej i jednocześnie obniżenie poziomu endogennej gibereliny. Autor ten uwzględniając fakt, że CCC hamował efekt jaryzacji tylko wówczas gdy stosowany był przed jaryzacją, wysunął wniosek, że giberelina może mieć istotne znaczenie w początkowym okresie tego procesu.

Istnieje szereg związków chemicznych, powodujących wyraźne zahamowanie jaryzacji bez istotnego wpływu na wzrost jaryzowanych obiektów, które określane są przez niektórych autorów jako „antivernalizing agents” (por. Chouard 1960). Krekule (1960, 1961) stwierdził, że azydek sodu, KCN, $\alpha\alpha$ -dwupirydyli i 2,4-dwunitrofenol, stosowane przed rozpoczęciem jaryzacji blokowały kompletnie efekt tego procesu u pszenicy ozimej. Hamujący wpływ pewnych inhibitorów na przebieg jaryzacji wykazali również Szwedskaja i Krużilin (1961), u rzepy i wczesnej kapusty. Istota oddziaływania tego typu inhibitorów nie została dotąd w pełni wyjaśniona. Pewne sugestie odnośnie mechanizmu działania niektórych inhibitorów jaryzacji podaje Krekule (1961). Szwedskaja i Krużilin (1961) badając wpływ szeregu różnych inhibitorów, między innymi azydku sodu na przebieg jaryzacji stwierdzają, że wpływ ten urzeczywistnia się poprzez oddziaływanie na system enzymatyczny uczestniczący w przemianie węglowodanów.

Istnieją także dane, które wskazują na istotne powiązanie aktywności niektórych enzymów z działalnością gibereliny (Stowe i Yamaki 1957; Weller i wsp. 1957; Bergqvist i wsp. 1959; Istakov 1963; Michniewicz i Stanisławski 1962, 1965). Szczególnie sugestywne są w tym wypadku doświadczenia, w których stwierdzono, że zarówno giberelina doprowadzona z zewnątrz, jak i endogenna wydzielana przez embriony kiełkującego ziarna zbóż ma decydujący wpływ na system enzymatyczny regulujący metabolizm węglowodanów w endospermie (Paleg 1960 a, b; 1961; Paleg i wsp. 1962).

Uwzględniając przytoczone fakty starano się w pracy niniejszej określić drogą pośrednią rolę gibereliny podczas jaryzacji, stosując azydek sodu, który wykazuje zdolność hamowania tego procesu. Badano wpływ azydku na efekt jaryzacji ziarna pszenicy ozimej oraz dynamikę endogennej gibereliny, oznaczając także wpływ kwasu giberelowego wprowadzanego z zewnątrz, w różnych etapach jaryzacji, na efekt działania tego inhibitora.

METODA BADAŃ

Prace związane z omawianym zagadnieniem prowadzono głównie na pszenicy ozimej 'Dańkowska' Selekcyjna (S.H.R. — Dańków), wymagającej 60—65 dni jaryzacji. Badano także dwie inne odmiany, a mianowicie 'Dańkowską Graniatkę'

(W.S.R. — Olsztyn) o średnim okresie jaryzacji (40 dni) oraz 'Leszczyńską Wczesną' o bardzo małym zapotrzebowaniu na niską temperaturę (20 dni).

Metoda i kryteria oceny efektu jaryzacji. Ziarno przeznaczone do jaryzacji kielkowane przez 20 godz. w temp. 23°C, a następnie przenoszono do lodówki poddając je działaniu temperatury jaryzującej ($2 \pm 1^\circ\text{C}$), przez określony okres czasu, odpowiednio do wymagań badanej odmiany pszenicy. W trakcie jaryzacji oraz przed rozpoczęciem tego procesu wprowadzono azydek sodu (NaN_3) w stężeniu 10^{-3} M. Jako kontrola służyła próba jaryzowana bez inhibitora. Wyboru stężenia inhibitora dokonano na podstawie doświadczeń wstępnych, które wykazały, że potraktowanie ziarna przed jaryzacją wodnym roztworem azydku sodu o danym stężeniu, powodowało bardzo silne lub całkowite zahamowanie rozwoju generatywnego pszenicy ozimej 'Dańkowska Selekcyna', nie wpływając na rozwój pszenicy jarej 'Ostka Chłopicka'.

W doświadczeniach, w których badano łączny wpływ gibereliny i azydku na efekt jaryzacji, ziarno traktowano inhibitorem w okresie wstępnego kielkowania przed jaryzacją, a roztwór gibereliny w stężeniu 0.1 i 0.01 $\mu\text{g/ml}$ wprowadzano jednocześnie z inhibitorem lub w różnych odstępach czasu podczas działania chłodu.

