

## Toksyczność putrescyny pobieranej przez korzenie pomidorów

*La toxicité de la putrescine absorbée par les racines des tomates*

S. GUMIŃSKI i Z. GUMIŃSKA

### WSTĘP

Praca Richardsa i Colemana (1952) oraz Colemana i Richardsa (1956) zwróciły uwagę na występowanie putrescyny u roślin. Według tych autorów putrescyna pojawia się w liściach roślin cierpiących na niedostatek potasu. Klasycznym obiektem badań był jęczmień, lecz autorzy otrzymali podobne wyniki również z pszenicą i czerwoną koniczyną. Smith (1968) wymienia prócz jęczmienia szereg gatunków gromadzących w liściach putrescynę przy niedostatku potasu: pomidory, len, kapustę, rzodkiewkę, owies, pszenicę, żyto, sałatę, groch i buraki. Według Colemana i Richardsa (1956) karmienie roślin rubidem, a także sodem przeciwdziała akumulacji putrescyny w liściach przy braku potasu.

Smith (1968) obserwował akumulację putrescyny i agmatyny przy zakwaszaniu podłoża kwasem solnym lub siarkowym. Ponieważ kwasota soku komórkowego nie ulegała przy tym zmianie, wyraził on przypuszczenie, że tworzenie się tych amin jest wyrazem autoregulacji — równowagi kwasowo-zasadowej w komórce roślinnej, co miałoby szczególne znaczenie przy niedostatku potasu.

W pracy mikrobiologicznej, dotyczącej zakażenia pałeczki okrężnicy przez faga T 2, Mora, Young i Rizvi (1962) doszli do przekonania, że kwas dezoksyrybonukleinowy faga neutralizowany jest przez aminy dwu- i trójwartościowe: putrescynę i spermidynę. Od tej neutralizacji uzależniona jest zdolność faga do zakażenia komórki bakteryjnej.

Putrescyna jest substancją trującą i powoduje objawy chorobowe, charakterystyczne dla roślin cierpiących na brak potasu (co opisali Richards i Coleman w cytowanych wyżej pracach).

Jak wiadomo, amina ta, podobnie jak inne aminy, powstawać może nie tylko wewnątrz żywej komórki roślinnej, lecz także na skutek rozkładu białka obumarłych organizmów przez drobnoustroje. W warunkach beztlenowych istnieje możliwość pewnej akumulacji takich amin w glebie czy wodzie na skutek zahamowania aktywności odpowiednich oksydaz. Korzenie roślin, rosnące w takim środowisku, narażone mogą być na działanie amin jako produktów gnicia szczątków roślinnych

i zwierzęcych („toksyny błotne?”). Jednakże McCorquodale i Duncan (1957) donieśli, że jony wapnia, a częściowo także manganu i cynku przeciwdziałają hamowaniu wzrostu korzeni powodowanemu przez imidazol, benzimidazol oraz histaminę. Przeciwdziałanie to ma być związane z tworzeniem się chelatów tych amin z kationami metali. Stwierdzenie to ma duże znaczenie ekologiczne, gdyż jest rzeczą oczywistą, że w naturalnych środowiskach życia korzeni znajdują się zawsze jony soli mineralnych.

W związku z wynikami wyżej cytowanych prac wydawało się interesujące zbadanie efektywności putrescyny w stosunku do organizmu roślinnego, gdy korzenie pobierają ją z czystego roztworu wodnego względnie z pożywki mineralnej, a także zbadanie, czy na tę efektywność może mieć wpływ różnica w uprzednim odżywianiu się mineralnym roślin. W łączności z tymi zagadnieniami postawiliśmy sobie pytanie, czy aktywność fizjologiczna putrescyny uwarunkowana jest bezwzględnie występowaniem wolnych grup aminowych? Ponadto wzięliśmy także pod uwagę możliwości interakcji putrescyny ze związkami próchnicznymi pospolicie przecież występującymi w glebie, których działanie jest obecnie tak intensywnie badane (Gumiński 1968).

Przeprowadzone doświadczenia mają charakter badań wstępnych, pomimo to zdecydowaliśmy ogłosić ich wyniki w nadziei, że mogą one posłużyć jako wskazówki dla głębszych dociekań, do których pragnęlibyśmy pozyskać współpracę biochemików w szczególności ze względu na znaczenie poliamin dla kwasów nukleinowych (Rain, Jansen and Cohen 1967).

#### METODYKA OGÓLNA

Doświadczenia przeprowadzano w kulturach wodnych, przy czym putrescynę podawano roślinom albo przez dodawanie tej aminy do pożywek, w których one stale rosły, albo przez kilkugodzinne zanurzanie korzeni w odpowiednich roztworach wodnych aminy; w tym ostatnim wypadku rośliny rosły zarówno przed podaniem putrescyny, jak też i następnie w pożywkach wolnych od amin. Stosowano putrescynę jako wolną aminę, jako jej chlorowodorek oraz (blokując obie grupy aminowe) jako acetyloputrescynę.

Pożywka używana do doświadczeń miała skład następujący:  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  — 0,71,  $\text{KNO}_3$  — 0,57,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  — 0,28,  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  — 0,14,  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$  — 0,12 w gramach na 1 litr wody destylowanej. Pożywkę uzupełniano mikroelementami roztworu A-Z Hoaglanda nr 1 z dodatkiem molibdenu. pH ustalano na około 6,5. W niektórych doświadczeniach zmieniano skład pożywki według odpowiedniego schematu, który podany będzie przy opisie doświadczeń.

Humian sodowy otrzymywano z kompostu liściowego, stosując metodykę ekstrakcji i frakcjonowania opisaną szczegółowo w pracy ogłoszonej w 1967 r. (Gumiński i Sulej 1967). Zasada metody polega na ekstrakcji związków próchnicznych wodorotlenkiem sodowym, oddzieleniu fulw kwasów kwasem solnym, rozpuszczeniu osadu kwasów huminowych w bardzo rozcieńczonym wodorotlenku so-

dowym, wysuszeniu humianu sodowego, rozpuszczaniu w mieszaninie acetonu z wodą i przepuszczaniu roztworu przez kolumnę adsorpcyjną tlenku glinu.

Do kultur używano szklanych słoików o pojemności około 1 litra, zabezpieczonych przed działaniem światła na pożywkę.

