

KAZIMIERZ KRAWIARZ

Występowanie i zmiany zawartości inhibitora wzrostu w stratyfikowanych nasionach dzikiej czereśni (*Prunus avium* L.)

WSTĘP

Stan spoczynku roślin pozwala na przetrwanie niekorzystnych dla ich wegetacji warunków (zima, susza) i jak sugeruje to Vegis [45] jest wynikiem ewolucyjnego przystosowania. Stan spoczynku nasion nie dopuszcza do skielkowania w niekorzystnej porze roku dla ich dalszego rozwoju. W praktyce ogrodniczej ustępowanie spoczynku nasion przebiega podczas stratyfikacji w odpowiedniej dla gatunku temperaturze, podobnie jak w naturze podczas stratyfikacji naturalnej. Stratyfikacja polega na wymieszaniu nasion z medium stratyfikacyjnym utrzymującym odpowiednią wilgotność i zapewniającym swobodną wymianę gazową.

Optymalne warunki termiczne stratyfikacji nasion dzikiej czereśni (*Prunus avium* L.) ustalił eksperymentalnie Suszka [37]. W podanych przez tego autora warunkach stratyfikacji ciepło-chłodnej nasiona kiełkują w znacznie wyższym procencie aniżeli podczas stratyfikacji w stałej obniżonej temperaturze. Poza Suszką nikt nie badał dotąd procesów fizjologicznych przebiegających w nasionach dzikiej czereśni stratyfikowanych metodą ciepło-chłodną. Szczególnie interesujące i ważne dla poznania natury spoczynku nasion są badania substancji wzrostowych. Suszka w 1964 r. (nie opublikowane) wykrył w kwaśnej frakcji eterowej wodnych wyciągów z nasion dzikiej czereśni aktywny inhibitor w teście odcinków koleoptyle owsa. Celem niniejszej pracy było szczegółowe zbadanie natury inhibitora oraz jego udziału w spoczynku nasion dzikiej czereśni.

I. PRZEGLĄD LITERATURY

Przyjmuje się, że inhibitory wzrostu występujące w roślinach biorą udział w ich spoczynku [5, 8, 11, 12, 13, 16, 17, 18, 32, 35, 41, 42, 45, 46, 47, 49, 50, 51]. Obecność inhibitorów wykazano u przedstawicieli wielu rodzin, w różnych częściach roślin: w pączkach [12, 16, 48, 49], w bulwach [13], w liściach [9, 10, 29, 31, 38, 39], w korzeniach [44], w owocach [1, 2, 29, 40, 41, 42, 47] oraz w nasionach [5, 17, 18, 32, 33, 35, 46, 49].

Substancje inhibujące znajdowano w ekstraktach roślinnych po ich rozdziale chromatograficznym dzięki zastosowaniu testów biologicznych, głównie testów wydłużeniowych odcinków koleoptyle owsa i pszenicy, opracowanych przez Nitscha w 1956 r. [19, 20]. Substancje aktywne w testach identyfikowano z plamami ujawniającymi się w odpowiednich strefach R_F chromatogramów, po zastosowaniu różnych wywoływaczy. Hemberg [12, 13], Lane [16], Varga [40, 41, 42, 43, 44] i inni badacze nazywali inhibitor ze strefy R_F 0.5 - 0.85 (izopropanol-amoniak-woda 10:1:1) β -inhibitorem, za Benet-Clarkiem i Keffordem. Hemberg [13] w szczegółowych badaniach stwierdził, że inhibicja powodowana przez ekstrakty z bulw ziemniaka ze strefy chromatogramu ze zlokalizowanym β -inhibitorem, była duża w fazie spoczynku i malała w miarę jego ustępowania.

Próby identyfikacji związków wywołujących hamowanie wzrostu roślin testowych napotykały na duże trudności. Varga [40, 41] badała ekstrakty wielu gatunków roślin, które zawierały inhibitor wykazywany testem, sugerowała przy tym, że hamowanie wzrostu roślin testowych powodują związki fenolowe.

Addicot ze współpracownikami [1, 2, 22] badał substancje obecne w owocach bawełny przyspieszające odcinanie ich szypulek, przy czym udało się im wykryształować jedną z tych substancji i ustalić jej własności fizyczne i chemiczne. Nazwano ją „Abscisin II” [2, 22].

Wareing i inni badacze [31, 49, 50] badali inhibitory w liściach brzozy (*Betula pubescens* L.) i jawora (*Acer pseudoplatanus* L.) ze względu na ich związek ze spoczynkiem. Ustalili oni, że inhibitor nie jest związkiem fenolowym, jak to sugerowała Varga [41, 42]. Udało im się ustalić jego własności fizyczne i chemiczne. Nowo wykrytą substancję nazwano „Dorminą”. Cornforth [9] stwierdził identyczność abscysyny II i dorminy, bo spektrum absorpcji w podczerwieni, temperatura topnienia i krzywa absorpcji w ultrafiolecie, były identyczne [10]. Okuma ze współpracownikami [23] ustalił, że abscysyna jest sesquiterpenoidem i podał jej wzór chemiczny. Cornforth [8] potwierdził badania Okumy i uzyskał syntetycznie abscysynę. Syntetyczną abscysynę użyto w wielostronnych badaniach prowadzonych w celu ustalenia jej wpływu na rośliny, aktywności w biotestach i udziału w procesach biochemicznych [4, 6, 7, 14, 21, 25, 32, 36, 38]. Stwierdzono przy tym, że abscysyna jest bardzo aktywna w testach koleoptyle owsa i pszenicy [21], w testach dla giberelin [4, 6, 7] i w testach wykazujących jej wpływ na kiełkowanie nasion [4, 21, 36]. Abscysyna jest związkiem działającym antagonistycznie w stosunku do auksyny i giberelin [4, 6, 7, 21, 38]. W 1968 r. nazwano abscysynę, ze względu na jej budowę chemiczną, kwasem abscysynowym [3].

Ostatnie badania endogennych substancji wzrostowych przynoszą dane, które nasuwają nowe koncepcje spoczynku. W myśl tych kon-

cepcji dla ustąpienia spoczynku wymagany jest odpowiednio wysoki poziom stymulatorów. Zostało to stwierdzone w nasionach jesionu (*Fraxinus excelsior* L.) i w orzechach leszczyny (*Corylus avellana* L.) przez Viliersa i Wareinga [46, 47] oraz Frankland [11]. W przypadku nasion leszczyny chłodzenie powoduje wzrost poziomu giberelin [11], te zaś odwracają efekt inhibitorów [4, 21, 35].