Efekt przedsiewnej jaryzacji określano na podstawie szybkości rozwoju roślin, oznaczając okres od wysiewu do strzelania w źdźbło i kłoszenia się roślin. Przy ocenie szybkości (tempa) kłoszenia przyjęto dwa kryteria. Pierwsze z nich stanowiła liczba dni do zapoczątkowania kłoszenia (10–15% wykłoszonych roślin), jako drugie kryterium przyjęto okres do pełni kłoszenia (60–70% wykłoszonych roślin). Po zakończeniu wegetacji przeprowadzano analizę morfologiczną stózków wzrostu w przypadkach, w których nie można było stwierdzić obecności kłosa makroskopowo. Na podstawie stopnia zróżnicowania wierzchołka wzrostu ustalano ostateczną liczbę roślin, które przeszły w stan generatywny, zaliczając tu takie rośliny, u których stwierdzono przynajmniej obecność zawiązków kwiatowych. Ilość roślin generatywnych wyrażano w procentach ogólnej liczby roślin wyrosłych w poszczególnych powtórzeniach każdej kombinacji doświadczenia, z których wyliczano średnią. Wyniki końcowe poddano analizie statystycznej, obliczając najmniejszą różnicę udowodnioną (N.R.U.) dla $P = 0.05$ i $P = 0.01$.

Oznaczanie substancji giberelinopodobnych. Ekstrakcję substancji giberelinopodobnych prowadzono w 70% acetonie. Próbkę ziarna (50 g) zamrażano, rozdrabniano i ekstrahowano 7-krotną ilością acetonu. Po 24 godzinach aceton odsączano i zalewano próbkę nową porcją. Połączone ekstrakty acetonowe odparowywano do pozostałości wodnej, zakwaszono do $\text{pH}=2$ i frakcjonowano według metody Murakami'ego (1959). Oczyszczone ekstrakty odparowywano i badano chromatograficznie w połączeniu z testem biologicznym według metody opisanej przez Michniewicza i Kopcewicza (1966).

Oceniając aktywność eluatów opierano się bezpośrednio na reakcji wzrostowej roślin testowych, bądź też uzyskiwane efekty wzrostowe porównywano z krzywą wzorcową wyznaczoną dla szeregu znanych stężeń kwasu giberelowego (GA_3). Na tej zasadzie obliczano prawdopodobną zawartość endogennej gibereliny, wyra-

zoną w ekwiwalentach GA_3 (GA_3E), w odniesieniu do 100 g świeżej lub suchej masy badanego materiału roślinnego.

Jednocześnie z próbą biologiczną podjęto także próbę identyfikacji badanych substancji na drodze chemicznej, stosując metodę opryskiwania stężonym lub 5% roztworem kwasu siarkowego w 96% etanolu, w połączeniu z techniką stopniowego nagrzewania chromatogramów według Adamca i wsp. (1964). Świecenie aktywnej biologicznie strefy chromatogramu badano w świetle U.V.

WYNIKI DOŚWIADCZEŃ

1. Hamujący wpływ azydku sodu stosowanego w różnych okresach jaryzacji ziarna pszenicy ozimej na rozwój generatywny roślin

Badania przeprowadzono na pszenicy ozimej 'Dańkowska Selekcyjna'. Azydek stosowano przed rozpoczęciem jaryzacji (w okresie wstępnego kiełkowania ziarna) oraz po 5, 10, 20, 40 i 65 dniach trwania tego procesu.

Tabela 1 — Table 1

Wpływ azydku sodu stosowanego w różnych okresach jaryzacji ziarna pszenicy na rozwój generatywny roślin

The influence of sodium azide applied at different stages of vernalization of wheat kernels on the generative development of plants

Dni jaryzacji przed zastosowaniem inhibitora Days of vernalization before inhibitor application	Liczba dni od wysiewu do początków kłoszenia No. of days from sowing to beginning of earing	Liczba dni od wysiewu do pełni kłoszenia No. of days from sowing to full earing	Procent wykłoszonych roślin Percent of eared plants
0**	—	—	18.7*
5	—	—	22.8*
10	—	—	23.4*
20	77	98	71.3
40	72	86	86.6
65	72	86	87.5
K	72	86	88.6
KN	—	—	—

K — kontrola jaryzowana bez NaN_3 — control vernalized without NaN_3

KN — kontrola niejaryzowana — non-vernalized control

* przejście roślin do fazy generatywnej stwierdzone na podstawie analizy morfologicznej stożka wzrostu — passage into generative stage determined only by the analysis of the shoot apex.

** NaN_3 stosowany przed jaryzacją — NaN_3 applied before vernalization.

N. R. U. dla końcowej liczby wykłoszonych roślin — L. S. D. for the final number of eared plants: P 0.05 = 15.5; P 0.01 = 21.8

Wyniki doświadczeń przedstawiono w tabeli 1 oraz graficznie na rycinie 1. Zastosowanie inhibitora w początkowej fazie jaryzacji ziarna obejmującej okres

około 20 dni prowadziło do wyraźnego zahamowania rozwoju generatywnego roślin. Zjawisko to w wariantcie traktowanym po 20 dniach działania niskiej temperatury wyrażało się opóźnieniem terminu kłoszenia oraz obniżeniem ogólnej liczby wykłoszonych roślin. Hamujący wpływ inhibitora ujawniał się najsilniej w przypadku jego zastosowania przed rozpoczęciem jaryzacji oraz po 5 i 10 dniach działania

Ryc. 1. Wpływ azydku sodu stosowanego w różnych okresach jaryzacji ziarna pszenicy ozimej na rozwój generatywny roślin

The influence of sodium azide, applied at different stages of vernalization of winter wheat kernels, on the generative development of plants

K — kontrola jaryzowana bez NaN_3 (control vernalized without NaN_3) 20, 40, 65 — dni jaryzacji przed zastosowaniem NaN_3 (days of vernalization before NaN_3 treatment)

NaN_3 stosowany przed jaryzacją oraz po 5 i 10 dniach jaryzacji hamował kompletnie proces kłoszenia się roślin
 NaN_3 applied before or after 5 and 10 days of vernalization inhibited the earing of plants completely

niskiej temperatury. W tych wypadkach następowało kompletne zahamowanie efektu jaryzacji. Analiza morfologiczna stożków wzrostu wykonana po 111 dniach wegetacji roślin wykazała u nielicznych tylko egzemplarzy zawiązki kłosów. Działanie preparatu w późniejszych okresach jaryzacji nie wywierało istotnego wpływu na pojaryzacyjny rozwój pszenic.