Mieszania osadu pożywki i równocześnie jej przewietrzania dokonywano bądź to przy pomocy przepędzania powietrza motorkiem akwaryjnym bądź przez przelewanie pożywki ze słoika do słoika dwa razy dziennie. Pierwszy sposób stosowano w doświadczeniach, gdzie dodawano putrescyny do pożywki, drugi zaś wówczas, gdy rośliny rosły w pożywkach wolnych od putrescyny.

W każdym słoiku rosły 3 rośliny, umocowane watą w otworach tekturowych, parafinowanych wieczek. Kultury prowadzone były w szklarni nieklimatyzowanej, przy naturalnym oświetleniu. Długość trwania poszczególnych doświadczeń wegetacyjnych podana będzie przy poszczególnych opisach.

Gatunkiem doświadczalnym były pomidory. Nasiona kiełkowano w piasku i siewki z dwoma pierwszymi listkami przenoszono do kultur wodnych. Obserwowano rozwój roślin, a po likwidacji kultur oznaczano suchą masę pędów oraz korzeni.

Każdy obiekt doświadczalny (kombinacja względnie wariant) składał się z 6 równoczesnych powtórzeń (6 słoików, po 3 rośliny w każdym).

### PRZEBIEG DOŚWIADCZEŃ

Doświadczenie I. Rośliny rosły w kulturach wodnych przy niekorzystnych warunkach świetlnych od 14 X. do 5.XI. W ciągu tego czasu dodawano do pożywki czterokrotnie po 0,1 ml wolnej putrescyny na słoik (na 1 litr). Plan doświadczenia

Tabela — Tableau 1

Wpływ wolnej aminy oraz humianu dodanych do pożywki. Kultury wietrzone 14.X.—5.XI. 1964.  
L'influence de l'amine libre et de l'humate versé dans la solution nutritive. Cultures aérées.  
14.X.—5.XI. 1964.

Obiekty — Objets	Średnia sucha masa w mg Matière sèche — résultats moyens en mg		pH końcowe pH finale
	Pędy — Pousses	Korzenie — Racines	
Kontrola — Témoin	121,6	37,5	6,2
Humian — L'humate	143,3	35,8	6,2
Putrescyna — Putrescine	55,8	20,8	6,8—7,4
Putrescyna + humian — Putrescine + l'humate	76,3	20,8	6,8 -
Przedział ufności P = 0,05 Intervalle de confiance	35,0	7,9	

był następujący: 1. pożywka normalna — kontrola, 2. z dodatkiem humianu, 3. z dodatkiem putrescyny, 4. z dodatkiem humianu i putrescyny. Obiekty z próchnicą otrzymały na początku dawkę 100 mg humianu sodowego (nie frakcjonowanego), a po trzech dniach dodatkowo 25 mg na słój. We wszystkich kulturach przewietrzano pożywkę motorkiem akwaryjnym.

Po kilku dniach zauważono, że putrescyna hamuje wzrost roślin, a po trzech tygodniach obraz przedstawiał się następująco: Obiekty nr 1 i 2 — rośliny duże i zielone, nr 3 i 4 — małe i żółte z tym, że rośliny z humianem były cokolwiek większe i zieleniejsze niż bez humianu. Dodatek putrescyny wyraźnie podniósł pH pożywki. Wyniki liczbowe ujęte zostały w tabeli nr 1.

Tabela — Tableau 2

Wpływ chlorowodoru putrescyny i humianu dodanych do pożywki.  
L'influence de chlorhydrate de la putrescine versé dans la solution nutritive. 26.III—14.IV.1965.

Obiekty Objets	Średnia sucha masa w mg. Matière sèche en mg—resultats moyens.					
	Pożywki przewietrzane Solutions aérées		pH końcowe pH finale	Pożywki nie przewietrzane Solutions non aérées		pH końcowe pH finale
	Pędy Pousses	Korzenie Racines		Pędy Pousses	Korzenie Racines	
Kontrola Témoin	408	98	5,8	107	28	6,0
Humian L'humate	342	80	5,8	368	80	6,0
Chlorowodorek putrescyny Chlorhydrate de la putrescine	300	67	5,6—5,8	113	37	5,4—5,8
Chlorowodorek putrescyny+humian Chlorhydrate de la putrescine+l'humate	252	69	5,6—5,8	265	61	5,6—5,8
Przedział ufności P = 0,05 Intervalle de confiance	dla pędów pour les pousses		76,8	dla korzeni pour les racines		12,2

Temperatura pow. 18—20°C, wilgotność  $\pm 80\%$   
Température 18—20°C, l'humidité de l'air  $\pm 80\%$ .

Doświadczenie II. Badano wpływ chlorowodoru putrescyny oraz humianu sodowego w pożywkach przewietrzanych i nie przewietrzanych (nie poruszanych). Chlorowodorek putrescyny dodawano do pożywki po 50 mg w przeliczeniu na wolną aminę 6 razy co trzy dni, tak że razem wypadło na słój 300 mg aminy.

Rośliny rosły w kulturach wodnych od 26.III do 14.IV; wzrost ich był o wiele lepszy, niż w poprzednim doświadczeniu, prawdopodobnie ze względu na lepsze warunki świetlne. Zaobserwowano, że chlorowodorek putrescyny obniżył wyraźnie wzrost roślin w kulturach przewietrzanych tak bez humianu, jak też i z humianem. Jednakże zahamowanie wzrostu i chloroza roślin, wywołane przez aminę, były mniej silne niż w doświadczeniu poprzednim. W kulturach nie przewietrzanych rośliny były tak silnie zahamowane we wzroście z powodu braku żelaza, że sama amina nie wywarła żadnego wpływu, natomiast wystąpił normalny dodatni efekt humianu (Czerwiński 1967; Gumiński i Sulej 1967), a putrescyna efekt ten obniżyła.

Doświadczenie III. Powtórzono doświadczenie z wolną aminą przy dobrych warunkach świetlnych (4.VI—28.VI). Dawka 0,3 ml na słoje, podawana stopniowo

Tabela — Tableau 3

Wpływ wolnej aminy oraz humianu dodanych do pożywki. 4.VI.—28.VI.1965.  
L'influence de l'amine libre et de l'humate versé dans la solution nutritive. 4.VI.—28.VI.1965.