Jackson [15] wysuwa koncepcję regulacji spoczynku, która polega na interakcji zachodzącej między stymulatorami i inhibitorami.

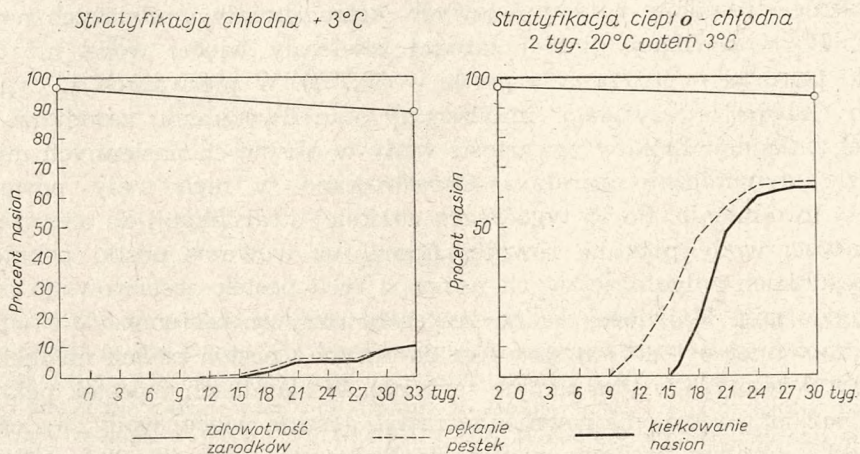
II. MATERIAŁ I METODY

1. MATERIAŁ NASIENNY

a) Stratyfikacja i ustępowanie spoczynku nasion

Suszka [37] ustalił eksperymentalnie, że nasiona dzikiej czereśni kiełkują w znacznie wyższym procencie podczas stratyfikacji ciepło-chłodnej obejmującej 2 tygodnie w 20°C i kilkanaście tygodni w 3°C, niż podczas stratyfikacji w stałej temperaturze +3°C dotąd powszechnie stosowanej [27, 28, 26, 30, 52].

Nasiona dzikiej czereśni użyte do doświadczeń zebrano w 1968 r. z drzewa nr 8, z matecznika nasiennego Zakładu Dendrologii i Arboretum Kórnickiego w Kórniku. Natychmiast po zbiorze w pełni dojrzałych owoców oczyszczono je z miąższu i pestki suszono w ocienionym miejscu w temperaturze pokojowej do stanu powietrznie suchego (9,3% wody w świeżej masie). Oznaczenia zawartości wody dokonano metodą standardową (suszenie w 105°C przez 24 godziny). Cały zapas pestek przechowywano aż do momentu rozpoczęcia doświadczenia w napełnionych do po-



Ryc. 1. Przebieg pęknięcia pestek i kiełkowania nasion dzikiej czereśni (*Prunus avium* L.) podczas stratyfikacji ciepło-chłodnej i chłodnej

łowy, zalakowanych butelkach, w temperaturze $+1^{\circ}\text{C}$. Pestki zastratyfikowano 25 XI 1968 r. według wspomnianej metody w mieszaninie składającej się w jednej części z piasku kwarcowego i w jednej części z torfu ogrodniczego przetartego przez sito. Zdrowotność nasion na początku stratyfikacji wynosiła 97,0%, co ustalono metodą barwienia indygo-karminem 1 : 2000.

W oddzielnym doświadczeniu obserwowano przebieg pęknięcia i kiełkowania nasion, dzięki czemu uzyskano obraz ustępowania spoczynku tych nasion podczas stratyfikacji ciepło-chłodnej (2 tygodnie 20°C , a następnie 3°C) oraz stratyfikacji jedynie w chłodzie, w $+3^{\circ}\text{C}$. Wyniki przedstawiono na ryc. 1.

b) Charakterystyka fizjologiczna stratyfikowanych nasion

Zawartość wody dobrze charakteryzuje stan fizjologiczny nasion, jak to stwierdził Suszka [37]. Zewnętrznym objawem ustępowania spoczynku nasion odpowiadają zmiany zawartości wody w zarodkach i okrywkach nasiennych. Również w niniejszej pracy badano zmiany zawartości wody w kolejnych terminach pobierania próbek do analiz. Zawartość wody oznaczano oddzielnie w zarodkach, w okrywkach nasiennych oraz w skorupkach. Wyniki wyrażono w procentach wody w świeżej masie. Przebieg krzywych wyrażających zmiany zawartości wody w zarodkach, okrywkach nasiennych, skorupkach oraz w całych pestkach (z wyliczenia) przedstawiono na ryc. 2.

W podsuszonych pestkach zawartość wody w zarodkach (5,2%) była niższa od wilgotności całych pestek (9,3%).

Pobieranie wody w czasie stratyfikacji miało charakter dwufazowy. Pierwszą fazę charakteryzowało silne imbibicyjne pobranie wody i odtworzenie stosunków wilgotnościowych, które istniały w świeżych nasionach. Po stratyfikacji ciepłej zarodki zawierały więcej wody niż całe pestki (zarodki — 60,5%, całe pestki — 40,7%). W pierwszych 12 tygodniach chłodnej stratyfikacji imbibicyjny stan uwodnienia zarodków nie ulegał zmianom. Zmiany zawartości wody w okrywkach nasiennych miały bardziej dynamiczny charakter. Obserwowano w nich stały powolny wzrost uwodnienia. Po 15 tygodniach chłodnej stratyfikacji do oznaczenia zawartości wody pobrano również liczne już wówczas pestki pęknięte. W stosunkach wilgotnościowych nasion z tych pestek obserwowano duże zróżnicowanie. Najwięcej wody zawierały okrywy nasienne (71,6%), co oznacza wzrost o 10,2% w stosunku do okryw z nasion pestek niepękniętych, a pobranych w tym samym terminie. W zarodkach z pestek pękniętych poziom uwodnienia również wzrastał. Jeszcze więcej wody zawierały zarodki i okrywy nasienne nasion skielkowanych (zarodki 68,2, okrywy nasienne 78,0%). Wilgotność skorupki stratyfikowanych pestek nie podlegała istotnym zmianom.

