Rola naturalnych inhibitorów wzrostu i kwasów nukleinowych w kształtowaniu spoczynku ziarna jęczmienia jarego

*The role of natural growth inhibitors and nucleic acids in regulation of after-harvest
dormancy of spring barley*

A. REJOWSKI, K. KULKA

WSTĘP

Spoczynek głęboki roślin i nasion jest ważnym problemem dla praktyki rolniczej oraz ciekawym zagadnieniem teoretycznym (Ching i Foote 1961; Rejowski i Grzesiuk 1967). Zasadniczym czynnikiem indukującym spoczynek są prawdopodobnie pewne związki chemiczne, zwane inhibitorami wzrostu (Miyamoto i in. 1961; Mayer i Poljakoff-Mayber 1963; Barton 1965).

Zmiany aktywności inhibitorów w tkankach roślinnych, w powiązaniu z okresami spoczynku lub aktywnego wzrostu, były już przedmiotem wielu prac (Varga 1957; Remy 1961; Wareing i in. 1963). Prace te dotyczyły przeważnie badań bulw, łodyg oraz liści, pąków i nasion drzew (Hemberg 1961; Lane i Bailey 1964; Wareing 1965). Mechanizm działania inhibitorów w procesie indukowania spoczynku organów roślinnych nie został jeszcze całkowicie wyjaśniony (por. Rejowski, Grzesiuk 1967). Niektórzy autorzy (Bonner, 1965; Szafranski i Klita 1965; Nooden i Thimann 1966) przypuszczają, że inhibitory powodują przerwanie syntezy białek poprzez zablokowanie metabolizmu kwasów nukleinowych, a szczególnie przez uniemożliwienie syntezy m-RNA. Myśl powyższa znajduje potwierdzenie w badaniach nad dynamiką związków nukleinowych w spoczynkowych organach roślinnych (Sabinin 1940 i 1957; Oknina 1959; Vegis 1964; Mielickij i Korablewa 1965). Badania powyższe wykazują, że w pierwszym okresie spoczynku obniża się do minimum ilość kwasów nukleinowych. Dopiero późniejsze nagromadzenie tych związków w tkankach do określonego poziomu warunkuje przerwanie spoczynku.

Również badania Tuan i Bonnera (1964) wykazały, że chromatyna wyizolowana ze spoczynkowych bulw ziemniaka nie podtrzymywała syntezy RNA. Zdolność do syntezy RNA wykazywała natomiast chromatyna wypreparowana z bulw ziemniaka, które już wyszły ze spoczynku głębokiego. Z badań tych autorzy wyciągają wniosek, że zasadniczą przyczyną spoczynku głębokiego bulw ziemniaka jest zahamowanie aktywności genów, a tym samym i biosyntezy m-RNA. Aktywność

genów strukturalnych (i biosynteza RNA) może być hamowana przez odpowiednie substancje — represory, którymi zazwyczaj są białka histonowe w powiązaniu z naturalnymi inhibitorami (efektorami).

Zbadanie dynamiki inhibitorów spoczynku ziarna zbóż, w powiązaniu z metabolizmem kwasów nukleinowych, było celem niniejszej pracy.

METODY BADAŃ

Pobieranie prób do analiz. Badania przeprowadzono na dojrzałym morfologicznie ziarnie jęczmienia jarego ('Browarny PZHR'). Świeżo zebrane ziarno o wilgotności 33,6 % podzielono na dwie grupy — A i B. Ziarno grupy A przechowywano w stanie powietrzno-suchym w temperaturze pokojowej, zaś ziarno grupy B pozostawiono w stanie pełnego nasycenia wodą na kielkowniku Jacobsena, również w temperaturze pokojowej. Z grupy A pobierano ziarno do analiz mniej więcej co 10 dni, sprawdzając równocześnie zdolność kielkowania. Ziarno grupy B analizowano co 20 dni, usuwając z próbek przeznaczonych do analiz wszystkie ziarniaki skielkowane. W ziarnie obydwu grup badano zmiany aktywności inhibitorów wzrostu oraz zmiany zawartości kwasów nukleinowych (KN) i ich prekursorów. Równolegle oznaczano też suchą masę 1000 ziarn oraz zdolność ich do kielkowania.