	Kontrola Témoïn	Humian L'humate	Putrescyna Putrescine	Putrescyna +humian Putrescine +l'humate
Kultury wietrzone — Cultures aérées Sucha masa pędów w mg. Matière sèche des pousses en mg. Przedział ufności $P = 0,05$ Intervalle de confiance	1698	1518	36,6	51,6
	↖ 503,7 ↗		↖ 6,2 ↗	
Sucha masa korzeni w mg Matière sèche des racines en mg. Przedział ufności — $P = 0,05$ Intervalle de confiance pH końcowe — pH finale	448,3	321,6	27,5	27,5
	↖ 98,9 ↗		↖ 6,0 ↗	
	6,0	6,8	6,4	6,0
Kultury nie wietrzone — Cultures non aérées Sucha masa pędów w mg Matière sèche des pousses en mg. Przedział ufności $P = 0,05$ Intervalle de confiance	135	1705	25,8	33,3
	↖ 260,8 ↗		↖ 6,5 ↗	
Sucha masa korzeni w mg Matière sèche des racines en mg. Przedział ufności $P = 0,05$ Intervalle de confiance pH końcowe — pH finale	35	419	20,0	23,3
	↖ 55,9 ↗		↖ 7,8 ↗	
	5,6	5,4—6,4	8,0	8,0

Temperatura pow. 20—30°C, wilgotność wzg.  $\pm 80\%$ .

Température 20—30°C, l'humidité de l'air  $\pm 80\%$ .

po 0,1 ml, co drugi dzień całkowicie zahamowała wzrost roślin, a humian tylko w bardzo niewielkim stopniu złagodził ten efekt. Natomiast putrescyna, zatrdując rośliny, zanulowała dodatni efekt humianu w kulturach nie przewietrzanych.

Dalsze podawanie putrescyny, stosowane na innych równocześnie badanych obiektach, doprowadziło przy dawce 0,5 ml do obumarcia prawie wszystkich, a przy dawce 1 ml do zniszczenia wszystkich roślin w pożywce bez humianu; w pożywkach z putrescyną i humianem przeżyły pojedyncze okazy, wykazujące zresztą silne objawy chorobowe (rozpad tkanek korzeni, chloroza i plamistość liści).

Tabela — Tableau 4

Wpływ wolnej aminy, acetyloputrescyny i dwu frakcji humusowych dodanych do pożywki. Kultury wietrzone. 16.II.—24.III. 1966.

L'influence de l'amine libre, de l'acetylputrescine et de deux fractions d'humate versé dans la solution nutritive. Cultures aérées. 16.II.—24.III. 1966.

Obiekty — objets	Średnia sucha masa w mg Matière sèche — resultats moyens en mg		pH końcowe pH finale
	Pędy — pousses	Korzenie — racines	
Kontrola — Témoin	720,0	137,5	5,2—5,6
Frakcja — Fraction II	620,0	121,6	5,2—5,4
Frakcja — fraction III	881,6	163,3	5,2—5,6
Acetyloputrescyna 0,4 g*)			
l'acetylputrescine „	39,1	21,6	6,8—7,0
Acetyloputrescyna 0,4 g+fr. II			
l'acetylputrescine „ „	55,0	23,3	6,6—7,0
Acetyloputrescyna 0,4 g+fr. III			
l'acetylputrescine „ „	168,2	40,0	7,0
Acetyloputrescyna 0,12 g**			
l'acetylputrescine „	419,1	120,0	6,4—6,8
Acetyloputrescyna 0,12 g+fr. II	714,1	184,1	6,8
l'acetylputrescine „ „			
Acetyloputrescyna 0,12 g+fr. III			
l'acetylputrescine „ „	710,8	161,6	6,6—6,8
Putrescyna — putrescine 0,2 g	126,6	36,6	6,8—7,0
Putrescyna-putrescine 0,2 g+fr. II	123,3	48,3	7,0
Putrescyna-putrescine 0,2 g+fr. III	168,3	45,8	6,4—7,0
Putrescyna-putrescine 0,06	739,1	150,0	6,0—6,4
Putrescyna-putrescine 0,06g+fr. II	667,5	132,5	6,0—6,4
Putrescyna-putrescine 0,06 g+fr. III	689,1	120,0	6,0—6,4
Przedział ufności — Intervalle de confiance	88,2	16,85	

Temperatura powietrza — température de l'air 15—20°C

Wilgotność powietrza — L'humidité de l'air ±80%.

\* 0,4 g acetyloputrescyny odpowiada 0,2 g putrescyny.

\* 0,4 g l'acetylputrescine correspond à 0,2 g de la putrescine.

\*\* 0,12 g acetyloputrescyny odpowiada 0,06 g putrescyny

\*\* 0,12 g l'acetylputrescine correspond à 0,06 g putrescine.

Doświadczenie IV. Porównywano działanie wolnej putrescyny z efektywnością acetyloputrescyny bez humianu oraz w jego obecności w pożywce, którą codziennie przewietrzano. Zastosowano dwie dawki: po 0,01 g i 0,1 g w przeliczeniu na wolną aminę co trzy dni. Mniejsze dawki powtórzono sześciokrotnie, tak że na słoję wypadało łącznie 0,06 g.

Większe dawki zastosowano jedynie dwukrotnie, gdyż okazały się silnie toksyczne; łącznie podano więc w tym wypadku 0,2 g. Humian zastosowano w ilości 60 mg na słoję używając dwóch frakcji rozpuszczalnych w mieszaninie acetonu z wodą: 1. nie adsorbującej się na tlenku glinu (nr II) i 2. najsilniej się adsorbującej (nr III) (Gumiński i Sulej 1967). Wszystkie kultury przewietrzano.

Acetyloputrescyna wykazała silniejsze hamowanie wzrostu, niż amina wolna, a humian łagodził toksyczność amin (zwłaszcza frakcja trzecia).