ekstrakty eterowe wytrząsano z 5% kwaśnym węglanem sodu o pH 9,0. Ekstrakty węglanowe natychmiast zakwaszono kwasem siarkowym do pH 2,5 i wytrząsano z eterem dwuetylowym. We frakcji eterowej znajdują się substancje wzrostowe o charakterze kwaśnym. Ekstrakt eterowy umieszczano na noc w zamrażarce o temperaturze -20°C , dzięki czemu wymrażano wodę. Eter zlewano znad lodu i odparowywano. Oleistą pozostałość podejmowano etanolem. Kolbę przemywano porcjami, a ekstrakt przenoszono do kalibrowanej probówki, w której delikatnym strumieniem azotu zagęszczano do 1 ml.

b) Chromatografia

Rozdzielenia substancji dokonano przy pomocy chromatografii bibułowej techniką wstępującą: Ekstrakt наносono na bibułę Whatman Nr. 3 jednostronnie, paskiem o długości 5 cm, przy czym 1 cm bieżący odpowiadał 60 nasionom. Chromatogramy rozwijano do wysokości 20 cm w układzie izopropanol-amoniak-woda (10 : 1 : 1) według Nitscha [19]. Chromatogramy oglądano pod lampą Minerallight Ultra Violet Lamp, Short Wave-11, o emisji fali 254 nm zaznaczając przy tym świecące lub wygaszające plamy.

c) Test biologiczny

Oceny aktywności biologicznej rozdzielonych chromatograficznie substancji dokonano stosując opracowany przez Nitscha test wydłużeniowy odcinków koleoptyle pszenicy (Ostka Chłopicka jara). Chromatogramy dzielono pionowo na paski o szerokości 1 cm, z każdego chromatogramu brano 2 paski, które dzielono poziomo między linią startu a czołem rozpuszczalnika na 20 odcinków 1×1 cm. Podobne odcinki chromatogramu wycięte poniżej linii startu używano jako kontrolne. Odcinki zalewano 1 ml 0,5% roztworu wodnego sacharozy i wytrząsano w małych buteleczkach przez 20 min. Po dodaniu odcinków koleoptyli (po 10 sztuk) buteleczki umieszczano w termostacie o temperaturze 25°C . Po 20 godzinach mierzono odcinki pod lupą binokularową, po czym obliczano wartości średnie, które wyrażano w procentach przyrostu kontroli. Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej. Indywidualne wartości procentowe obliczone dla każdej ekstrakcji oddzielnie stanowiły podstawę do obliczenia wartości, poza którymi istotne są wychylenia na uzyskanych histogramach.

d) Identyfikacja inhibitora

Do ekstrakcji użyto niestratyfikowanych, przechowywanych przez 1 rok nasion dzikiej cereśni ze zbioru 1968 r., z drzew nr 4, 8, 10 rosnących w mateczniku nasiennej Zakładu Dendrologii i Arboretum Kórnickiego PAN w Kórniku. 262,7 g nasion zmielono na mąkę, którą odłuszczone eterem naftowym w aparacie Soxhleta. Suchą pozostałość ekstrahowano dalej 3-krotnie wodą o temperaturze 80°C po 20 minut, po czym odwirowywano każdorazowo ekstrakty przy 2000 obr./min. Supernatanty zbierano i po zakwaszeniu ekstrahowano eterem dwuetylowym według podanej już metody. Po odparowaniu kwaśnej frakcji eterowej suchą pozostałość podejmowano wodą i przepuszczano przez kolumnę Al_2O_3 Fluka 5016 A w celu oddzielenia polifenoli według metody Tomaszewskiej [39], po czym kolumnę przemywano wodą. Eluat odparowywano do sucha i podejmowano etanolem. Chromatograficznego rozdziału dokonano techniką chromatografii cienkowarstwowej na żelu krzemionkowym FG-254 Mercka. Obok ekstraktu наносono na płytce jako wzorzec syntetyczny kwas absycynowy. Płytki oglądano w świetle ultrafioletowym (254 nm i 365 nm), spryskiwano 5% roztworem H_2SO_4 w etanolu. Kwas absycynowy daje z tym reagen-

tem barwną reakcją w postaci zielonej fluorescencji widocznej w ultrafiolecie (365 nm).

Badano następujące solwenty:

1. Benzen — kwas octowy — woda (1 : 1 : 1) R_F 0,25
2. Chloroform — 96% kwas octowy (95 : 5) R_F 0,44
3. Benzen — octan etylu — kwas mrówkowy (70 : 30 : 5) R_F 0,60

We wszystkich trzech solwentach stwierdzono identyczność pozycji R_F badanego inhibitora z nasion dzikiej czereśni oraz identyczność barwnej reakcji z wzorcem syntetycznym. Zachowanie się w biotestach, pozycja aktywnej strefy w bioteście zgodna z pozycją, którą zajmuje syntetyczny kwas abscysynowy naniesiony na tym samym chromatogramie jako kontrola oraz barwne testy w trzech różnych solwentach, są identyczne z syntetycznym wzorcem i stanowią dowód identyczności inhibitora naturalnie występującego w nasionach dzikiej czereśni z kwasem abscysynowym.