2. Wpływ inhibitora na zawartość endogennej gibereliny w trakcie jaryzacji ziarna

Dynamikę substancji giberelinopodobnych oznaczano w ziarnie poddanym normalnej jaryzacji oraz zakłóconej działaniem azydku. Inhibitor ten wprowadzano przed rozpoczęciem jaryzacji, to jest w kombinacji, w której ujawniał się najsilniej efekt jego działania.

Próbki ziarna do analizy pobierano bezpośrednio przed jaryzacją, a następnie po 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60 i 70 dniach trwania tego procesu. Rezultaty analizy chro-

Przyrost roślin testowych w stosunku do kontroli = 100% - Growth increase of the test plants in relation to control = 100%

- Rf -

matograficznej substancji giberelinopodobnych w ziarnie nie poddanym działaniu inhibitora przedstawiono graficznie w formie histogramów 1—9 (Ryc. 2). Aktywność tych związków w ekstraktach z ziarna traktowanego inhibitorem ilustrują histogramy, 1a—9a (Ryc. 2).

Substancje biologicznie czynne o własnościach gibereliny lokalizowały się w danych warunkach doświadczenia zasadniczo w trzech końcowych odcinkach chromatogramu (R_f 0.7—1.0), obejmujących strefę występowania kwasu giberelowego, którą wyznaczono na chromatogramach kontrolnych przy pomocy reakcji barwnej z H_2SO_4 w świetle U.V.

Dynamika tych związków w wariancie traktowanym inhibitorem wykazywała znaczne różnice w porównaniu z kontrolą nie traktowaną. Aktywność giberelin w ziarnie kiełkowanym w obecności inhibitora oznaczona bezpośrednio przed jaryzacją oraz po 5 dniach działania chłodu była już wyraźnie niższa w porównaniu z aktywnością tych związków w analogicznych próbach kontrolnych. Różnica ta pogłębiała się znacznie w dalszych fazach jaryzacji. Po 20 i 30 dniach jaryzacji ekstrakty z ziarna potraktowanego inhibitorem nie wykazywały żadnej aktywności biologicznej. W tym samym czasie w wariancie kontrolnym (bez NaN_3) aktywność substancji giberelinopodobnych była znaczna i nie ulegała istotnym zmianom w stosunku do wartości początkowej.

Ponowne pojawienie się tych związków w wariancie poddanym działaniu inhibitora obserwowano po 40 i 50 dniach jaryzacji ziarna. W wariancie kontrolnym widoczny jest na tym etapie jaryzacji wzrost aktywności eluatów w stosunku do początkowego okresu jaryzacji. Różnice pomiędzy obu wariantami doświadczenia malały stopniowo w miarę trwania procesu jaryzacji. Po 70 dniach wynik próby biologicznej ekstraktów z ziarna potraktowanego inhibitorem był bardzo zbliżony do tego jaki charakteryzował ziarno poddane normalnej jaryzacji.

Próba chemicznej identyfikacji badanych substancji oparta na zasadzie reakcji z H_2SO_4 przy stopniowym nagrzewaniu chromatogramów, wykazała zależnie od fazy jaryzacji pewne zróżnicowanie barwne aktywnej strefy chromatogramu. Na chromatogramach ekstraktów z ziarna w końcowych fazach jaryzacji obserwowano, zależnie od stopnia nagrzania chromatogramów, trzy różne fluoryzujące plamy. Przy słabym i krótkotrwałym nagrzaniu (około 40 sek.) pojawiała się plama o zielononiebieskiej fluorescencji typowej dla GA_3 . Dłuższe i intensywniejsze nagrzanie

Ryc. 2. Dynamika substancji giberelinopodobnych podczas jaryzacji ziarna pszenicy ozimej, poddanego działaniu azydki sodu oraz w ziarnie nie poddanym działaniu tego inhibitora

The dynamics of gibberellin-like substances during vernalization of winter wheat kernels treated with sodium azide, and in non-treated kernels

1 — analiza bezpośrednio przed jaryzacją, ziarno nie poddane działaniu NaN_3
analysis before vernalization, kernels without NaN_3

1a — analiza bezpośrednio przed jaryzacją, ziarno kiełkowane w obecności NaN_3
analysis before vernalization, kernels germinated in the presence of NaN_3

2—9 — kolejne analizy po 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60 i 70 dniach jaryzacji bez NaN_3
successive analyses after 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60 and 70 days of vernalization without NaN_3

2a—9a — oznacza te same analizy dla ziarna traktowanego NaN_3
means the same analyses for kernels treated with NaN_3

chromatogramu powodowało kolejne pojawienie się dwu dalszych plam, ściśle przylegających do strefy występowania GA_3 . Pierwsza z nich dawała barwę jasno-żółtą, druga natomiast intensywnie niebieską.