Doświadczenie V. Rośliny rosły przez cztery tygodnie w normalnej pożywce. Następnie zanurzano je korzeniami na 8 godzin alternatywnie w następujących kąpielach: 1) w wodzie destylowanej, 2) w roztworze humianu sodowego 0,1 g na litr,

Tabela — Tableau 5

Ośmiogodzinne zanurzanie korzeni do wodnych roztworów putrescyny, acetyloputrescyny i humianów. Średnia sucha masa z 6 powtórzeń (każde po 3 rośliny) w mg  
Immersion des racines dans les solutions aqueuses de la putrescine, de l'acetylputrescine et de l'humate, durante pendant 8 heures. Matière sèche — résultats moyens de six répétitions (chaque de 3 plantes)

Roztwór — Solution	Pędy — Pousses en mg	Korzenie — racines en mg
Woda — l'eau	758,3	181,6
Humian — L'humate	866,6	101,6
Putrescyna — putrescine 0,1 M	90,0	16,0
Potrescyna 0,1 M + humian		
Putrescine 0,1 M + l'humate	113,0	18,0
Putrescyna — putrescine 0,01 M	360,3	83,0
Putrescyna 0,01 M + humian		
Putrescine 0,01 M + l'humate	420,0	126,6
Amina 0,1 M jako acetyloputrescyna		
Amine 0,1 M comme acetylputrescine	413,3	113,3
Amina 0,1 M jako acetylputrescyna + humian.		
Amine 0,1 M comme acetylputrescine + l'humate	543,3	125,0
Amina 0,01 M jako acetyloputrescyna		
Amine 0,01 M comme acetylputrescine	626,6	160,0
Amina 0,01 M jako acetyloputrescyna + humian.		
Amine 0,01 M comme acetylputrescine + l'humate.	938,3	218,3
Przedział ufności — Intervalle de confiance	25,4	23,0

Kultury wodne przed zabiegiem 20.VIII—15.IX., po zabiegu 15.IX.—3.X.1966. Cultures aqueuses avant l'administration de la putrescine 20.VIII.—15.IX. et après 15.IX.—3.X.1966.

Temperatura powietrza 18—26°C, wilgotność powietrza ±80%.

Température de l'air 18—26°C, l'humidité de l'air ±80%.

3) w roztworze 0,1 mol. putrescyny, 4) 0,01 mol. putrescyny, 5) 0,1 mol. tejże aminy w formie acetyloputrescyny, 6) 0,01 mol., jak poprzednio. Równocześnie zastosowano te same kombinacje z aminami, dodając po 0,1 g na litr humianu sodowego. Z kolei rośliny umieszczono znowu w normalnej pożywce, gdzie rosły przez następne trzy tygodnie (po trzy rośliny w jednym słoju, z sześcioma powtórzeniami dla każdej kombinacji-obiektu). Pożywki były wietrzone (mieszane) przez przelewanie.

Rośliny moczone w aminach rosły gorzej, bądź też o wiele gorzej niż moczone w wodzie, a traktowane silniejszymi stężeniami wykazywały ciężkie objawy chorobowe zwłaszcza na korzeniach; objawy te, jak śluzowacenie korzeni i plamistość oraz chloroza liści, z czasem ustępowały. Wolna amina pokazała się tym razem znacznie bardziej toksyczna niż jej pochodna acetylowa. Humian podziałł wyraźnie korzystnie we wszystkich obiektach, z wyjątkiem silniejszej dawki wolnej aminy, gdzie pozostał bez wpływu. Jednakże w tym ostatnim wypadku dawka aminy okazała się letalna.

Doświadczenie VI. Następne doświadczenie przeprowadzono w podobny sposób, porównując działanie wolnej aminy z efektywnością chlorowodorku putrescyny. Stężenia stosowano takie jak poprzednio, odnosząc je tak samo do wolnej aminy. Ponieważ wolna amina reaguje silnie alkalicznie, więc jako kontroli użyto nie tylko czystej wody, lecz także roztworu NaOH o odpowiednim pH dla danej kombinacji. Humianu nie stosowano.

Rośliny uprawiano w normalnej pożywce przez dwa tygodnie, następnie moczone korzenie przez 8 godzin w odpowiednich roztworach, po czym uprawiano rośliny przez dalsze dwa tygodnie w kulturach wodnych z normalną pożywką.

Tabela — Tableau 6

Ośmiogodzinne zanurzanie korzeni w roztworze wodnym putrescyny i jej chlorowodorku. Średnia sucha masa w mg

Immersion des racines dans les solutions aqueuses de la putrescine ainsi que de chlorhydrate de cette amine pendant 8 heures. Matière sèche. Moyenne en mg

Roztwór — Solution	Pędy — Pousses mg	Korzenie — Racines mg
Putrescyna — putrescine 0,1 M	51,6	10,0
NaOH — pH = 0,1m putrescyny — de la putrescine	233,3	73,2
Putrescyna — putrescine 0,01 M	117,5	22,5
NaOH — pH = 0,01 M putrescyny, de la putrescine	218,3	65,0
Chlorowodorek putrescyny 0,1 M		
Chlorhydrate de la putrescine 0,1 M	44,2	10,0
Chlorowodorek putrescyny 0,01 M		
Chlorhydrate de la putrescine 0,01 M	240,0	76,6
Woda — l'eau	240,0	76,6
Przedział ufności — Intervalle de confiance	17,6	9,2

Kultury wodne przed zabiegiem 30.III.—12.IV., po zabiegu 12.IV.—26.IV.1967. Cultures aqueuses avant l'administration de la putrescine 30.III.—12.IV., et après 12.IV.—26.IV.1967.

Temperatura powietrza 18—30°C, wilgotność powietrza ±80%.

Température de l'air 18—30°C, l'humidité de l'air ±80%.



Dawka 0,1 molowa zarówno wolnej aminy, jak i chlorowodorku zabiła rośliny, natomiast przy dawce mniejszej, 0,01 mol., jedynie wolna amina hamowała wzrost siewek. Alkalizowanie kąpieli przy pomocy NaOH nie przejawiało wpływu na wzrost roślin.

