

Wpływ kinetyny na zawartość węglowodanów w epikotylach grochu

The influence of kinetin on the carbohydrates content in peas epicotyls

W. MACIEJEWSKA-POTAPCZYKOWA i H. LUKASIAK

WSTĘP

Skoog, Jabłoński i Skoog, Naylor, Sander i Skoog wykazali, że w wycinkach rdzenia łodygi tytoniu hodowanych *in vitro* na pożywce mineralnej zestalonej agarem, zawierającej kwas β -indoloctowy zachodzi intensywne zwiększanie się rozmiarów komórek, w których następuje jednocześnie szereg podziałów mitotycznych. Mitozom tym jednak nie towarzyszy cytokineza z zakładaniem się błon komórkowych, co prowadzi do pozostawiania dużych komórek wielojądrowych.

Jeżeli do środowiska dodać kinetyny, wówczas w rdzeniu łodygi tytoniu zaczyna przebiegać normalna cytokineza.

Z obserwacji tych wynika, że kinetyna jest hormonem podziałów komórkowych dla wzrostu typu meresis, a kwas β -indoloctowy głównie czynnikiem zwiększania się rozmiarów komórek przy wzroście typu auxesis (Terminy meresis i auxesis używane są przez Thimanna 1956).

Wobec panującego powszechnie poglądu, że działanie substancji wzrostowych polega przede wszystkim na aktywacji oddychania, stanowiącego źródło energii niezbędnej dla wzrostu (Bonner), Jensen poddał badaniom intensywność oddychania wycinków z różnych stref wzrostu korzenia *Vicia faba* i stwierdził, że strefa szybkich podziałów komórkowych wierzchołków wzrostu jest jednocześnie strefą niskiej aktywności oddechowej w porównaniu z komórkami czapeczki korzeniowej oraz ze strefą wydłużania się i dyferencjacji.

Pracując na materiale zwierzęcym Mazia i Prescott (1954) wykazali, że zdolność ameby do estryfikacji nieorganicznych fosforanów wyraźnie maleje podczas podziałów komórkowych, zaś Brachet stwier-

dził, że zahamowanie oddychania nawet w 90% pozostaje bez wpływu na podziały komórkowe jaj żaby.

Zmierzając do wyjaśnienia mechanizmu działania kinetyny od strony wpływu tego związku na aktywność procesów oddechowych, Glasziou porównywał intensywność oddychania (przez oznaczanie intensywności pobierania tlenu oraz oznaczanie ilości ufosforylowanych produktów pośrednich procesu oddychania) wycinków rdzenia łądzy tytoniu poddanych działaniu: 1. kinetyny, 2. kwasu β -indoloocetowego.

Autor ten stwierdził, że kinetyna pobudza oddychanie tylko w okresie 5—8 godzin od początku doświadczenia. Po upływie tego czasu intensywność procesów oddechowych u wycinków stymulowanych kinetyną i stymulowanych kwasem β -indoloocetowym jest bardzo podobna.

Z doświadczeń tych Glasziou (1957) wyprowadza wniosek, że wymagania energetyczne badanych tkanek są bardzo podobne zarówno dla podziałów komórkowych, jak i dla wzrostu komórek i związane są raczej z procesami syntezy w cytoplazmie niż z naturą zmian cytologicznych przebiegających w tkankach.

Działanie kinetyny pobudzające cytokinezę wiąże się ściśle zdaniem tego autora z metabolizmem błon komórkowych.

Według poglądu Thimanna i Chouarda (1956) zakładanie się i wzrost błony pierwotnej zachodzi dzięki aktywności metabolicznej cytoplazmy, która pozostaje z nią w kontakcie; energia potrzebna do tego procesu czerpana jest z wykorzystania tłuszczów lub cukrowców na drodze oddychania, a uruchamiana działaniem niektórych dehydrogenaz, fosforylaz i oksydazy cytochromowej.

Według Bonnera (1950) składniki błony komórkowej formują się w zależności od procesów zachodzących w protoplazmie. Sama błona komórkowa stanowi raczej element inertyny, a jej skład jest odpowiednikiem całego metabolizmu komórki.

Być może, że zaobserwowane przez Glasziou na początku doświadczenia zwiększenie intensywności oddychania wycinków łądzy tytoniu, na które działano kinetyną, związane jest z pobudzaniem wydajności źródeł energii dla tworzenia nowych składników błony komórkowej, tzn. celulozy lub pektyn.