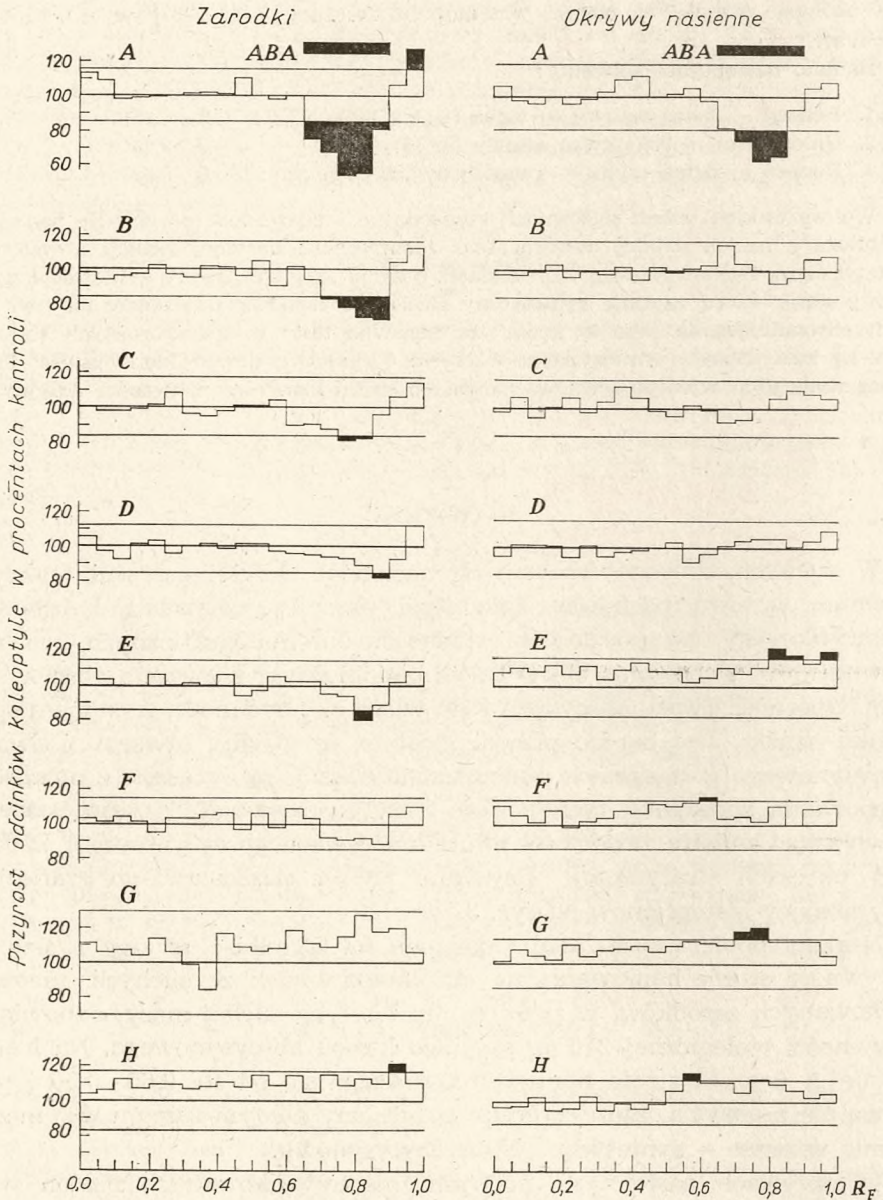
III. WYNIKI

W suchych, niestratyfikowanych nasionach dzikiej czereśni wykryto inhibitor wzrostu odcinków koleoptyle pszenicy. Nieznaną substancję zidentyfikowano na podstawie własności chromatograficznych, reakcji barwnej oraz zachowania się w teście biologicznym z kwasem abscysynowym. Obecność kwasu abscysynowego wiąże się, być może, ze stanem spoczynku nasion. Jest bardzo prawdopodobne, że zmiany zawartości kwasu abscysynowego w nasionach podczas stratyfikacji są związane z procesem ustępowania spoczynku tych nasion. Przy zastosowaniu biotestu starano się wykazać zmiany zawartości inhibitora (kwasu abscysynowego) w różnych okresach stratyfikacji. Uzyskane wyniki przedstawiono graficznie przy pomocy histogramów na ryc. 3.

Nasiona pobierane do analiz dzielono na zarodki i okrywy nasienne. Aktywność strefy hamowania na chromatogramach ze suchych, niestratyfikowanych zarodków, w przeliczeniu na 1 kg suchej masy, odpowiada aktywności biologicznej 210 μg czystego kwasu abscysynowego. Na histogramie A (ryc. 3) strefa hamowania rozciąga się od R_F 0,65 - 0,90 i pokrywa się z pozycją, którą zajmuje naniesiony na tym samym chromatogramie wzorzec — syntetyczny kwas abscysynowy.

W okrywkach nasiennych, suchych, niestratyfikowanych nasion wykryto prawie 2,5-krotnie więcej inhibitora niż w zarodkach; zajmuje on pozycję identyczną z wzorcem (R_F 0,70 - 0,90). W 1 kg suchej masy okryw nasiennych stwierdzono obecność 488,59 μg równoważnika kwasu abscysynowego.

Po 2 tygodniach stratyfikacji w 20°C ekstrakty z zarodków hamują wzrost odcinków koleoptyle w mniejszym stopniu. Strefa hamowania odpowiada pozycji kwasu abscysynowego (R_F 0,70 - 0,90). W przeliczeniu na 1 kg suchej masy zarodki zawierają 88,0 μg równoważnika kwasu abscysynowego, co stanowi około 40% ilości początkowej.



Ryc. 3. Zmiany zawartości kwasu absycynowego w zarodkach i okrywach nasennych dzięki cereśni stratyfikowanych metodą ciepło-chłodną (2 tygodnie w 20°C +20 tygodni w 3°C): Test wydłużeniowy odcinków koleoptyle pszenicy. Solwent: izopropanol — amoniak — woda (10 : 1 : 1). Testowane próbki z chromatogramów odpowiadają ekstraktowi z 60 nasion

Poziome linie oznaczają najmniejsze istotne różnice w stosunku do kontroli (100%) przy poziomie ufności $P=0,95$. Każdy histogram jest oparty o 4 biotesty (2 biotesty po 2 powtórzenia). A — suche niestratyfikowane nasiona, B — 2 tygodnie stratyfikacji w 20°C, C — po 3 tygodniach stratyfikacji w 3°C, D — po 6 tygodniach stratyfikacji w 3°C, E — po 9 tygodniach stratyfikacji w 3°C, F — po 12 tygodniach stratyfikacji w 3°C, G — po 15 tygodniach stratyfikacji w 3°C (pestki pęknięte), H — po 20 tygodniach stratyfikacji w 3°C (nasiona skielkowane)

Analiza biologiczna ekstraktu z okryw nasiennych z nasion stratyfikowanych w 20°C przez 2 tygodnie nie wykazała obecności strefy hamowania na chromatogramach. Można zatem przypuszczać że inhibitor znika całkowicie z okryw nasiennych.