Inhibitory. Ziarno przeznaczone do analiz inhibitorów wzrostu zamrażano w ciągu czterech godzin w temperaturze -20°C . W tej samej temperaturze rozdrobniono je na specjalnym młynku. Rozdrobnione ziarno trzykrotnie ekstrahowano eterem dwuetylowym wolnym od nadtlenu. Ekstrakcję przeprowadzano w ciemności, w temperaturze $+1^{\circ}\text{C}$. Do ekstraktu eterowego dodawano 20 ml wody redestylowanej i odparowywano w próżni (Luckwill 1957). Odparowywanie przeprowadzano w ciągu 4—5 godzin w ciemności, w $+5^{\circ}\text{C}$. Pozostałość wodną filtrowano przez bibułę, zakwaszano do pH 2,5 (Davidson 1965; Rejowski i Grzesiuk 1967) i ponownie ekstrahowano eterem. Eter powtórnie odparowywano, pozostałość zaś rozpuszczano w 4 ml octanu etylu. Wszystkie te zabiegi przeprowadzano w ciemności w temperaturach obniżonych ($+1^{\circ}$ i $+5^{\circ}\text{C}$). Końcowy, oczyszczony ekstrakt przechowywano w ciemności, w temperaturze -14°C . Tak przygotowany ekstrakt poddawano rozdzielowi chromatograficznemu.

Zastosowano chromatografię bibułową wstępującą. Układem rozwijającym był izopropanol : amoniak : woda (10 : 1 : 1 v/v). Rozdziału dokonywano na paskach bibuły Whatman 1, o wymiarach 2×20 cm. Każdorazowo przed naniesieniem badanego ekstraktu bibułę przemywano dwukrotnie rozpuszczalnikami (10 : 1 : 1) oraz wodą redestylowaną. Jednorazowo наносzono na bibułę ekstrakt w ilości odpowiadającej 20 g badanego ziarna. Chromatogramy rozwijano w ciemności, w temperaturze około 20°C .

Następnie, po wysuszeniu cztery chromatogramy z każdej próbki zostały podane badaniom wstępnym. Na dwóch chromatogramach, po ich uprzednim pocieciu na dziesięć dwucentymetrowych skrawków, wyznaczono strefy biologicznie

aktywne, za pomocą biotestu auksynowego i giberelinowego. Na pozostałych dwóch chromatogramach sprawdzano wyniki biotestu, stosując UV w atmosferze nasyconej parami amoniaku oraz barwne reakcje chemiczne. Jako wywoływacza używano dwuazowanego kwasu sulfanilowego oraz chlorku żelaza w kwasie siarkowym (Lane i Bailey 1964). W ten sposób zlokalizowane strefy chromatogramów, poddawano dalszym dokładnym badaniom. Ekstrakt z każdej próbki ziarna analizowano na czterech równoległych chromatogramach i następnie po wysuszeniu, strefy chromatogramów wykazujące aktywność biologiczną były ekstrahowane wodą. Każdy ekstrakt badano jednocześnie testem auksynowym i giberelinowym. Oba wyżej wymienione testy biologiczne stosowano w czterokrotnym powtórzeniu, zaś w każdym powtórzeniu było dwanaście obiektów testowych (wycinków rośliny testowej).

Test auksynowy. Za pomocą tego testu badano właściwości inhibitora jako antagonisty wzrostu indukowanego przez kwas indoliloctowy (IAA). Do 2 ml wodnego ekstraktu z wycinków chromatogramów dodawano 1 ml 6% sacharozy, 0,1 μg IAA/1 ml oraz 0,2 ml buforu fosforanowego o pH 5,6 (Lane i Bailey 1964). Inkubację 12 subapikalnych 10-milimetrowych wycinków koleoptyla owsa przeprowadzano w 4 cm szalkach Petriego, w czasie 24 godzin, w ciemności, w temperaturze 25°C (Bentley i Housley 1954). W takich warunkach przyrost liniowy wycinków koleoptyli wynosił około 100% w stosunku do długości wyjściowej. Obecność inhibitora o działaniu antagonistycznym w stosunku do auksyny objawiała się znacznym hamowaniem wzrostu liniowego obiektu testowego. Pomiarów obiektów testowych (wycinków koleoptyli) dokonywano za pomocą rzutnika fotograficznego, stosując 5-krotne powiększenie i odrzucając dwa obiekty o wymiarach najbardziej skrajnych (Michniewicz 1961).