Tabela — Tableau 7

Traktowanie wodnym roztworem putrescyny korzeni roślin uprawianych poprzednio na pożywkach z różnymi dawkami: K, Ca i P

Traitement des racines par une solution aqueuse de la putrescine des plantes précédemment cultivées dans des aliments avec des différentes doses de: K, Ca et P

Pożywka Aliment	Roztwór — solution	Sucha masa — Matière sèche	
		Pędy — pousses mg	Korzenie — racines mg
Normalna	Putrescyna — putrescine 0,1 M	39,1	13,6
Normale	„ „ 0,01 M	280,0	58,3
„	NaOH — pH = 0,1 M putrescine	406,0	98,0
„	„ „ 0,01 M „	433,0	102,0
1/3 K	Putrescyna — putrescine 0,1 M	33,0	11,6
„	„ „ 0,01 M	285,0	64,1
„	NaOH — pH = 0,1 M putrescine	565,0	134,1
3 × K	Putrescyna — putrescine 0,1 M	35,0	12,0
„	„ „ 0,01 M	208,3	50,0
„	NaOH — pH = 0,1 M putrescine	436,6	111,6
1/3 Ca	Putrescyna — putrescine 0,1 M	29,1	10,0
„	„ „ 0,01 M	70,8	10,0
„	NaOH — pH = 0,1 M putrescine	438,3	102,5
3 × Ca	Putrescyna — putrescine 0,1 M	46,6	10,6
„	„ „ 0,01 M	281,6	55,0
„	NaOH — pH = 0,1 M putrescine	570,0	115,0
1/3 P	Putrescyna — putrescine 0,1 M	29,1	10,0
„	„ „ 0,01 M	129,1	24,1
„	NaOH — pH = 0,1 M putrescine	105,0	24,1
3 × P	Putrescyna — putrescine 0,1 M	22,5	10,0
„	„ „ 0,01 M	105,8	21,6
„	NaOH — pH = 0,1 M putrescine	96,6	25,0
Przedział ufności — Intervalle de confiance		63,7	18,6

Kultury wodne przed zabiegiem 15.IV. — 29.IV, po zabiegu 29.IV. — 13.V. Cultures aqueuses avant l'administration de la putrescine 15.IV. — 29.IV, et après 29.IV. — 13.V. 1967.

Temperatura powietrza — température de l'air 18–32°C.

Wilgotność względna powietrza — l'humidité de l'air ± 80%.

Doświadczenie VII. Uprawiano pomidory przez dwa tygodnie w kulturach wodnych ze zróżnicowaną pożywką. Zróżnicowanie to odnosiło się do dawek potasu, wapnia i fosforu. Plan tego zróżnicowania widoczny jest na tabeli wyników (tabela 7). Gdy zmniejszono do 1/3 dawkę potasu, wyrównywano niedostatek azotu dodając odpowiedniej ilości azotanu amonu; przy zwiększonej trzykrotnie dawce potasu dodawano go w formie chlorku. Analogicznie postępowano przy zróżnicowaniu dawki wapnia. Zwiększoną dawkę fosforu podano w formie  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ .

Następnie zanurzano korzenie na 8 godzin do roztworów 0,1 względnie 0,01 molarowych putrescyny (wolnej aminy), stosując jako kontrolę roztwór NaOH o odpowiednim pH. Z kolei umieszczono rośliny w kulturach wodnych z normalną pożywką, gdzie rosły przez dalsze dwa tygodnie. Pożywki we wszystkich kulturach przewietrzano przez przelewanie.

Obserwacja rozwoju roślin wykazała, że większa dawka putrescyny podziałała zabójczo na rośliny. W szczególności zniszczeniu uległy korzenie. Mniejsza dawka także uszkodziła korzenie, lecz zostały one dosyć szybko zregenerowane i w rezultacie rośliny, choć opóźnione we wzroście, kontynuowały swój rozwój.

Wzrost roślin kontrolnych (nie traktowanych putrescyną) wykazał, że mniejsza dawka potasu w pożywce służącej roślinom przez pierwsze dwa tygodnie była właściwsza dla roślin i przeciwnie — zwiększona dawka wapnia wpłynęła korzystnie na wzrost. Natomiast zarówno zmniejszenie, jak i zwiększenie dawki fosforu odbiło się bardzo ujemnie na wzroście roślin. Efektywność putrescyny na tle uprzedniego karmienia roślin badanymi makroelementami okazała się zależna jedynie od dawek wapnia. Mianowicie rośliny wyrosłe na pożywce z trzykrotnie zmniejszoną dawką wapnia zostały znacznie silniej zahamowane we wzroście przez małą dawkę aminy aniżeli we wszystkich innych kombinacjach.

Tabela — Tableau 8

Pięciogodzinne zanurzanie korzeni w słabych roztworach wodnych putrescyny i wpływ humianu w kulturach wodnych po tym zabiegu. Średnia sucha masa w mg  
Immersion des racines dans des faibles solutions aqueuses de la putrescine et l'influence de l'humate dans les aliments des cultures suivantes. Matière sèche moyenne en mg.

Roztwór — Solution	Pożywka bez humianu Aliment sans l'humate		Pożywka z humianem Aliment + l'humate	
	Pędy pousses	Korzenie racines	Pędy pousses	Korzenie racines
Putrescyna — putrescine 0,01 M	38,0	6,0	80	18,0
„ „ 0,001 M	450,0	112,5	480,0	101,6
„ „ 0,0001 M	356,6	90,0	331,6	91,0
NaOH o pH = 0,01 M putrescine	325,0	75,0	304,0	51,0
Chlorowodorek putrescyny 0,01 M				
Chlorhydrure de la putrescine „	221,6	63,3	321,0	67,5
Chlorowodorek putrescyny 0,001 M				
Chlorhydrure de la putrescine „	320,0	75,0	346,0	67,5
Chlorowodorek putrescyny 0,0001 M				
Chlorhydrure de la putrescine	308,0	83,3	261,6	56,0
H <sub>2</sub> O	201,0	66,0	260,0	58,3
Przedział ufności — Intervalle de confiance				
dla pędów — pour les pousses	31,4			
dla korzeni — pour les racines	20,3			

Kultury wodne przed zabiegiem 16.V.—30.V., po zabiegu 30.V.—13.VI. Cultures aqueuses avant l'administration de la putrescine 16.V.—30.V., et après 30.V.—13.VI. 1967.

Temperatura powietrza — température de l'air 18—30°C. Wilgotność względna powietrza — l'humidité de l'air ±80%.

Doświadczenie VIII. Uprawiano pomidory przez dwa tygodnie w kulturach wodnych z pożywką normalną. Następnie moczone korzenie przez 5 godzin w roztworach 0,01 mol., 0,001 mol. i 0,0001 mol. wolnej putrescyny względnie jej chlorowodoru. Zastosowano zatem krótsze moczenie korzeni i w słabszych stężeniach aniżeli w podobnie przeprowadzonym uprzednio doświadczeniu szóstym (VI). Jako kontrolę stosowano moczenia w roztworach NaOH o odpowiednim pH względnie w wodzie. Następnie przeniesiono rośliny do kultur wodnych z normalną pożywką względnie z pożywką, do której dodano humianu sodowego w ilości 100 mg na litr. Rośliny rosły w tych warunkach przez następne dwa tygodnie.