Dalsze analizy przeprowadzano w odstępach 3-tygodniowych liczonych od początku chłodnego okresu stratyfikacji. Po 3 tygodniach zarodki zawierały 10% początkowej ilości inhibitora, bo 32,4 µg równoważnika ABA na 1 kg suchej masy (histogram C, R_F 0,75 - 0,85). W ekstraktach z okryw nasiennych tych nasion nie wykazano obecności substancji hamujących.

W kolejnych terminach stratyfikacji (6 i 9 tygodni) w zarodkach wykryto 15,7 i odpowiednio 17,5 µg równoważnika kwasu abscysynowego. W następnym terminie (12 tygodni) nie stwierdzono statystycznie istotnego hamowania w teście, możemy zatem przyjąć, że inhibitor w stratyfikowanych przez taki okres nasionach dzikiej czereśni, nie był już obecny. Nie wykryto również stref inhibicji w ekstraktach z zarodków z pestek pękniętych i nasion kiełkujących. Należy podkreślić, że obok inhibitorów wzrostu odcinków koleoptyle, stwierdzono również obecność stymulatorów. W niestratyfikowanych zarodkach obecna jest substancja (R_F 1,0 izopropanol-amoniak-woda 10 : 1 : 1) stymulująca wzrost odcinków koleoptyle, która znika w ciepłym okresie stratyfikacji.

Analizy okryw nasiennych wykazały, że w miarę przedłużania okresu chłodnego pojawiają się na chromatogramach strefy stymulacji wzrostu odcinków koleoptyle. Po 9 tygodniach na histogramach stwierdzono dwie strefy stymulacji (R_F 0,80 - 0,90 oraz R_F 0,95 - 1,0). Po 12 tygodniach chłodzenia w okrywach nasiennych pojawia się nowa strefa stymulacji (R_F 0,70 - 0,80). Nie jest wykluczone, że ten nieznan, aktywny w teście związek, odgrywa jakąś rolę w procesie pęknięcia pestek.

Po 20 tygodniach stratyfikacji w 3°C do analiz pobrano nasiona skiełkowane. Na histogramach uzyskanych z analizy zarodków oraz okryw nasiennych widoczne są strefy stymulacji wzrostu odcinków koleoptyle w strefach chromatogramu R_F 0,90 (zarodki) i R_F 0,55 (okrywy nasienne).

W przedstawionej tu pracy nie identyfikowano substancji stymulujących wzrost odcinków koleoptyle.

Stymulatory obecne w późnych fazach stratyfikacji w pestkach pękniętych i w skiełkowanych nasionach w zarodkach i okrywach nasiennych, być może biorą udział w regulacji procesu pęknięcia pestek i kiełkowania nasion.

IV. DYSKUSJA

Dobrze znane zjawisko spoczynku nasion nie zostało dotąd w pełni wyjaśnione. Istnieje kilka teorii tłumaczących mechanizm spoczynku nasion. V e g i s [45] przywiązuje wielkie znaczenie do roli okryw nasien-

nych i przypuszcza, że spoczynek jest spowodowany w podwyższonej temperaturze na skutek ograniczenia pobierania tlenu przez zarodek. W stratyfikacji ciepło-chłodnej początkowy ciepły okres ma wyraźnie korzystny wpływ na proces ustępowania spoczynku, co dla dzikiej czereśni ustalił Suszka [37]. W porównaniu z dotychczas stosowaną stratyfikacją w chłodzie [26, 27, 28, 30, 52] metoda ta okazała się znacznie skuteczniejsza.

Hipotezę, że spoczynek powoduje inhibitor wysunął Hemberg. Badał on inhibitory w bulwach ziemniaka [13] i w pączkach jesionu *Fraxinus excelsior* [12] i ustalił związek między poziomem inhibitorów a stanem spoczynku. Podobne obserwacje poczynił Wareing [49]. Lane [16] stwierdził, że inhibitor ten pochodzący z różnych źródeł ma podobne właściwości chemiczne i fizyczne. Szczególnie intensywnie pracowała nad inhibitorem Varga [40, 41, 42, 43, 44]. Sugerowała ona, że to związki fenolowe powodują inhibicję wzrostu odcinków koleoptyle.

Badania inhibitorów wzrostu roślin (dormin) w liściach jawora (*Acer pseudoplatanus*) prowadzone przez Wareinga [50] oraz substancji przyspieszających odcinanie owoców bawełny (abscysyn) prowadzone przez Addicota [1] uwieńczone zostały identyfikacją tych inhibitorów. Obydwa okazały się identyczne pod względem chemicznym, czego dowiódł Cornforth [8, 10]. Nowo wykrytą substancję nazwano w 1968 r. kwasem abscysynowym [3]. Inhibitor wzrostu odcinków koleoptyle pszenicy wykryty w toku przedstawionej tu pracy w nasionach dzikiej czereśni zidentyfikowano z kwasem abscysynowym.

Stan spoczynku nasion jak się przypuszcza jest związany z obecnością kwasu abscysynowego [17, 32, 35, 36], a poziom tego inhibitora obniża się podczas stratyfikacji. Takie zależności w nasionach brzoskwini wykryli Lipe i Crane [17], w nasionach jabłoni Rudnicki [32], a w nasionach jesionu (*Fraxinus americana*) Sondheimer, Tzou i Galson [35, 36].

Rudnicki i Suszka [33] badali niespoczynkowe nasiona klona srebrzystego (*Acer saccharinum* L.) i wykazali obecność kwasu abscysynowego w świeżo zebranych nasionach. Podczas kiełkowania w ciągu 8 dni inhibitor znika. Podobne wyniki uzyskali Sondheimer, Tzou i Galson [36], którzy badali spoczynkowe nasiona *Fraxinus americana* L. i niespoczynkowe nasiona *Fraxinus ornus* L. Stwierdzili, że podczas stratyfikacji w chłodzie poziom kwasu abscysynowego w nasionach *Fraxinus americana* obniżył się do poziomu kwasu abscysynowego zawartego w nasionach *Fraxinus ornus* nie wymagających stratyfikacji.