W ekstraktach z ziarna traktowanego inhibitorem, strefa żółto fluoryzująca miała charakter tylko śladowy i pojawiała się w późniejszym okresie jaryzacji niż w wariacie nie traktowanym.

Obok substancji stymulujących o własnościach gibereliny w ziarnie poddanym działaniu azydku, występowały również pewne substancje hamujące wzrost pierwszego liścia owsa, zajmujące zmienną pozycję w granicach $R_f 0.2 - 0.5$ i $R_f 0.6 - 0.9$. Związków tych nie stwierdzano w ziarnie jaryzowanym bez inhibitora. Pierwsza z wymienionych substancji ujawniała się z mniejszą lub większą aktywnością we wszystkich analizach do momentu zakończenia jaryzacji. Obecność drugiego inhibitora ($R_f 0.6 - 0.9$) notowano tylko w początkowych fazach jaryzacji.

Wyniki niniejszych doświadczeń wykazały ponadto, że w miarę trwania procesu jaryzacji zawartość substancji giberelinopodobnych wykazywała wyraźną tendencję zwyżkową. Zagadnienie to stanowiło przedmiot odrębnych badań.

3. Zmiany zawartości substancji giberelinopodobnych w ziarnie różnych odmian pszenicy pod wpływem jaryzacji

Badania przeprowadzono na trzech odmianach pszenic ozimych: 'Dańkowska Selekcyjna', 'Dańkowska Graniatka' i 'Leszczyńska Wczesna'.

Zawartość tych związków oznaczano w ziarnie bezpośrednio po zakończeniu okresu jaryzacji, typowego dla danej odmiany pszenicy oraz w ziarnie niejaryzowanym, podkiełkowanym do stanu, w jakim znajdowało się ziarno jaryzowane. Wyniki przedstawiono w Tab. 2.

Tabela 2 — Table 2

Zawartość substancji giberelinopodobnych w jaryzowanym (V) i nie jaryzowanym (N) ziarnie pszenic ozimych

The content of gibberellin-like substances in vernalized (V) and non-vernalized (N) kernels of winter wheats

Odmiana pszenicy Variety of wheat	GA ₃ E w µg/100 g materiału roślinnego * GA ₃ E in µg/100 g of plant material			
	świeża masa fresh weight		sucha masa dry weight	
	V	N	V	N
Dańkowska Selekcyjna	0.85	0.63	1.54	1.30
Dańkowska Graniatka	1.01	0.88	1.80	1.65
Leszczyńska Wczesna	1.05	0.83	1.94	1.69
N.R.U. — L.S.D.	P 0.05 = 0.12 P 0.01 = 0.19		P 0.05 = 0.15 P 0.01 = 0.21	

* każdy wynik stanowi średnią z trzech powtórzeń — each value represents average from three repetitions

Ryc. 3. Wpływ kwasu giberelowego (GA_3) na hamujące działanie azydu sodu w procesie jaryzacji
 The influence of gibberellic acid (GA_3) on the inhibitory action of sodium azide in the process of vernalization

$a - GA_3 0.1 \mu g/ml$; $b - GA_3 0.01 \mu g/ml$; K – kontrola jaryzowana bez NaN_3 (control vernalized without NaN_3)

1 – ziarno traktowane NaN_3 przed jaryzacją
 kernels treated with NaN_3 before vernalization

2 – ziarno traktowane $NaN_3 + GA_3$ przed jaryzacją

kernels treated with $NaN_3 + GA_3$ before vernalization

3, 4, 5, 6 – ziarno traktowane przed jaryzacją NaN_3 a następnie GA_3 w 10, 20, 40 i 60 dniu jaryzacji

kernels treated before vernalization with NaN_3 and subsequently with GA_3 after 10, 20, 40 and 60 days of vernalization

Rezultaty analiz wykazały istotne różnice w zawartości giberelin w ziarnie niejaryzowanym i jaryzowanym na korzyść tego ostatniego. Wyższą aktywność biologiczną ekstraktów z ziarna po jaryzacji stwierdzano u wszystkich badanych odmian. Największe różnice sięgające 0.24–0.25 $\mu\text{g GA}_3\text{E}/100$ suchej masy ujawniały się pomiędzy wariantem jaryzowanym i niejaryzowanym u pszenicy 'Dańkowska Selekcyjna' i 'Leszczyńska Wczesna', znacznie niższe natomiast u pszenicy 'Dańkowska Graniatka'. Fakt ten wydaje się świadczyć, że proces kształtowania się poziomu endogennej gibereliny w trakcie jaryzacji ziarna przebiega z różną intensywnością u różnych odmian pszenic niezależnie od długości okresu termoindukcji, charakterystycznego dla danej odmiany.