Najwyższa dawka wolnej aminy podziałała wyraźnie szkodliwie (żółknięcie i silne zahamowanie wzrostu); średnia pobudziła wzrost roślin, a najniższa nie wywołała wyraźnego efektu. Rośliny które otrzymały najwyższą dawkę chlorowodoru nie różniły się od kontrolnych, przy niższych dawkach zauważono efekt stymulacyjny. Jednakże podkreślić należy, że rośliny kontrolne serii chlorowodoru rosły słabiej od roślin kontrolnych serii putrescyny.

Dodatek humianu do pożywki, w której rośliny rosły po moczeniu ich korzeni w odpowiednich roztworach, nie zmienił zasadniczego obrazu reakcji na aminy, jednakże osłabił niekorzystny wpływ najsilniejszego stężenia putrescyny.

Doświadczenie IX Uprawiano pomidory przez dwa tygodnie w kulturach wodnych z normalną pożywką. Następnie moczone korzenie przez 5 godzin w roztworach: 0,001, 0,01 i 0,1 M wolnej putrescyny podanej w alternatywie w wodzie destylowanej, w pełnej pożywce lub w roztworach następujących soli:  $K_2HPO_4$ ,

Tabela — Tableau 9

Interakcja putrescyny i soli mineralnych przy krótkotrwałym moczeniu korzeni  
Interaction de la putrescine et des sels minéraux pendant une immersion passagère des racines

Sucha masa całych roślin; średnie z 6 powtórzeń. Jedno powtórzenie = 3 rośliny  
Matière sèche des plantes entières; resultats moyens de six répétitions. Unet répétitions = 3 plantes

	Bez putrescyny Sans putrescine	Z dodatkiem putrescyny Avec de la putrescine		
	ciężar — poids g	0,001 M	0,01 M	0,1 M
Pełna pożywka Solution complète	1530,0	2140,0	1573,3	206,2
Woda destylowana Eau distillé	1676,0	1701,6	571,6	126,6
$KH_2PO_4$	2280,0	2102,0	843,3	213,3
$Ca(H_2PO_4)_2$	1900,0	1722,0	956,6	232,0
KCl	2370,0	106,0	705,0	202,0
$CaCl_2$	2355,0	1690,0	918,0	215,0

Przedział ufności — Intervalle de confiance: 35,3

P = 0,05

$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ ,  $\text{KCl}$  i  $\text{CaCl}_2$ . Jako kontrolę zastosowano moczenie w wodzie destylowanej, względnie w roztworach odpowiednich soli bez putrescyny. Stężenie roztworów poszczególnych soli odpowiadało ich koncentracji w normalnej pożywce. Po zabiegu umieszczono korzenie roślin w zlewkach z pełną pożywką bez putrescyny i po kilku godzinach przeniesiono rośliny do normalnych kultur wodnych (do 1-litrowych słoików) z czystą pożywką, w której rosły przez następne dwa tygodnie. Po tym terminie kultury likwidowano i oznaczono suchą masę roślin.

Zarówno obserwacje w czasie wzrostu, jak też i oznaczenie ich suchej masy wykazały, iż obecność soli mineralnych w roztworze silnie obniżała toksyczność putrescyny. Najmniejszą aktywność przejawiała amina dodana do pełnej pożywki, najsilniejszą zaś podana w wodzie destylowanej. Spomiędzy czterech badanych jonów: potasowych, wapniowych, fosforanowych i chlorkowych wydaje się, że najsilniej osłabiały aktywność putrescyny jony wapniowe. Ubocznie zaobserwowano, że kilkugodzinne moczenie korzeni w niezbalansowanych roztworach pojedynczych soli nie było zabiegiem obojętnym. Zabieg ten powodował wyraźną stymulację wzrostu roślin.

#### DYSKUSJA WYNIKÓW

Otrzymane wyniki wskazują, że putrescyna jest niewątpliwie trucizną dla pomidorów. Obecność soli mineralnych w roztworze, z którego korzenie pobierają putrescynę, nie niweluje toksycznego działania tej aminy, gdyż 0,03 % stężenie putrescyny w pożywce mineralnej zatruwało rośliny w naszych doświadczeniach. Nie uprawnia to jednak do wniosku, że jony soli mineralnych nie mają żadnego znaczenia dla efektywności putrescyny.

Zablokowanie wolnej grupy aminowej przez acetylowanie zmieniło efektywność biologiczną putrescyny w dosyć charakterystyczny sposób. O ile bowiem podawanie wolnej aminy w roztworze wodnym powodowało silniejszy efekt toksyczny niż podawanie w tych samych warunkach acetyloputrescyny, to w pożywce mineralnej rzecz się miała odwrotnie. Że nie chodziło w tym wypadku o niespecyficzny efekt alkaliczności roztworu wolnej aminy dowodzi tego porównanie wpływu moczenia korzeni w roztworze putrescyny i wodorotlenku sodowego o tym samym pH oraz w roztworze o pH obojętnym. Mniejszą toksyczność wolnej aminy aniżeli jej acetylowanej pochodnej w pożywce mineralnej można tłumaczyć reakcjami zachodzącymi pomiędzy putrescyną i jonami soli mineralnych, które to reakcje uniemożliwione zostają przez zablokowanie grup aminowych na skutek ich acetylowania. Równocześnie trzeba stwierdzić, że acetylacja grup aminowych putrescyny, chociaż czyni ten związek chemicznie niereaktywnym, to jednak nie odbiera mu aktywności biologicznej. Prawdopodobnie zostaje on enzymatycznie rozszczepiony (z uwolnieniem putrescyny i kwasu octowego).

Chlorowodorek putrescyny okazał się cokolwiek mniej biologicznie efektywny od putrescyny samej, nie tylko w czystym roztworze wodnym, lecz także — i to

w większym raczej stopniu — w obecności soli mineralnych. W wypadku chlorowodoru mamy do czynienia nie z blokowaniem grup aminowych jak przy acetyloputrescynie, lecz z ich przekształceniem i wytworzeniem soli amoniowej. Możemy tylko zanotować fakt osłabienia efektywności fizjologicznej putrescyny na skutek takiego przekształcenia chemicznego, brakuje nam natomiast podstaw dla biologicznej interpretacji zjawiska tego osłabienia aktywności. Z punktu widzenia chemicznego chlorowodorek putrescyny powinien być podobnie reaktywny jak putrescyna, z tą jedynie różnicą, iż nie alkalizuje roztworu w przeciwieństwie do putrescyny; ten moment jednak w naszych doświadczeniach nie odgrywał roli, jak tego dowodzą próby kontrolne z wodorotlenkiem sodowym.