Test giberelinowy. Otrzymane roztwory inhibitorów były równolegle badane jako czynniki antagonistyczne w stosunku do giberelin. W badaniach tych zastosowano test pierwszego listka owsa (Michniewicz 1961; Robinson i Wareing 1965; Michniewicz i Kopcewicz 1966). Wycinki chromatogramów ekstrahowano etanolem. Etanol odparowywano w próbkach, do których następnie wprowadzano pożywkę składającą się z 2 procentowego wodnego roztworu glukozy i 0,1 μg kwasu giberelinowego (GA_3) w 1 ml. Inkubację przeprowadzano w ciągu 24 godzin w temperaturze +30°C, w ciemności (Michniewicz 1961). Podobnie jak przy użyciu testu auksynowego, obecność inhibitora ujawniała się hamowaniem przyrostu liniowego obiektu testowego. Kontrolę stanowiły przyrosty uzyskane na ekstraktach z bibuły chromatograficznej, na którą zamiast badanych inhibitorów został naniesiony czysty octan etylu.

Każda wielkość aktywności inhibitora z określonej próby ziarna, wyrażona testem auksynowym lub giberelinowym, jest średnią z 40 pomiarów obiektów testowych. Wyniki pomiarów zostały przedstawione za pomocą rysunków i wykresów.

Kwasy nukleinowe. Zawartość kwasów nukleinowych i wolnych związków purynowych w ziarnie jęczmienia określono metodą spektrofotometryczną na podstawie zasad purynowych (Nietupska i in. 1964).

Oznaczanie związków purynowych. Utrwalone we wrzącym alkoholu ziarno jęczmienia dokładnie rozcierano w moździerzu porcelanowym w obecności 7 procentowego kwasu tróchlorooctowego (KTO) w ciągu 20 minut, w temperaturze 0°C. Zawiesinę wirowano 15 minut przy 5500 g. Kwaśny ekstrakt przenoszono do kolby miarowej, zaś osad przemywano kilka razy zimnym 1% KTO i zimną wodą destylowaną. Wszystkie ekstrakty łączono razem i uzupełniano wodą do objętości 100 ml. Następnie do określonej części ekstraktu wprowadzano 10 N H_2SO_4 w takiej ilości, aby jego końcowa koncentracja równała się 1 N. Roztwór ten z kolei hydrolizowano w ciągu 1 godziny w temperaturze 100°C. Odłączone w toku hydrolizy wolne zasady purynowe wytrącano z roztworu w postaci kompleksu srebrowego, który rozpuszczano w 1 ml 1 N HCl. Po oddzieleniu $AgCl$, kwaśny roztwór, zawierający wolne zasady purynowe rozcieńczano 10 krotnie i wyznaczano jego krzywą absorpcji w ultrafiolecie w zakresie długości fal od 240–290 m μ . Ekstynkcję, która wyznaczała maksimum absorpcji tego roztworu przyjęto za podstawę do wyliczenia zawartości puryn w badanym materiale.

Oznaczanie DNA i RNA. Uzyskany osad w sposób opisany wyżej (po oddzieleniu od badanego materiału frakcji kwasorozpuszczalnej) przemywano kolejno: alkoholem etylowym, acetonem, mieszaniną etanolu i eteru i na koniec eterem, celem usunięcia z osadu podstawowej masy lipidów i barwników. Następnie osad ten traktowano 0,1 N H_2SO_4 i umieszczano w termostacie w temperaturze 37°C na czas 18 godzin. Otrzymaną mieszaninę wirowano przy 6000 g w czasie 15 minut. Supernatant zawierający puryny DNA (RNA pozostał w osadzie), hydrolizowano na wrzącej łaźni wodnej. Dalsza procedura oznaczania DNA była podobna do tej, którą stosowano przy określaniu poziomu związków purynowych.

Osad po oddzieleniu od niego DNA, hydrolizowano 1N H_2SO_4 w ciągu godziny, w temperaturze 100°C, w celu odłączenia puryn od RNA. Dalsze postępowanie związane z oznaczaniem RNA było podobne do wyżej opisanego.

Rozbieżności wyników oznaczeń RNA i DNA pomiędzy równoległymi powtórzeniami przy stosowaniu przytoczonej metody nie przekraczały 6%. Rezultaty oznaczeń tych związków w różnych organach roślinnych, przy zastosowaniu metody spektrofotometrycznej, w niewielkim stopniu różniły się od analogicznych wyników otrzymanych na tym samym materiale roślinnym za pomocą metody Schmidta i Thanhausera. Metoda spektrofotometrycznego oznaczania ilościowego RNA i DNA na podstawie zasad purynowych przydatna jest dla wielu obiektów roślinnych: formującego się i dojrzałego ziarna, liści, kielków, łodyg itp. (Nietupskaja i in. 1964).