Celem niniejszej pracy było zbadanie wpływu kinetyny na zawartość węglowodanów w etiolowanych epikotyloch grochu.

W badanym materiale oznaczano 5 różnych grup węglowodanów: 1. jedno-, dwu- i trójcukrów, 2. dekstryn, śluzów i części substancji pektynowych, 3. skrobi, 4. hemiceluloz i pektyn, 5. celuloz.

Jeżeli istotnie kinetyna jest czynnikiem stymulującym metabolizm błon komórkowych, to powinny pod jej wpływem nastąpić przesunięcia w zawartości węglowodanów poszczególnych grup: kosztem węglowoda-

nów bardziej prostych, jedno- i dwu-cukrów, powinna zwiększyć się zawartość wielocukrów wchodzących w skład błon komórkowych, a więc przede wszystkim błonnika, hemiceluloz i substancji pektynowych.

Aktywność kinetyny w stymulowaniu procesów syntezy wielocukrowców rozpatrywano w porównaniu z aktywnością 1. kwasu β -indolooctowego — ze względu na dane Glasziou, który stwierdza, że wymagania energetyczne rośliny przy podziałach komórkowych i przy wzroście komórek są podobne, ale kinetyna jest, w odróżnieniu od kwasu β -indolooctowego, czynnikiem niezbędnym dla normalnej cytokinezy z zawiązaniem się błon komórkowych, 2. adeniny — z uwagi na szereg danych w literaturze o zasadach purynowych i pirymidynowych jako czynnikach wzrostowych roślin (Sabinin i Połozowa 1957), 3. mieszaniny kinetyny i kwasu β -indolooctowego (według danych Millera i Skooga (1955), Skinnera i Shive (1955) oraz de Roppa (1956) kinetyna jest szczególnie aktywna w obecności kwasu β -indolooctowego).

MATERIAŁ I METODYKA BADAŃ

Materiał do badań nad działaniem omawianych substancji wzrostowych stanowiły etiolowane epikotyle grochu, a więc części rośliny intensywnie rosnące i bardzo wrażliwe na działanie stymulatorów wzrostu, które w poprzednich naszych doświadczeniach (Maciejewska-Potapczyk, Keller 1958) silnie reagowały na działanie kinetyny zwiększeniem zawartości azotu ogólnego.

Do oznaczeń węglowodanów w badanym materiale posługiwano się opisaną przez Biełozierskiego metodą oznaczania 5 grup węglowodanów w jednej odwadze.

Schemat tej metody oparty jest na różnych właściwościach, fizycznych i chemicznych, węglowodanów.

Pod względem fizjologicznym można węglowodany podzielić na: 1. węglowodany chwiejne, łatwo mobilizowane i łatwo przechodzące jedne w drugie, zależnie od warunków fizjologicznych, 2. węglowodany mało chwiejne, mobilizowane wtedy, gdy nie ma innych zapasów węglowodanowych, 3. węglowodany stałe, które w zwykłych warunkach nie są wykorzystywane.

1. Węglowodany chwiejne mogą występować w komórce w stanie rozpuszczalnym lub nierozpuszczalnym. Niektóre węglowodany rozpuszczalne dają się ekstrahować z materiału roślinnego alkoholem, inne zaś tylko wodą. Dzięki tym różnicom własności poszczególnych węglowodanów można je frakcjonować.

Na skutek działania na materiał roślinny 80—90% alkoholem, do roztworu przechodzą krystaliczne jedno-, dwu- i trójcukry (I grupa). W obrę-

bie tej grupy cukry można podzielić na podstawie ich własności chemicznych, a mianowicie podatności na kwaśną hydrolizę.

Dla uzyskania obrazu zawartości jedno- i dwucukrów różnego typu w danej frakcji oznaczamy zdolność redukującą cukrów tej frakcji przed hydrolizą, a następnie po kolejnych hydrolizach kwasem o coraz większych stężeniach.

Przy dalszym ekstrahowaniu materiału zimną wodą do roztworu przechodzą koloidalne wielocukry rozpuszczalne w wodzie: dekstryny, inulina i inne lewulozany, śluz i część substancji pektynowych (II grupa). Dyferencjację w tej grupie można przeprowadzić na podstawie stopnia podatności na hydrolizę, zdolności tworzenia furfurołu i reagowania z jodem w środowisku alkalicznym.