Tabela 3 — Table 3

Wpływ kwasu giberelinowego (GA_3) na efekt jaryzacji ziarna traktowanego azydkiem sodu przed rozpoczęciem procesu jaryzacji

Influence of gibberellic acid (GA_3) on the effect of vernalization of kernels treated with sodium azide before vernalization

Dni jaryzacji przed zastosowaniem GA_3 Days of vernalization before GA_3 application	Stężenie GA_3 w $\mu\text{g}/\text{ml}^3$ Conc. GA_3 in $\mu\text{g}/\text{ml}$	Dni od wysiewu do tworzenia źdźbeł Days sowing-shoot formation	Dni od wysiewu do kłoszenia Days sowing-ear formation	Procent wykłoszonych roślin po zakończeniu doświadczeń Percent of eared plants at the end of experiments
0**	0.1	61(4)	—	18.0*
10		46(18)	83(20)	38.0
20		46(22)	83(26)	42.0
40		57(10)	—	22.0*
65		57(4)	—	18.0*
0**	0.01	57(12)	—	22.0*
10		46(30)	83(48)	64.0
20		46(34)	83(50)	78.0
40		57(6)	—	14.0*
65		57(8)	—	16.0*
A		68(5)	—	20.0
K		46(32)	83(62)	90.0

K — kontrola jaryzowana bez NaN_3 — control vernalized without NaN_3

A — ziarno traktowane tylko NaN_3 — kernels treated only with NaN_3

** — GA_3 stosowany łącznie z NaN_3 przed jaryzacją — GA_3 applied simultaneously with NaN_3 before vernalization

* — jak w Tab. 1 — as in Tab. 1

Liczba w nawiasach oznacza procent roślin, które osiągnęły w danym czasie odpowiednią fazę fenologiczną.

Number in brackets represents plants, which attain at the given time the correspondent phenological phase.

N. R. U. dla końcowej liczby wykłoszonych roślin — L. S. D. for the final number of eared plants: P 0.05 = 17.1; P 0.01 = 22.6

4. Wpływ kwasu giberelowego na efekt jaryzacji ziarna traktowanego przed jaryzacją azydkiem sodu

Ziarno pszenicy ozimej 'Dańkowska Selekcyjna' traktowano kwasem giberelowym jednocześnie z azydkiem przed jaryzacją, a następnie po 10, 20, 40 i 65 dniach jaryzacji w obecności tego inhibitora. Rośliny uprawiano w wazonach w warunkach naturalnych.

Dane ilustrujące przebieg rozwoju roślin zestawiono w tabeli 3, w której przedstawiono zależność pomiędzy ilością roślin i czasem (licząc od wysiewu), w jakim osiągały one daną fazę rozwojową. Końcowe wyniki doświadczeń ilustruje także rycina 3.

Jak wykazały wyniki doświadczeń, dodatkowe wprowadzenie GA_3 w odpowiednim okresie jaryzacji ziarna obniżało efekt działania inhibitora na rozwój generatywny roślin. Wpływ GA_3 zaznaczał się najsilniej po 10 i 20 dniach jaryzacji. Ziarno jaryzowane w obecności inhibitora, a następnie traktowane roztworem kwasu giberelowego w stężeniu 0,1 $\mu\text{g/ml}$ i 0,01 $\mu\text{g/ml}$ po 10 dniach jaryzacji dało odpowiednio 38%—64% normalnie wykłoszonych roślin. Dodatni wpływ GA_3 na rozwój pszenicy obserwowano także w przypadku zastosowania tego związku po 20 dniach jaryzacji od momentu zadziałania inhibitorem. Końcowa liczba wykłoszonych roślin wahała się w tym wariancie doświadczenia w granicach 42%—78%, zależnie od stężenia GA_3 . Rośliny wyrosłe z ziarna poddanego tylko działaniu inhibitora nie wykłosiły się do końca okresu wegetacji. Na podstawie obserwacji rozwoju stożka wzrostu stwierdzono u 20% roślin stan odpowiadający przejściu w fazę generatywną. Kontrola niejaryzowana pozostała w stanie wegetatywnym do zakończenia doświadczeń.

Kwas giberelowy podany łącznie z inhibitorem przed jaryzacją ziarna oraz po 40 i 65 dniach działania chłodu nie niwelował hamującego wpływu inhibitora na efekt jaryzacji.

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Pomimo intensywnych badań nie zdołano dotąd wykazać istnienia jakiegoś specyficznego metabolizmu, typowego dla procesu jaryzacji.

Próby wyjaśnienia mechanizmu tego procesu działaniem giberelin nie pozwoliły również na zajęcie jakiegoś zdecydowanego stanowiska, jeżeli chodzi o znaczenie tych związków dla procesu jaryzacji. Pomimo wielu pozytywnych danych o możliwości zastąpienia jaryzacji działaniem gibereliny, w przypadku zbóż próby te dały wyniki negatywne.

Omawiając powyższe zagadnienie należałoby jednak uwzględnić fakt, że wszelkie wnioski dotyczące możliwości zastąpienia jaryzacji działaniem gibereliny, oparte są głównie na wynikach doświadczeń, w których badano wpływ jednej spośród poznanych dotąd 13 giberelin (Paleg 1965), a mianowicie kwasu giberelowego.

Doświadczenia Michniewicza i Langa (1962 a, b) wskazują natomiast wyraźnie na niejednocenny efekt działania różnych giberelin. Zastąpienie termoindukcji

u niezapominajki obserwowano tylko przy zastosowaniu gibereliny A_1 i A_7 , podczas gdy GA_3 — pomimo wyraźnych symptomów jego działania, objawiających się wytworzeniem pędu kwiatowego — nie doprowadził do zakwitania roślin. Podobnie niepełny efekt działania GA_3 na rozwój generatywny roślin obserwowali również Margara (1959) i Wellensiek, (1961).