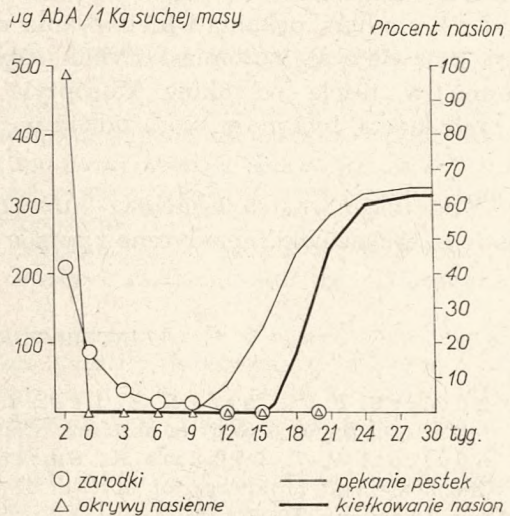
Niewiele jest prac poświęconych fizjologii spoczynku nasion dzikiej czereśni [26, 27, 28, 30, 37]. Jedynie Suszka [37] badał podczas stratyfikacji ciepło-chłodnej niektóre procesy fizjologiczne w nasionach tego gatunku. Pozostałe prace dotyczą nasion stratyfikowanych w stałej obniżonej temperaturze. Wyniki badań Pillaya [26, 27, 28], który rów-

niez badał endogenne substancje wzrostowe w nasionach dzikiej czereśni i stosował podobne metody, budzą szereg wątpliwości. Stratyfikował on nasiona jedynie w chłodzie i wykazywał od początku stratyfikacji obecność stymulatorów, a nigdy inhibitorów, mimo że stosował test odcinków koleoptyle pszenicy.

Zewnętrzny objawem ustępowania spoczynku jest pęknięcie pestki, a dalej kiełkowanie polegające na wydłużaniu się i wzroście korzonka. Podział komórek, a w konsekwencji wzrost korzenia, uwarunkowany jest przez wzmoczenie aktywności mitotycznej jąder komórkowych wierzchołka wzrostu korzenia. Podział mitotyczny komórki poprzedza replikacja DNA. Rozpoczęcie aktywności mitotycznej wiąże się również z syntezą enzymów i zwiększeniem aktywności metabolicznej, po czym dopiero rozpoczyna się widoczne kiełkowanie.

Hemberg [14] i van Overbeek [25] a również Chrispeels i Varner [6, 7] wykazali, że kwas abscysynowy hamuje proces replikacji DNA, syntezy RNA i białek. Spadek poziomu inhibitora podczas stratyfikacji nasion być może odblokowuje represję syntezy DNA, za którym postępują syntezy enzymów, a następnie również regulatorów wzrostu. Nie znamy dotąd odpowiedzi, podczas jakiej reakcji następuje degradacja inhibitora.

W naszych badaniach stwierdzono, że inhibitor obecny na początku stratyfikacji w zarodkach stratyfikowanych metodą ciepło-chłodną w stosunkowo dużym stężeniu, znika po 12 tygodniach stratyfikacji w 3°C. Oznacza to, że proces ustępowania spoczynku nasion zakończył się i nasiona zaczynają kiełkować. Przebieg tego procesu przedstawiono na ryc. 4.



Ryc. 4. Zmiany zawartości inhibitora wzrostu (kwasu abscysynowego) w zarodkach i okrywkach nasennych podczas ustępowania spoczynku nasion dzikiej czereśni (*Prunus avium* L.) w warunkach stratyfikacji ciepło-chłodnej (2 tygodnie 20°C a następnie 3°C

Ryugo [34] badał inhibitory zawarte w endokarpie migdałów (endokarp odpowiada skorupce pestek dzikiej czereśni) i stwierdził, że znajduje się tam kwas abscysynowy.

V. WNIOSKI

1. Potwierdzono wyniki badań Suszki [37]:

a) Stan spoczynku nasion dzikiej czereśni ustępuje w warunkach stratyfikacji ciepło-chłodnej znacznie efektywniej niż podczas stratyfikacji jedynie w chłodzie,

b) Zmiany zawartości wody w nasionach związane są z ustępowaniem spoczynku tych nasion,

c) W nasionach dzikiej czereśni znajduje się inhibitor (Suszka nie opublikowane).

2. Zachowanie się inhibitora w biotestach, pozycja aktywnej strefy w bioteście oraz barwne testy po spryskaniu 5% roztworem H_2SO_4 , są identyczne z syntetycznym wzorcem i stanowią dowód identyczności inhibitora naturalnie występującego w nasionach dzikiej czereśni z kwasem abscysynowym.

3. Stanowi spoczynku nasion dzikiej czereśni towarzyszy obecność inhibitora. Zmiany zawartości inhibitora związane są z procesem ustępowania spoczynku. Po 12 tygodniach stratyfikacji w temperaturze $3^\circ C$ metodą ciepło-chłodną nie wykryto w zarodkach obecności inhibitora; nasiona zaczynają kiełkować.

4. W okrywach nasiennych niestratyfikowanych nasion stężenie inhibitora jest 2,5 krotnie wyższe niż w zarodkach (w przeliczeniu na suchą masę okryw i zarodków). Po 2 tygodniach cieplej stratyfikacji inhibitor znika z okryw nasiennych. Można zatem przypuścić, że udział okryw nasiennych w spoczynku nasion jest mniejszy niż w procesie pęknięcia pestki i kiełkowania nasion.

5. W stadium pęknięcia i kiełkowania nie wykryto w zarodkach inhibitora, pojawiają się natomiast stymulatory wzrostu, których obecność wykazano w teście odcinków koleoptyle pszenicy. Stymulatory obecne w tych fazach być może biorą udział w procesach pęknięcia i kiełkowania.

Panu Docentowi Bolesławowi Suszce składam serdeczne podziękowanie za wskazówki metodyczne i pomoc w czasie pracy.

LITERATURA

1. Addicott F. T., Carns H. R., Lyon J. L., Smith O. E., McMeans J. L. — 1964. On the physiology of abscisins. Coll. Intern. C.N.R.S. Paris, 123: 687 - 703.
2. Addicott F. T., Ohkuma K., Smith O. E., Thiessen W. E. — 1966. Chemistry nad physiology of abscisin II an abscission accelerating hormone. Adv. Chemistry, 53: 97 - 105.
3. Addicott F. T., Lyon J. L., Ohkuma K., Thiessen W. E., Carns H. R., Smith O. E., Cornforth J. W., Milborrow B. V., Ryback G., Wareing P. F. — 1968. Abscisic acid: A new name for abscisin II (dormin). Science, 159: 1443.