WYNIKI I DYKUSJA

Spoczynek późniwy ziarna jęczmienia można przerwać traktując je kwasem giberelinowym, natomiast działanie IAA pozostaje bez wyraźnego wpływu. Z tego powodu, stosowany dotychczas do wykrywania inhibitorów test auksynowy (test koleoptyla owsa) wydawał się nam w badaniach inhibitorów niepełnowartościowy.

Kielkowanie ziarna jęczmienia jarego (Browarny PZHR) w okresie spoczynku posprzętnego (w %)
Germination of spring barley grains during the period of post-harvest dormancy (in %)

[illegible]

Chcąc więc uzyskać pełniejszy obraz właściwości badanych inhibitorów wzrostu zastosowano jednocześnie test auksynowy i giberelinowy.

Ziarno jęczmienia jarego w okresie posprzętnym znajdowało się w stanie spoczynku głębokiego (tab. 1). W warunkach suchego przechowywania spoczynek ten ustępował stopniowo i po 64 dniach ziarno już kiełkowało normalnie (ryc. 1). W warunkach przechowywania mokrego ziarniaki pozostają w spoczynku nawet po okresie 307 dni od sprzętu (tabela 1, próby II, III, IV, V, VI).

Głębokość spoczynku pozostawała w wyraźnym związku z aktywnością badanych inhibitorów. W analizowanym ziarnie wykryto silny inhibitor wzrostu w strefie

Ryc. 1. Średni czas kiełkowania spoczynkowego ziarna jęczmienia jarego przechowywanego w stanie powietrznie suchym

Mean time of germination of spring barley grain stored in air-dry state.

R_f 0,50–0,80. Z istniejącego piśmiennictwa wynika, że jest to tzw. β -inhibitor (Varga 1957; Lane i Bailey 1964; Robinson i Wareing 1964; Sarapuu 1965; Rejowski i Grzesiuk 1967). W innych miejscach chromatogramu nie wykryto żadnych hamujących wzrost substancji (ryc. 2). Wyekstrahowany inhibitor działał antagonistycznie zarówno w stosunku do auksyn (w mniejszym stopniu) jak i gibereliny (w większym stopniu) (ryc. 2). Głębokość spoczynku badanego ziarna pozostawała w wyraźnej korelacji z aktywnością i ustawała w wyraźnej korelacji z aktywnością inhibitora oraz poziomem kwasów nukleinowych w ziarnie (tabela 2).

Ziarno przechowywane w stanie powietrznie-suchym szybciej wychodziło ze stanu spoczynku, niż ziarno wilgotne. Zjawisko to związane było ze stopniowym zanikaniem aktywności inhibitora w ziarnie suchym (ryc. 3). Począwszy od 23 dnia po sprzęcie miało miejsce najszybsze zwiększenie się liczby ziarn kiełkujących. W tym samym okresie w warunkach przechowywania suchego zarysował się najwyraźniejszy spadek aktywności badanych związków. Zjawisko to szczególnie wyraźnie zostało stwierdzone za pomocą testu giberelinowego. Jednocześnie ziarno przechowywane w stanie powietrznie-suchym miało stosunkowo niską zawartość kwa-

Ryc. 2. Aktywność ekstraktu eterowego z dojrzałego ziarna jęczmienia jarego. Rozdziału chromatograficznego dokonano w dniu zbioru

A — Test auksynowy; B — Test giberelinowy

Activity of ether extract from ripe grain of spring barley. Chromatographic separation was made immediately after harvest.

A — Auxin test; B — Gibberellin test.

Ryc. 3. Zmiany aktywności inhibitora wyekstrahowanego z ziarna spoczynkowego jęczmienia jarego przechowywanego w stanie powietrzno suchym

A — Test auksynowy; B — Test giberelinowy.

Changes in inhibitor activity of extract isolated from spring barley grain stored in air-dry state.

A — Auxin test; B — Gibberellin test.

Tabela 2 — Table 2

Dynamika kwasów nukleinowych oraz zasad purynowych (zawartych w związkach frakcji kwasorozpuszczalnej) w okresie spoczynku ziarna jęczmienia jarego (mg/100 g suchej masy)
 Dynamics of nucleic acids and purine bases (contained in acid-soluble fraction) during the period of post-harvest dormancy of spring barley grain (mg/100 g of dry matter)