Przytoczone fakty sugerują wniosek, że pod wpływem GA_3 mogą być wyzwalane tylko niektóre reakcje charakterystyczne dla pewnych etapów rozwojowych i odosobnione działanie tego związku nie może zastąpić kompleksowego działania szeregu czynników, warunkujących prawidłowy przebieg rozwoju ontogenetycznego rośliny.

Wyniki pracy niniejszej dostarczyły pewnych danych, które pozwalają na bliższe określenie pozycji i znaczenia endogennych giberelin w procesie jaryzacji. Badania nad wpływem azydku sodu, na efekt jaryzacji ziarna pszenicy ozimej 'Dańkowska Selekcyjna' wykazały, że związek ten stosowany w początkowym okresie tego procesu blokuje rozwój generatywny roślin. Inhibitor działając w końcowych fazach jaryzacji nie wpływał w sposób istotny na rozwój pszenicy. Stwierdzono dalej, że efektem działania azydku był znacznie obniżony poziom endogennych giberelin w początkowym okresie jaryzacji.

Fakt ten upoważnił do wniosku, że hamujący wpływ tego inhibitora na efekt jaryzacji może pozostawać w ścisłym związku z obserwowaną zmianą zawartości giberelin. Przekonywujących dowodów na poparcie tego założenia dostarczyły prace eksperymentalne, które wykazały wyraźne niwelowanie skutków działania inhibitora, pod wpływem GA_3 wprowadzanego z zewnątrz w początkowych fazach jaryzacji. Uzyskiwano tu zależnie od terminu stosowania i stężenia preparatu od 64%—78% normalnie wykłoszonych roślin. Efektu takiego nie uzyskiwano wprowadzając GA_3 w późniejszych okresach jaryzacji ziarna traktowanego uprzednio azydkiem.

Wyniki pracy niniejszej potwierdzają w pełni założenie Michniewicza (1965) mówiące, że giberelina może mieć istotne znaczenie dla przebiegu jaryzacji zbóż ozimych, głównie w początkowym okresie tego procesu. Wskazują one bowiem, że wszelkie zakłócenia w metabolizmie endogennej gibereliny, jaką dysponuje ziarno w początkowym okresie działania niskiej temperatury, odbijają się na przebiegu dalszych faz rozwojowych rośliny. Innymi słowy dla prawidłowego przebiegu procesu jaryzacji niezbędny jest — przynajmniej w pierwszym etapie tego procesu — pewien określony zapas substancji giberelinopodobnych, który tworzy się w roślinie podczas wstępnego kiełkowania ziarna przed jaryzacją.

Próba identyfikacji wyodrębnionych chromatograficznie substancji giberelinopodobnych, metoda reakcji barwnej z H_2SO_4 , sugeruje z dużą dozą prawdopodobieństwa, że kwas giberelowy nie jest jedynym związkiem tego typu uczestniczącym w procesie jaryzacji ziarna. Interpretację uzyskanych wyników utrudnia fakt, że nie dysponowano odpowiednimi wzorcami badanych związków. Na podstawie danych dotyczących charakterystyki pewnych giberelin (Jones i wsp. 1963) można jednak przypuszczać, że pojawiająca się w końcowej fazie jaryzacji żółto fluoryzująca substancja aktywna stanowi odpowiednik A_7 .

Czajłachjan i Łożnikowa (1962) oraz Czajłachjan i wsp. (1963) wykazali, że podczas jaryzacji następuje wzrost zawartości giberelin. W późniejszej publikacji (Czajłachjan 1966) skorygowano wnioski z poprzednich doświadczeń, stwierdzając, że jaryzacja prowadzi nie do bezpośredniego nagromadzenia giberelin, lecz ich prekursorów, które przekształcane są w aktywną giberelinę tylko w warunkach dnia długiego.

Doświadczenia niniejsze, w których oznaczano zawartość giberelin w ziarnie bezpośrednio po jaryzacji u trzech różnych odmian pszenicy ozimej, wykazały, że ziarno jaryzowane charakteryzował wyższy poziom substancji aktywnych o własnościach giberelin niż ziarno niejaryzowane. Związki te wykazywały zdecydowaną aktywność wzrostową w stosunku do stosowanego testu biologicznego, co wskazywałoby, że nie chodziło w tym wypadku o nieaktywne ich prekursory, lecz czynną biologicznie giberelinę. Rozbieżność pomiędzy wynikami niniejszych doświadczeń oraz stwierdzeniem Czajłachjana (1966) można tłumaczyć zastosowaniem odrębnych testów oraz tym, że autor ten opierał się na wynikach analiz wykonanych w późniejszych fazach pojarzacyjnego rozwoju roślin, w których efekt jaryzacji mógł już ulegać znacznym modyfikacjom pod wpływem panujących warunków świetlnych. Jak wiadomo bowiem z literatury, czynnik świetlny oddziałuje w znacznym stopniu na metabolizm endogennych regulatorów wzrostu (Bronchart, 1957; Kawase i Nitsch 1958; Alleweltdt 1959; Kentzer 1966 i inni.).