4. Aspinall D., Paleg L. G., Addicott F. T. — 1967. Abscisin II and some hormone-regulated plant responses. *Aust. J. Biol. Sci.*, 20: 869 - 882.
5. Black M., Wareing P. F. — 1959. The role of germination inhibitors and oxygen in the dormancy of the light-sensitive seed of *Betula sp.* *Journ. of Experimental Botany*, 10 (28): 134 - 145.
6. Chrispeels M. J., Varner J. E. — 1966. Inhibition of gibberellic acid induced formation of α -amylase by abscisin II. *Nature*, 212: 1066 - 1067.
7. Chrispeels M. J., Varner J. E. — 1967. Hormonal control of enzyme synthesis: On the mode of action of gibberellic acid and abscisin in aleurone layers of barley. *Plant Physiology*, 42 (7): 1008 - 1017.
8. Cornforth J. W., Milborrow B. V., Ryback G., Wareing P. F. — 1965. Chemistry and physiology of dormins in sycamore. *Nature*, 205: 1269 - 1272.
9. Cornforth J. W., Milborrow B. V., Ryback G., Wareing P. F. — 1965. Synthesis of (\pm)-abscisin II. *Nature*, 206: 715.
10. Cornforth J. W., Milborrow B. V., Ryback G. — 1966. Identification and estimation of (\pm)-abscisin II (dormin) in plant extracts by spectropolarimetry. *Nature*, 210: 627 - 628.
11. Frankland B., Wareing P. F. — 1966. Hormonal regulation of seed dormancy in hazel (*Corylus avellana* L.) and beech (*Fagus sylvatica* L.). *Journal of Experimental Botany*, 17 (52): 596 - 611.
12. Hemberg T. — 1958. The occurrence of acid inhibitors in resting terminal buds of *Fraxinus*. *Physiologia Plantarum*, 11: 610 - 614.
13. Hemberg T. — 1958. The significance of the inhibitor β -complex in rest period of the potato tuber. *Physiologia Plantarum*, 11: 615 - 626.
14. Hemberg T. — 1967. Abscisin II as an inhibitor of α -amylase. *Acta Chem. Scand.*, 21: 1665 - 1666.
15. Jackson G.A.D. — 1969. The hormonal control of fruit development in *Rosa*. (in:) *Symposium on the mechanism of fruiting, translocation and accumulation of nutrients in plant organisms. Warszawa-Skierniewice 14th - 16th April 1969.*
16. Lane F. E., Bailey L. F. — 1964. Isolation and characterization studies on the inhibitor in dormant buds of the silver maple, *Acer saccharinum* L. *Physiologia Plantarum*, 17: 91 - 99.
17. Lipe W. N., Crane J. C. — 1966. Dormancy regulation in peach seeds. *Science*, 153: 541 - 542.
18. Nikolaeva M. G., Tzarykova V. A., Poliakova E. N. — 1968. On dormin, a new plant hormone present in dormant seeds. *Bot. Zhurn.*, 53: 975 - 978.
19. Nitsch J. P. — 1956. Methods for investigation of natural auxins and growth inhibitors (in:). *The chemistry and mode of action of plant growth substances*, ed. Wain and Wight, London, Butterworths: 1 - 31.
20. Nitsch J. P., Nitsch C. — 1956. Studies on the growth of coleoptile and first internode sections. A new, sensitive, straight-growth test for auxins. *Plant Physiology*, 31 (2): 94 - 111.
21. Nitsch J. P. — 1967. Progress in the knowledge of natural plant growth regulators. *Annals of the New York Academy of Science*, 144: 279 - 294.
22. Ohkuma K., Lyon J. L., Addicott F. T., Smith O. E. — 1963. Abscisin II, an abscission-accelerating substance from young cotton fruit. *Science*, 142: 1592 - 1593.
23. Ohkuma K., Addicott F. T., Smith O. E., Thiessen W. E. — 1965. The structure of abscisin II. *Tetrahedron letters*, 29: 2529 - 2535.
24. van Overbeek J. — 1966. Plant hormones and regulators. *Science*, 152: 721 - 731.
25. van Overbeek J., Loeffler J. E., Iona M., Mason R. — 1967. Dormin (abscisin II), inhibitor of plant DNA synthesis. *Science*, 156: 1497 - 1499.