Daty analiz chemicznych Date of chemical analysis	Liczba dni po sprężeniu Number of days after harvest	Ziarno przechowywane w stanie powietrznie suchym Grain stored in air-dry condition					Ziarno nasycone wodą Grain saturated by water					
		% suchej masy ziarna Dry mass of grain in %	RNA	DNA	RNA + DNA	Zasady purynowe Purine bases	% suchej masy ziarna Dry mass of grain in %	RNA	DNA	RNA + DNA	RNA/DNA	Zasady purynowe Purine bases
18.VIII.	0	66,4	151,6	40,8	192,2	1,50	—	—	—	—	—	—
24.VIII.	6	75,4	149,2	38,4	187,6	1,80	54,2	151,4	34,4	185,8	4,4	1,62
30.VIII.	13	83,3	160,5	34,4	194,9	1,80	—	—	—	—	—	—
10.IX.	23	85,2	151,4	39,0	190,4	2,31	56,4	113,0	32,4	145,4	3,48	2,28
22.IX.	35	85,5	169,6	41,4	201,0	2,40	—	—	—	—	—	—
1.X.	44	86,0	151,4	39,6	191,0	2,34	55,0	113,0	39,6	152,6	2,85	2,91
20.X.	64	86,6	169,5	40,8	210,3	2,34	50,6	101,7	38,4	139,7	2,67	2,31

sów nukleinowych (tabela 2). Poziom RNA i DNA nie ulegał w tym czasie większym istotnym zmianom. Nawet w ziarnie, które już osiągnęło dużą zdolność kiełkowania, nie obserwowano zwiększania się zawartości kwasów nukleinowych (tabele 1 i 2, ryc. 1). Wydaje się że brak biosyntezy omawianych związków był w tym wypadku spowodowany niedostatecznym uwodnieniem tkanek zarodka i bielma. Zdaniem Marcusa i Teeley'a (1964) pęcznienie suchych nasion jest nieodzownym procesem dla aktywacji lub biosyntezy m-RNA. W ziarnie jęczmienia, które przeszło spoczynek głęboki i zaczęło kiełkować, szybko wzrastała ilość kwasów nukleinowych (RNA — 281 i DNA — 70,8 mg% w odniesieniu do suchej masy), przy znikomej jednocześnie aktywności inhibitora — β . W ziarnie takim w ogóle nie stwierdzono aktywności antyauksynowej. Przyrost 1-go listka owsa osiągnął 95% w porównaniu z kontrolą (ryc. 4). Uzyskane wyniki nie potwierdzają hipotezy Sabinina (1940 i 1957) oraz Mietlickiego i Korablewej (1965). Według tych autorów wyjście danego organu rośliny ze spoczynku uwarunkowane jest uprzednim nagromadzeniem się w jego tkankach określonej ilości kwasów nukleinowych. Są one natomiast potwierdzeniem badań Tuana i Bonnera (1964) oraz Celniker (1963). Według tych ostatnich dynamika RNA i DNA skorelowana jest z przebiegiem procesów wzrostowych rośliny. Inhibitory zaś prawdopodobnie blokując syntezę m-RNA (Nooden i Thimann 1966, Rejowski i Grzesiuk 1967) uniemożliwiają następnie syntezę białka, bez której nie może odbywać się wzrost roślin.

Ryc. 4. Aktywność ekstraktu eterowego ze skielkowanego ziarna jęczmienia jarego. Rozdziálu ekstraktu dokonano za pomocą chromatografii bibułowej

A — Test auksynowy; B — Test giberelinowy

Activity of ether extract from germinated spring barley grain. Separation was made by paper chromatography.

A — Auxin test. B — Gibberellin test.

Ryc. 5. Krzywe absorpcji w świetle ultrafioletowym zasad purynowych odłączonych od RNA i DNA ziarna spoczynkowego jęczmienia jarego

1 — Zasady purynowe odłączone od RNA. 2 — Zasady purynowe odłączone od DNA

Ultraviolet absorption spectra of purine bases separated from RNA and DNA of dormant spring barley grain.

1 — Purine bases separated from RNA; 2 — Purine bases separated from DNA

Wierzchołek absorpcji mieszaniny zasad purynowych odłączonych od RNA zawartego w ziarnie spoczynkowym przypada na długość fali 252 m μ zaś w wypadku zasad DNA krzywa absorpcji osiąga maksimum przy 254 m μ (ryc. 5). Zaobserwowane różnice w położeniu wierzchołków absorpcji badanych związków wska-

Ryc. 6. Krzywe absorpcji w świetle ultrafioletowym zasad purynowych wyizolowanych z frakcji kwasorozpuszczalnej ziarna jęczmienia jarego

1 — Ziarno kielkujące; 2 — Ziarno nasycone wodą 3 — Ziarno powietrznie suche

Ultraviolet absorption spectra of purine bases isolated from acid-soluble fraction of barley grain.