Podsumowując dotychczasowe dane z literatury oraz wyniki badań własnych można wysunąć wniosek, że na proces jaryzacji składa się szereg przyczynowo ze sobą powiązanych reakcji biochemicznych, w których funkcję czynników ograniczających przejmują kolejno różne regulatory wzrostu, między innymi także gibereliny. Na łańcuchowy charakter syntezy czynnika natury hormonalnej w procesach prowadzących do zakwitania wskazuje Listowski (1956). Wyniki badań Grzesiuka (1961) wykazały również okresowe tylko dominowanie pewnych czynników w określonych fazach rozwoju rośliny. Autor ten stwierdził mianowicie w procesie dojrzewania ziarna zbóż wyraźną tendencję do wzajemnego zastępowania się działalnością pewnych enzymów w poszczególnych etapach tego procesu.

Podobnie wyniki pracy niniejszej wykazały, że rola endogennych giberelin w procesie jaryzacji ziarna ma charakter okresowy i zaznacza się wyraźnie tylko we wczesnych etapach tego procesu.

W świetle omówionych faktów można się zgodzić z oceną Chouarda (1962), według której wpływ gibereliny na procesy prowadzące do zakwitania jest tylko pośredni i niepełny, należałoby jednak podkreślić, że dla prawidłowego przebiegu niektórych etapów rozwojowych w roślinie związki te stanowią czynnik niezbędny i niezastąpiony.

WNIOSKI

1. Azydek sodu stosowany w okresie jaryzacji ziarna pszenicy ozimej modyfikuje w znacznym stopniu efekt tego procesu. Inhibitor ten stosowany przed jaryzacją lub w początkowym okresie działania chłodu hamował całkowicie rozwój

generatywny roślin. Zastosowanie tego inhibitora w końcowych etapach jaryzacji ziarna nie powodowało istotnych zmian w rozwoju roślin.

2. Stwierdzono, że efektem działania azydki są istotne zmiany w metabolizmie endogennych giberelin. Potraktowanie ziarna tym inhibitorem przed jaryzacją powodowało znaczne obniżenie aktywności substancji giberelinopodobnych, a nawet całkowite ich zanikanie w początkowym okresie tego procesu.

3. Kwas giberelowy wprowadzany w pierwszych fazach jaryzacji ziarna, niwelował w znacznym stopniu hamujący wpływ inhibitora na pojaryzacyjny rozwój roślin.

4. Badania przeprowadzone na trzech odmianach pszenicy ozimej wykazały również, że ziarno jaryzowane charakteryzuje wyższy poziom substancji giberelinopodobnych niż ziarno niejaryzowane.

5. Wyniki niniejszej pracy upoważniły do wniosku, że dla prawidłowego przebiegu jaryzacji niezbędny jest pewien określony poziom endogennej gibereliny (prawdopodobnie kwasu giberelowego) w początkowym okresie tego procesu.

*Katedra Fizjologii Roślin
Uniwersytetu M. Kopernika
w Toruniu*

SUMMARY

In the course of vernalization and before the beginning of the thermic induction the kernels of winter wheat Dańkowska Selekcyjna were treated with sodium azide (10^{-3} M). The influence of this inhibitor on the generative development of plants and on the metabolism of endogenous gibberellins was investigated.

The gibberellin-like substances were estimated at various stages of vernalization in kernels with azide and in non treated kernels. The frozen plant material was extracted in 70% acetone. The extracts were purified after the method of Murakami (1959), evaporated to a small volume and chromatographed on Whatman No 1 in: butanol, acetic acid, water (19:1:6 v/v). After drying, the particular sections of the chromatograms were eluted in 1 ml 2% saccharose and assayed by the first oat leaf test (Michniewicz 1961), showing a typical growth-response in the presence of gibberellin.

Experiments concerning the influence of sodium azide on the effect of vernalization have shown that the application of this inhibitor, before or in the early stages of vernalization, blocked the generative development of plants completely. The same inhibitor did not show any significant influence, when applied in the later stages of vernalization or after its termination.

As effect of the inhibitor treatment a diminished level of endogenous gibberellins in the first stages of vernalization was observed. Exogenously applied gibberellic acid (GA_3) in conc. 0.1 and 0.01 $\mu\text{g/ml}$ suppressed the inhibitory influence of azide, when given in the initial period of vernalization.

A closer characteristic of the active compounds extracted from the vernalized kernels revealed that, besides a compound corresponding to GA_3 , also some other substances showing gibberellin-like properties were present.

It was also established that vernalization lead to an increased amount of endogenous gibberellins. The possible content of these substances was estimated in vernalized and non-vernalized kernels of three different varieties of winter wheat and expressed as an equivalent of the activity of gibberellic acid (GA_3E).

On the basis of the present investigations a general conclusion might be drawn whereby for an undisturbed vernalization-effect a suitable amount of endogenous gibberellins in the early stages of vernalization of kernels is indispensable. A decreased level of these substances, as caused by the inhibitor-treatment, lead to essential modifications in the further stages of plant development.