26. Pillay D.T.N. — 1962. A study of the relationship of growth substances to rest period and germination of mazzard cherry seeds (*Prunus avium* L.). Diss. Abst, 22: 3830.
27. Pillay D.T.N., Brase K. D., Edgerton L. J. — 1965. Effects of pre-treatment, temperature and duration of after-ripening on germination of mazzard and mahaleb cherry seeds. Proc. Am. Soc. Hort. Sci., 86 :102 - 107.
28. Pillay D.T.N., Edgerton L. J. — 1965. Relation of growth substances to rest period and germination of mazzard seeds. Proc. Am. Soc. Hort. Sci., 86: 108 - 113.
29. Pieniążek J., Rudnicki R. — 1967. The presence of abscisin II in apple leaves and apple fruit juice. Bull. Acad. Polon. Sci., 5 :251 - 254.
30. Pollock B. M., Olney H. O. — 1959. Studies of the rest period. I Growth translocation, and respiratory changes in the embryonic organs of the after-ripening cherry seed. Plant Physiology, 34 (2) :131 - 142.
31. Robinson P. M., Wareing P. F., Thomas T. H. — 1963. Isolation of the inhibitor varying with photoperiod in *Acer pseudoplatanus*. Nature, 199 (875): 4896.
32. Rudnicki R. — 1968. Studies on abscisic acid (AbA) in apple seeds. (in:). Studies on the role of natural growth regulators in shoot growth, bud dormancy and flower initiation of fruits trees. ed. Research Institute of Pomology Skierniewice. Ann. Rep. 1968.
33. Rudnicki R., Suszka B. — 1969. Abscisic acid in non-dormant seeds of silver maple (*Acer saccharinum* L.). Bull. Acad. Polon. Sci., 5: 325 - 331.
34. Ryugo K. — 1969. Abscisic acid, a component of the beta-inhibitor complex in the *Prunus* endocarp. J. Amer. Soc. Hort. Sci., 94: 5 - 8.
35. Sondheimer E., Galson E. C. — 1966. Effect of abscisin II and other plant growth substances on germination of seeds with stratification requirements. Plant Physiology, 41: 1397 - 1398.
36. Sondheimer E., Tzou D. Z., Galson E. — 1968. Abscisic acid levels and seed dormancy. Plant Physiology, 43: 1443 - 1447.
37. Suszka B. — 1962. Wpływ czynnika termicznego na ustępowanie spoczynku nasion dzikiej czereśni. Arboretum Kórnickie, 7: 189 - 276.
38. Thomas T. H., Wareing P. F., Robinson P. M. — 1965. Action of sycamore dormin as gibberellin antagonist. Nature, 205: 1270 - 1272.
39. Tomaszewska E. — 1968. Naturalne regulatory odpadania liści u żylistków (*Deutzia* Thunb.). Arboretum Kórnickie, 8: 173 - 215.
40. Varga M. — 1957. Examination of growth-inhibiting substances separated by paper chromatography, in fleshy fruits. I. Results of the bio-assay of the chromatograms obtained from the ether extract of the fruits. Acta, Biol. Hung., 7: 39 - 47.
41. Varga M. — 1957. Examination of growth-inhibiting substances separated by paper chromatography in fleshy fruits. II. Identification of the substances of growth-inhibiting zones on the chromatograms. Acta Biol. Szeged., 3: 213 - 223.
42. Varga M. — 1957. Examination of growth-inhibiting substances separated by paper chromatography in fleshy fruits. III. Change in concentration of growth-inhibiting substances as a function of the ripening. Acta Biol. Szeged., 3: 225 - 232.
43. Varga M. — 1957. Examination of growth-inhibiting substances separated by paper chromatography in fleshy fruits. IV. Paper chromatographic analysis of lemon juice containing germinated seeds. Acta. Biol. Szeged., 3: 234 - 237.
44. Varga M., Koves E. — 1959. Distribution and quantitative changes of the

- β -inhibitor in the various organs of the bean plant during ontogeny. Acta Biol. Hung., 9: 369 - 378.
45. Vegis A. — 1964. Dormancy in higher plants. Annual Review of Plant Physiology, 15: 185 - 223.
 46. Villiers T. A., Wareing P. F., — 1965. The possible role of low temperature in breaking the dormancy of seeds of *Fraxinus excelsior* L. Journ. of Experimental Botany, 16 (48): 519 - 531.
 47. Villiers T. A., Wareing P. F. — 1965. The growth-substance content of dormant fruits of *Fraxinus excelsior* L. Journ. of Experimental Botany, 16 (48): 533 - 544.
 48. Walker D. R., Hendershott C. H., Snedecor G. W. — 1958. A statistical evaluation of growth substance bioassay method using extracts of dormant peach buds. Plant Physiology, 33: 162 - 166.
 49. Wareing P. F., Villiers T. A. — 1961 Growth substance and inhibitor changes in buds and seeds in response to chilling. (in:). Plant growth regulation, ed. The Iowa State University Press.
 50. Wareing P. F., Eagles C. F., Robinson P. M. — 1964. Natural inhibitors as dormancy agents. Coll. Intern. C.N.R.S. Paris, 123: 377 - 387.
 51. Wareing P. F. — 1965. Dormancy in plants. Sci. Progr., 53: 529 - 537.
 52. Woody-Plant Seed Manual — 1948. U.S. Dep. of Agric., Misc. publi. No 654 Washington.

KAZIMIERZ KRAWIARZ

The occurrence and variation in concentrations of a growth inhibitor in stratified seeds of mazzard (Prunus avium L.)

Summary

In the acid ether fraction of mazzard seeds the presence of a growth inhibitor has been established (wheat coleoptile test, R_F 0.65 - 0.90, solvent: isopropanol — ammonia — water 10 : 1 : 1) which is probably identical with abscisic acid.

The highest concentration of this inhibitor has been observed in non-stratified dormant seeds.

In the embryos the level of this inhibitor declines during the course of stratification. The seeds have been stratified in the optimal conditions for them that is at 20°C for two weeks and then at 3°C for 20 weeks and till the completion of seed germination. Between the 9th and 12th week of the cold stratification period the activity of the inhibitor has dropped below a level that could be detectable as statistically significant.

In the seed coats of resting seeds the level of the inhibitor was 2.5 times as high as in the embryos (with reference to the dry weight of the coats and the embryos). During the first two weeks of the warm-followed-by-cold stratification the activity of the inhibitor has disappeared completely.

It appears that changes in the activity of the inhibitor are associated with the process of dormancy breaking taking place in the seeds.

At the time when the stones cracked and seeds started to germinate growth promoters active in the wheat coleoptile test have been detected in extracts of the embryos and of the seed coats. These substances have not been identified yet.

*Наличие и изменение содержания ингибитора роста
в стратифицированных семенах (*Prunus avium* L.)*

Резюме

В кислотной эфирной фракции семян дикой черешни установлено наличие ингибитора роста (тестом служило колеоптиле пшеницы R_F 0,65-0,90 растворитель: изопропанол — аммиак — вода в пропорции 10:1:1), вероятно идентичного с абсцизиновой кислотой.

Содержание этого ингибитора наиболее высокое в нестратифицированных покоящихся семенах.

В зародышах уровень содержания ингибитора снижается по мере прохождения стратификации. Стратификация семян осуществлялась в оптимальных для них тепло-холодных условиях (2 недели при 20°C и затем 20 недель при 3°C) вплоть до начала наклёвывания. Между 9 и 12 неделями холодного периода стратификации активность ингибитора упала ниже того порога, за которым можно статистически определить наличие его существенного действия.

В семенных оболочках покоящихся семян содержание ингибитора было в 2,5 раза выше, чем в самых зародышах (в пересчёте на их сухую массу). В течение двух недель стратификации активность ингибитора исчезла совершенно.

Вероятно изменения активности ингибитора связаны с процессом выхода семян из периода покоя.

Во время растрескивания и прорастания семян в вытяжках из зародышей и семенных оболочек открыты стимуляторы роста (тест тот же — колеоптиле пшеницы). Однако вещества эти не идентифицированы.