1 — Germinating grain; 2 — Grain saturated by water; 3 — Air-dry dormant grain.

Ryc. 7. Zmiany aktywności inhibitora wyekstrahowanego z ziarna spoczynkowego jęczmienia jarego pozostającego w stanie pełnego nasycenia wodą

A — Test auksynowy; B — Test giberelinowy

Changes in activity of inhibitor extracted from dormant spring barley grain after full saturation by water.

A — Auxine test; B — Gibberellin test.

zują, że stosunek guaniny do adeniny w RNA jest wyższy niż w DNA. Położenie maksimum absorpcji (biorąc pod uwagę długości fali, przy których je wyznaczano) w trakcie trwania całego doświadczenia nie ulegało zmianom. Stwierdzenie tego faktu nasuwa myśl o niezmienności składu zasad purynowych ogólnego RNA i DNA w ziarnie jęczmienia będącego w spoczynku. Również zakończenie spoczynku ziarna nie pociąga za sobą zmian w składzie tych związków.

Krzywe absorpcji zasad purynowych w ultrafiolecie osiągnęły maksimum przy

długości fali 260 m μ , co wskazuje wyraźnie, że badane związki są głównie pochodnymi adeniny (AMP, ADP, ATP) (ryc. 6). Analogiczna krzywa absorpcji dla związków otrzymanych z ziarna skielkowanego ma nieco inny kształt, z wierzchołkiem przy długości fali 255 m μ . Przesunięcie maksimum absorpcji w lewo świadczy o obecności w badanym materiale związków pochodnych nie tylko adeniny, ale również i guaniny. Spostrzeżenie to daje również podstawę do przypuszczenia, że znaczne ilości związków zawierających guaninę tworzą się dopiero w okresie kiełkowania ziarna, przy wznowionej syntezie białka. W okresie tym w skielkowanym ziarnie jęczmienia nie wykryto prawie żadnych inhibitorów biologicznie aktywnych (ryc. 4).

Szczególnie wyraźną zależność syntezy RNA od zawartości w tkankach inhibitorów wykryto w ziarnie spoczynkowym pozostającym w stanie pełnego nasycenia wodą. W ziarnie tym zawartość RNA w miarę upływu czasu wyraźnie obniżała się, zaś ilość DNA początkowo również spadała, po czym, w drugiej połowie doświadczenia, ponownie się zwiększała (tab. 2). Zawartość inhibitorów wydatnie zwiększała się w ciągu pierwszych 23 dni pęcznienia, następnie zaś ulegała tylko niewielkim zmianom (ryc. 7).

Degradacja RNA i w mniejszej mierze DNA w pęczniącym ziarnie zachodziła prawdopodobnie pod wpływem enzymów nukleolitycznych, głównie w endospermie (tabela 2). Destrukcyjna działalność nukleaz, a szczególnie RN-azy nie była więc w ziarnie pozostającym w spoczynku głębokim hamowana przez znajdujące się w nim inhibitory. Rozpad RNA i zahamowanie jego syntezy przez występujące w ziarnie spoczynkowym inhibitory byłby więc prawdopodobnie jedną z istotnych przyczyn braku zdolności do kiełkowania ziarniaków nasyconych wodą.

Poziom zasad purynowych zawartych we frakcji kwasorozpuszczalnej w ziarnie spoczynkowym jęczmienia był stosunkowo niski (tabela 2). W organach roślinnych aktywnie rosnących ilość ich jest zazwyczaj kilkakrotnie wyższa (Nietupskaja i in. 1964). W kiełkującym ziarnie jęczmienia ilość zasad purynowych była dość znaczna (13,2 mg %). Zwiększała się ona w ziarnie spoczynkowym, zarówno nasyconym wodą, jak i pozostającym w stanie powietrznie-suchym (tabela 2).

Panu Prof. Dr Stanisławowi Grzesiukowi najserdeczniej dziękujemy za życzliwą pomoc oraz wiele cennych rad i wskazówek w czasie wykonywania niniejszej pracy.

STRESZCZENIE I WNIOSKI

Praca niniejsza miała na celu wyjaśnienie przyczyn zahamowania kiełkowania jęczmienia w okresie tak zwanego spoczynku późniwego. W dojrzałym morfologicznie ziarnie jęczmienia jarego badano dynamikę endogennych inhibitorów wzrostu, kwasów nukleinowych (RNA i DNA) oraz wolnych związków purynowych.