*Department of Plant Physiology
Nicolaus Copernicus University
Toruń—Poland*

LITERATURA

- Adamiec A., Paśś L., Wierzchowski P., 1964, *Acta Soc. Bot. Pol.* 33:351—357.
Alleweldt G., 1959, *Naturwiss.* 46:177.
Beldenkova A., 1962, *Trudy Bot. Inst. AN SSSR*, 15:101—119.
Bergqvist G., Stensgård A. M., Nielsen N., 1959, *Physiol. Plant.* 12:386—389.
Bronchart R., 1957, *Bull. Soc. roy. Sci. Liège*, 26:241—252.
Bruinsma J., Patil S. S., 1963, *Naturwiss.* 50:505.
Caso O. H., Highin H. R., Koller D., 1960, *Nature* 185:477—479.
Chouard P., 1960, *Ann. Rev. Plant Physiol.* 11:191—237.
Chouard P., 1962, *Eigenschaften und Wirkungen der Gibberelline*, 257 pp. R. Knapp, Springer-Verlag:50—59.
Czajłachjan M. Ch., 1966, *Proc. Symp. Differentiation of apical meristems and some problems of ecological regulation of development of plants*, C.S.A.V., Praha:85—88.
Czajłachjan M. Ch., Łożnikowa V. N., 1962, *Fizj. Rast.* 9:21—31.
Czajłachjan M. Ch., Nekrasowa T. V., Chłopenkowa L. P., Łożnikowa V. N., 1963, *Fizj. Rast.* 10:465—476.
Fedorov A. K., Szinkarowa W. G., 1966, *Fizj. Rast.* 13:269—273.
Grzesiuk S., 1961, *Zesz. Nauk. W.S.R. Olsztyn* 11:1—82.
Harada H., Nitsch J. P., 1959, *Plant Phys.* 34:409—415.
Istakov S., 1963, *Izw. Inst. biol. Bulg. A. N.* 13:121 (z Ref. *Žurn. Z.S.R.R.*, 1964, 15:12).
Jones F. D., MacMillan J., Radley M., 1963, *Phytochemistry* 2:307—314.
Kawase M., Nitsch J. P., 1958, *Plant Phys. suppl.* 33:19.
Kentzer T., 1966, *Proc. Symp. Differentiation of apical meristems and some problems of ecological regulation of development of plants*, C.S.A.V. Praha:89—93.
Krekule J., 1960, VI Seminar über die Entwicklungsphysiologie der Kulturpflanzen, Praha.
Krekule J., 1961, *Biol. Plant.* 3:107—114.
Krekule J., Martinovska A., 1958, *Bot. Žurn.* 43:953—958.
Lang A., 1956, *Naturwiss.* 43:284—285.
Lang A., 1957, *Proc. Nat. Acad. Sci.* 43:709—717.
Listowski A., 1965, *Acta Soc. Bot. Pol.* 34:1—26.
Lona F., Bocchi A., 1956, *Revista Internaz. Agricult.* 6:44—47.
Margara J., 1959, *C. R. Acad. Sci. (Paris)* 249:751—753.
Markowski A., Jurkow-Pawłowska M., 1963, *Informator Min. S. W. Nauki Biol. i Med.*:53.
Michniewicz M., 1961, *Acta Soc. Bot. Pol.* 30:553—568.
Michniewicz M., 1965, *Naturwiss.* 52:88.
Michniewicz M., Lang A., 1962 a, *Naturwiss.* 49:211—212.
Michniewicz M., Lang A., 1962 b, *Planta* 58:549—563.
Michniewicz M., Stanisławski J., 1962, *Acta Agrobot.* 11:167—175.
Michniewicz M., Stanisławski J., 1965, *Acta Soc. Bot. Pol.* 34:215—223.
Michniewicz M., Kopcewicz J., 1966 *Rocz. Nauk. Roln.* 90:689—698.
Murakami Y., 1959, *Bot. Mag. Tokyo* 72:438—442.
Paleg L. G., 1960 a, *Plant Phys.* 35:293—299.

- Paleg L. G., 1960 b, *Plant Phys.* 35:902—906.
- Paleg L. G., 1961, *Plant Phys.* 36:829—873.
- Paleg L. G., 1965, *Plant Phys.* 16:291—322.
- Paleg L. G., Aspinall D., 1958, *Nature* 181:1743.
- Paleg L. G., Combe B. G., Buttrose M. S., 1962, *Plant Phys.* 37:798—803.
- Pop E., Bărbat I., Ochesanu C., 1963, *Studii si cercetari biol. Acad. PPR Fil. Ohy.* 14:11—17.
- Purvis O. N., 1960, *Nature* 185:479.
- Razumov V. I., Limar R. J., Tan-Kui., 1960, *Bot. Žurn.* 45:1732—1738.
- Reinhard E., Lang A., 1961, *Plant Phys. suppl.* 36:12.
- Rejowski A., 1965, *Bull. Acad. Polonaise Sci.* 13:369—372.
- Stowe B. B., Yamaki T., 1957, *Ann. Rev. Plant Phys.* 8:181—276.
- Suge A., Yamada N., 1963, *Proc. Crop. Sci. Soc. Japan* 32:77—80.
- Szwedskaja Z. M., Kružilin A. S., 1961, *Fizj. Rast.* 8:613—618.
- Weibel R. O., 1960, *Agr. Journ.* 2:122—123.
- Weibel D. E., Futrell M. C., 1958, *Plant Phys. suppl.* 33:42.
- Wellensiek S. J., 1961, *Adr. Hort. Sci. a. their Applic.* Pergamon Press. 1:35—41.
- Weller L. E., Wittwer S. H., Bucovac M. J., Sell H. M., 1957, *Plant Phys.* 32:371—372.