Bardzo małe stężenia putrescyny, jak też jej chlorowodoru, wywołały w naszych doświadczeniach nie ujemny, lecz odwrotnie — dodatni wpływ na wzrost (przyrost suchej masy) roślin. Tego rodzaju stymulacja przy małych stężeniach substancji trujących występuje często i zjawisko to nie stanowi zaskoczenia.

W doświadczeniach ze zróżnicowanym karmieniem mineralnym przed podaniem putrescyny ujawniła się pewna zależność reakcji roślin na putrescynę od zasobności pożywki w wapń. Ponieważ w tym wypadku putrescyna nie była dodawana do pożywki, lecz moczoło korzenie w jej roztworze wodnym dopiero po wyjęciu z pożywki, nie można myśleć o wpływie środowiskowym wapnia na putrescynę. Przypuszczamy, że w grę wchodziła tutaj sprawa odporności i zdolności do restytucji korzeni atakowanych przez aminę podczas ich moczenia w jej roztworze wodnym. W opisie doświadczeń wspomnieliśmy o niszczeniu korzeni przez putrescynę i późniejszej ich regeneracji w kulturach wodnych. Jest rzeczą prawdopodobną, że zasobność rośliny w wapń ułatwia tę regenerację. Nie mamy potrzeby przytaczać tu danych z literatury, gdyż znaczenie wapnia przy tworzeniu się korzeni oraz ich włóśników jest powszechnie podkreślane.

Takie tłumaczenie znajduje poparcie w reakcji roślin kontrolnych, których korzenie moczoło w roztworach NaOH o odpowiednim pH. Prawdopodobnie i ten zabieg nie był obojętny, chociażby ze względu na zmianę wartości osmotycznej roztworu; cierpiały na tym zapewne przede wszystkim włóśniki. Otóż i dla roślin kontrolnych zwiększenie dawek wapnia, względnie powiększenie stosunku wapnia do potasu w pożywce pierwotnej (przed zabiegiem) okazało się korzystne. Jeśli przyjąć, że mamy tu do czynienia z uszkodzeniem korzeni i późniejszą ich restytucją, to wpływ nasycenia tkanek jonami wapnia wydaje się zrozumiałą.

Doświadczenie z moczeniem korzeni w roztworze putrescyny w obecności soli mineralnych i porównawcze w czystym roztworze wodnym tej aminy wykazało, że obecność soli mineralnych wyraźnie obniża efektywność putrescyny. Spomiędzy czterech jonów, zastosowanych w odpowiednich kombinacjach jako pojedyncze sole, wydaje się, że najsilniej osłabiały efektywność putrescyny jony wapniowe. Jednakże pełna pożywka działała o wiele silniej odtruwająco aniżeli którakolwiek z pojedynczych soli użytych do doświadczeń.

Wynik tego doświadczenia (nr IX) w zestawieniu z rezultatem eksperymentu, w którym uprzednio uprawiano rośliny w pożywkach zróżnicowanych pod wzglę-

dem składu mineralnego, a następnie moczo no ich korzenie w czystym roztworze wodnym putrescyny (doświadczenie nr VII), a także porównanie efektywności wolnej aminy i jej pochodnej acetylowanej wobec roślin w czystym roztworze i w pożywce mineralnej skłaniają do przekonania, że sole mineralne obniżały efektywność putrescyny zarówno reagując bezpośrednio z aminą w środowisku zewnętrznym, jak też i działając wewnątrz organizmu roślinnego.

Związki próchniczne łagodziły w pewnej mierze toksyczność putrescyny. Działania tego chyba nie można tłumaczyć pośrednim wpływem poprzez sole mineralne, gdyż występowało ono nie tylko wtedy gdy humian dodawano do pożywki mineralnej, lecz także i wówczas, gdy dodawano go do roztworu wodnego putrescyny, w którym moczo no korzenie. Ten łagodzący wpływ związków próchnicznych występował zarówno wtedy gdy stosowano cały nie rozdzielony na frakcje tzw. humian sodowy, jak też i wówczas, gdy dodawano do pożywki dwie frakcje: II i III. Frakcje te różnią się od siebie krańcowo we właściwościach kompleksotwórczych w stosunku do żelaza oraz w zdolności do adsorpcji na tlenku glinu (Gumiński i Sulej 1967). Widocznie te różnice fizykochemiczne, skądinąd jak najbardziej istotne dla fizjologicznej efektywności związków próchnicznych (Gumiński i Sulej 1967), nie miały w interakcji z putrescyną zasadniczego znaczenia. Podnieść jednak należy, że frakcja III, najsilniej adsorbująca się na tlenku glinu i nie przejawiająca zdolności do wiązania jonów żelaza, wydatniej łagodziła toksyczność putrescyny aniżeli frakcja II odznaczająca się przeciwnymi właściwościami.

Humian wywarł także wpływ dodatni na wzrost roślin, gdy dodano go do pożywki, w której rośliny rosły po zabiegu moczenia ich korzeni w roztworze putrescyny (doświadczenie VIII).

Natomiast charakterystyczny dodatni wpływ humianu w kulturach z nie przewietrzaną pożywką był silnie osłabiany, lub wręcz anulowany przez putrescynę (dośw. II i III). Jest to zrozumiałe, gdy się zważy, że w tych warunkach humian ratował rośliny przed głodem żelaza (Czerwiński 1967; Gumiński i Sulej 1967), a putrescyna działała toksycznie niezależnie od zaopatrzenia rośliny w żelazo.

Stężenia putrescyny, stosowane przez nas, dobraliśmy w doświadczeniach orientacyjnych, opierając się na danych zawartych w pracach Richardsa i Colemana poprzednio przez nas cytowanych. Stosowaliśmy znacznie niższe stężenia w doświadczeniach, przy których dodawaliśmy putrescynę do pożywek, w których rośliny rosły, aniżeli w tych doświadczeniach, gdzie moczyliśmy korzenie roślin w roztworach putrescyny jedynie przez kilka godzin.