Badania te oraz analiza piśmiennictwa pozwalają na sformułowanie niżej podanych stwierdzeń:

1. W spoczynkowym ziarnie jęczmienia wykryto duże ilości inhibitora o wartości

R_f identycznej z inhibitorem $-\beta$. Inhibitor ten przejawia większą aktywność w stosunku do testu giberelinowego niż auksynowego.

2. Ziarno spoczynkowe, przechowywane w stanie powietrznie-suchym zwiększa stopniowo swoją zdolność kiełkowania. Zjawisko to związane jest z zanikaniem aktywności inhibitora. W ziarnie takim dynamika RNA i DNA nie ulega istotnym zmianom.

3. W ziarnie, które już przeszło spoczynek głęboki, w czasie kiełkowania zwiększa się szybko zawartość RNA i DNA, a zanika zupełnie aktywność inhibitora. Dynamika RNA i DNA skorelowana jest z przebiegiem procesów wzrostowych kiełkowania rośliny. Inhibitory blokując prawdopodobnie syntezę m RNA uniemożliwiają syntezę białka.

4. Szczególnie wyraźna zależność syntezy RNA od poziomu inhibitorów w tkankach występuje w ziarnie spoczynkowym pozostającym w stanie pełnego nasycenia wodą. W ziarnie takim poziom RNA w miarę upływu czasu wyraźnie obniża się. Zjawisku temu towarzyszy wzrost aktywności inhibitorów.

5. W napęczniałym ziarnie spoczynkowym głównie w endospermie zachodzi degradacja RNA, prawdopodobnie pod wpływem enzymów nukleolitycznych. Rozpad więc RNA i zablokowanie jego resyntezy przez występujące w dużych ilościach inhibitory może być jedną z istotnych przyczyn niekiełkowania nasion spoczynkowych.

Katedra Fizjologii Roślin

Wyższej Szkoły Rolniczej w Olsztynie

Kierownik: Prof. Dr Stanisław Grzesiuk

SUMMARY AND CONCLUSIONS

The objective of this work was to explain factors that inhibit barley seed germination during the so-called after-harvest dormancy. The dynamics of endogenic growth inhibitors, nucleic acids (RNA and DNA) and of free purine compounds was studied in the morphologically ripe barley seed.

In the dormant seed great amounts of an inhibitor having R_f value identical with the β -inhibitor were found. This inhibitor shows greater activity in gibberellin test than in the auxin test.

As the time of dormancy is going on the ability of air-dry dormant seed to germinate gradually increases. This phenomenon is associated with the progressive inactivation of the inhibitor. In such a grain the dynamics of RNA and DNA does not undergo any significant variations.

In a grain that has passed its deep dormancy the germination process is accompanied by increased amounts of RNA and DNA and by reduced activity of the inhibitor. The dynamics of RNA and DNA is correlated with growth processes of the germinating seed. Protein synthesis is inhibited probably by inhibitors that block synthesis of m-RNA. This dependence of RNA synthesis upon the level of inhibitors is strikingly pronounced in the dormant seed that has been completely imbibed. In such a grain the level of RNA markedly decreases and the activity of inhibitors increases with time. In the imbibed grain, mainly in its endosperm, the degradation of RNA occurs which is probably due to nucleolytic enzymes. Therefore, decay of RNA and the blocking of its synthesis by numerous inhibitors may be responsible for inability of dormant seeds to germinate.

High School of Agriculture, Olsztyn

Department of Plant Physiology

Head: Prof. Dr Stanisław Grzesiuk

LITERATURA

- Barton L. W., 1965, Seed dormancy: General survey of dormancy types in seeds, and dormancy imposed by external agents. *Handbuch der Pflanzenphysiologie*, XV/2: 699—745.
- Bentley J. A., Housley S., 1954, Bio-assay of plant growth hormones. *Physiol. Plant.*, 7: 405—419.
- Bonner J., 1965, *The molecular biology of development*, Oxford.
- Celniker J. L., 1963, O swazi godicznogo cikla rosta pobiegow u dieriewiew s sodierżaniem nukleinowych kislot i wodnym režimom toczek rosta. *Fizjol. rast.*, 10(3): 339—351.
- Ching T. M., Foote W. H., 1961, Post-harvest dormancy in wheat varietie. *Agron. J.*, 53(3): 183—186.
- Davison R. M., 1965, Some proprieties of a plant growth inhibitor presented in xylem sap of woody species. *Austr. J. Biol. Sci.*, 18(3): 475—486.
- Hemberg T., 1961, Biogenous inhibitors. *Handbuch der Pflanzenphysiologie*. XIV: 1163—84.
- Lane F. E., Bailey L. F., 1964, Isolation and characterization studies on the β -inhibitor in dormant buds of the silver maple *Acer saccharinum* L., *Physiol. Plant.*, 17(1): 91—99.
- Luckwill L. C., 1957, Studies of fruit development in relation to plant hormones, IV. Acidic auxins and growth inhibitors in leaves and fruits of the apple. *J. Hort. Sci.*, 32(1): 18—33.
- Marcus A., Teeley J., 1964, Activation of protein synthesis in the innibition phase of seed germination. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 51(6): 1975—1979. (*Wg. Ref. Żurn.*, 15 G 15, 1965).
- Mayer A. M., Poljakoff-Mayber, 1963, *The germination of seeds*, Oxford.
- Michniewicz M., 1961. Biologiczna metoda ilościowego oznaczania kwasu giberelinowego testem pierwszego liścia owsa. *Acta Soc. Bot. Polon.* 30(3—4): 553—568.
- Michniewicz M., Kopcewicz J., 1966, The dynamics of growth substances during germination and early growth of larch (*Larix decidua* Mill.) and pine (*Pinus silvestris* L.). I. Gibberellin-like substances and inhibitors of gibberellin-induced growth. *RNR*, 90-A-4, 690—698.
- Mietlickij L. W., Korablewa N. P., 1965, *Biochimia pokoja zapasajuszczich organow rastenij*. Moskwa.
- Miyamoto T., Tolbert N. E., Everson E. H., 1961, Germination inhibitors related to dormancy in wheat seeds. *Plant Physiol.*, 36(6): 739—746.
- Nietupskaja S. W., Kuramszin G. S., Iwlewa L. A., 1964, *Biologia nukleinowego obmiena u rastenij*. Opredelenie nukleinowych kislot w rastitielnych tkaniach po purinam, Moskwa.
- Nooden L. D., Thimann K. V., 1966, Action of inhibitors of RNA and protein synthesis on cell enlargement. *Plant Physiol.*, 41: 157—164.
- Oknina U. Z., 1959, Nukleinowyje kisloty w siemienach wiszni i jabłoni. Z książki: *Biologia nukleinowego obiena*, Ufa.
- Rejowski A., Grzesiuk St., 1967, Naturalne inhibitory wzrostu i ich rola w życiu roślin wyższych. *Post. Nauk Roln.* 1(103): 9—33.
- Remy P., 1961, Recherches physiologiques sur la maturation des graines d'arbres fruitiers a noyau. *Ann. Amelior. Plantes*, 11(2): 113—298.
- Robinson P. M., Wareing P. F., 1964, Chemical nature and biological proprieties of the inhibitor varying with photoperiod in sycamore (*Acer pseudopaltanus*). *Phys. Plant.*, 17: 314—323.
- Sabinin D. A., 1940, *Mineralnoie pitanie rastenij*, Moskwa (*Wg. Vegisa*).
- Sabinin D. A., 1957, O ritmicznosti strojenija i rosta rastenij, *Bot. Żurn.* 42 (7): 991—1010.
- Sarapuu L. P., 1965, Fizjologiczeskoie dejstwie floridzina kak β -ingibitora pri rostie i pokoie u jabłoni. *Fizjol. rast.*, 12(1): 134—145.
- Szafrański P., Klita S., 1965, Kwasy nukleinowe i biosynteza białka. *Post. Biochemii*, 11(4): 459—484.
- Tuan D. V. H., Bonner J., 1964, Dormancy associated with represion of genetic activity. *Plant Physiol.*, 39(5): 768—772.
- Varga M., 1957, Egzamination of growth — inhibitory substances separated by paper chroma-

tography in fleshy fruits. III. Change in concentration of growth-inhibiting substances as a function of the ripening. *Acta Biol. Szegedensis*, 3(3—4): 225—232.

Vegis A., 1964, Dormancy in higher plants. *Ann. Rev. of Plant Physiol.* 15: 185—224.

Wareing P. F., Eagles C. F., Robinson P. M., 1963, *Regulateurs naturels de la croissance végétale. Natural inhibitors as dormancy agents* 377—386 (*Colloq. Internat. Centr. National Rech. Scient.*, 15—20 Juillet, 1963).

Wareing P. F., 1965, *Handbuch der Pflanzenphysiologie. Endogenous inhibitors in seed germination and dormancy.* 15/2: 909—924.