Efektywność putrescyny w stosunku do roślin jest oczywiście zależna od ich stanu fizjologicznego. Stan ten z kolei uzależniony jest od szeregu czynników i dlatego nie można porównywać efektów odpowiadających sobie stężeń putrescyny w różnych, przeprowadzonych przez nas doświadczeniach. O warunkach wegetacji roślin dostarczyć mogą jedynie orientacyjnych wskazówek wartości suchej masy roślin w danym okresie wegetacji, które podaliśmy przy każdej tabeli wyników.

## WNIOSKI

1) Putrescyna pobierana przez korzenie jest toksyczna nie tylko w czystym roztworze wodnym, lecz także w pożywce mineralnej. Jednakże obecność soli mineralnych w roztworze obniża efektywność tej aminy.

2) Sole mineralne przeciwdziałają toksyczności putrescyny nie tylko wówczas gdy podane są razem z aminą, lecz także i wtedy gdy pobierane są uprzednio przez roślinę. Odnosi się to w pierwszym rzędzie do jonów wapnia.

3) Zablokowanie wolnych grup aminowych przez acetylowanie powoduje zmniejszenie toksyczności putrescyny w czystym roztworze wodnym, natomiast w roztworze soli mineralnych (pożywce) acetyloputrescyna wykazuje silniejsze działanie trujące niż wolna amina.

4) Humian sodowy łagodzi toksyczne działanie putrescyny tak w czystej wodzie jak też i w pożywce mineralnej.

5) Bardzo małe dawki putrescyny pobudzają wzrost roślin (przyrost suchej masy).

Autorzy wyrażają podziękowanie p. mgr Marii Gracz za cenną pomoc techniczną.

## STRESZCZENIE

Badano wpływ putrescyny na pomidory rosnące w kulturach wodnych, przy czym aminę dodawano do pożywki mineralnej tych kultur, lub też zanurzano korzenie na kilka godzin do wodnego roztworu aminy. Stosowano putrescynę w postaci wolnej aminy, jej chlorowodorku i acetyloputrescyny. W roztworze wodnym wolna amina okazała się bardziej toksyczna aniżeli jej pochodna acetylowana; w pożywce mineralnej stosunek efektywności uległ odwróceniu. Chlorowodorek działał podobnie jak wolna amina, jednakże wyraźnie słabiej. Bardzo małe dawki putrescyny pobudzały wzrost (przyrost suchej masy) roślin.

Badano wpływ zmian ilościowych potasu, wapnia i fosforu w pożywce na toksyczność putrescyny względem roślin wyrosłych na tej pożywce, którym następnie podano putrescynę przez moczenie korzeni w roztworze wodnym aminy. Stwierdzono wzmoczenie toksyczności przy zmniejszonej dawce wapnia.

Humian obniżał toksyczność putrescyny zarówno w pożywce mineralnej, jak i w roztworze wodnym.

*Katedra Fizjologii Roślin i Ogród Botaniczny  
Uniwersytetu Wrocławskiego  
Wrocław, ul. Kanonia 6/8*

(Wpłynęło 14.4.1969 r.)

## RÉSUMÉ

On a étudié l'influence de la putrescine sur les plantes des tomates croissantes dans les cultures aquatiques en y ajoutant de la putrescine dans la solution nutritive ou bien en immergeant les racines pendant quelques heures dans une solution aqueuse de cette amine. La putrescine était administrée sous la forme de l'amine libre, de son chlorhydrate et de l'acetylputrescine. Dans la solution aqueuse

c'est l'amine libre qui c'est montrée plus toxique en comparaison de son dérivée acétylique; dans la solution nutritive le rapport de l'efficacité fut retourné. Le chlorhydrate de la putrescine agissait d'une manière égale comme l'amine libre, quoique moins distinctement. Les doses minuscules de la putrescine stimulaient la croissance des plantes (l'augmentation de la matière sèche).

D'ailleurs on a étudié l'influence des variations quantitatives de potassium, de chaux et de phosphore dans la solution nutritive sur la toxicité de la putrescine pour les plantes, qui étant crues dans cette solution, étaient ensuite traitées de la putrescine par l'immersion des racines dans la solution aqueuse de l'amine. Une augmentation de la toxicité fut constatée en cas d'une restriction de chaux dans la solution nutritive.

La toxicité de la putrescine fut restreinte par l'addition de l'humate de soude également dans la solution nutritive ainsi que dans une solution aqueuse.

#### LITERATURA

- Coleman R. G. and Richards F. J., 1956, Physiological studies in plant nutrition XVIII. Some aspects of nitrogen metabolism in barley and other plants in relation to potassium deficiency, *Annales of Botany N.S.* 20: 393—409.
- Czerwiński W., 1967, Znaczenie humianu sodowego w kulturach wodnych pod kątem widzenia czynnika minimum, *Acta Soc. Bot. Pol.* 36: 549—554.
- Gumiński S., 1968, Sowremiennye toczki zrenia na mekhanizm fizjologiczeskikh effektov, wyzyvajemykh w rastitelnykh organizmach gumusowymi sojedinenijami, *Poczwovedenje* N° 9: 62—69.
- Gumiński S. et Sulej J., 1967, La relation entre certaines qualités physicochimiques des composés humiques et leur activité biologique, *Acta Soc. Bot. Pol.* 36: 109—122.
- McCorquodale D. J. and Duncan R. E., 1957, Plant growth inhibition by certain imidazole compounds and their preventions with metal ions, *Amer. J. Bot.* 44: 715—722.
- Mora P. T., Young B. G. and Rizvi S., 1962, Inactivation of bacteriophage with polyanions and the role of amines in activity, *J. Biol. Chem.* 237: 157.
- Rain A., Jansen M. and Cohen S., 1967, Polyamin and the accumulation of ribonucleic acid in some polyauxotrophic strains of *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.* 94: 1684—1696.
- Richards F. J. and Coleman R. G., 1952, Occurrence of putrescine in potassium — deficient barley, *Nature (Lond)* 170: 460.
- Smith T. A., 1968, The biosynthesis of putrescine in higher plants and its relation to potassium nutrition, Recent aspects of nitrogen metabolism in plants, *Proceedings of a symposium held at Long Ashton Research Station University Bristol 16—19 April 1967*, edited by E. J. Hewitt and C. V. Cutting, Academic Press, London—New York: 139—146.