Do węglowodanów chwiejnych nierozpuszczalnych należy skrobia, która może być wyciągnięta wodą po uprzedniej hydrolizie enzymatycznej (III grupa).

2. Do węglowodanów mało chwiejnych należą hemicelulozy (heksozany i pentozany) oraz substancje pektynowe. Grupa ta jest dość różnorodna i dlatego trudno ją rozdzielić na poszczególne składniki. Pewien podział w tej grupie można przeprowadzić na podstawie oznaczenia ogólnej własności redukcyjnej, oznaczenia pentoz i kwasów uronowych. Zazwyczaj węglowodany tego typu określa się sumarycznie, na podstawie własności redukujących po hydrolizie materiału 2% kwasem solnym (IV grupa).

3. Po wyciągnięciu i oznaczeniu wszystkich wymienionych węglowodanów w materiale roślinnym pozostają węglowodany stałe, tworzące szkielet rośliny (V grupa). Do nich należy przede wszystkim błonnik, a także w szczególnych przypadkach chityna. Tak więc wykorzystując różną rozpuszczalność cukrów i ich podatność na hydrolizę można oznaczyć stopniowo w jednym i tym samym materiale zawartość węglowodanów w poszczególnych frakcjach.

Do analiz zawartości cukrów w kolejnych wyciągach i hydrolizatach posługiwano się metodą Bertranda, zalecaną specjalnie przez Biełozierskiego w odniesieniu do analizy ilości węglowodanów w jednej odwadze materiału roślinnego.

OPIS DOŚWIADCZEŃ

Do doświadczeń użyto 2 odmian grochu: zwykłego grochu siewnego (*Pisum sativum*) oraz grochu o nasionach marszczonych, odmiany „Szlachetna Perła“.

Okazało się bowiem, że zwykły groch siewny zawiera stosunkowo mało cukrów, szczególnie grupy I, natomiast groch odmiany „Szlachetna Perła“ posiada ich znacznie więcej. Dlatego też tylko nasze pierwsze orienta-

cyjne próby wykonane były na grochu zwykłym, a następnie, dla uniknięcia możliwych błędów w oznaczeniach bardzo drobnych ilości cukrów, przeszliśmy całkowicie na odmianę „Szlachetna Perła“.

Nasiona przeznaczone do kiełkowania sterylizowano w następujący sposób: około $\frac{1}{2}$ kg grochu myto dokładnie wodą i szarym mydłem, następnie nasiona płukano wodą i zalewano na 15 sek. 1% roztworem sublimatu, po czym płukano je przez 3—4 godz. mocno chlorowaną, bieżącą wodą. Ten sposób sterylizacji dawał lepsze wyniki niż opisany przez Biełozierskiego, który zaleca zalewanie nasion najpierw alkoholem absolutnym, a następnie sublimatem.

Nasiona wysadzano sterylnie w akwariach, na gęsto obok siebie ułożonych rulonikach wilgotnej bibuły. Akwaria zakryte płytami szklanymi umieszczano w ciemności, w temperaturze pokojowej.

Po 5—6 dniach nasiona kiełkowały, a kiełki osiągały wysokość około 4 cm. Z górnej części epikotyli wycinano odcinki o długości jednego centymetra. W części tych wycinków oznaczano zawartość węglowodanów.

Resztę wycinków umieszczano (po 4—5 g) w szalkach Petriego, napełnionych pożywką Knopa z dodatkiem roztworu mikroelementów A—Z (wg Hoaglanda i Snydersa) oraz sacharozy w ilości 1 g na 100 ml pożywki.

Następnie do szalek dodawano:

1. kinetyny do stężenia w pożywce $10^{-70}/\text{o}$. (Używano kinetyny zsyntetyzowanej przez prof. Supniewskiego. Preparat rozpuszczano w 0,1 n HCl, a następnie roztwór zobojętniano do pH 7,
2. kwasu β -indoloocetowego (IAA) do stężenia w pożywce $10^{-70}/\text{o}$,
3. adeniny (w postaci siarczanu adeniny) do stężenia w pożywce $10^{-70}/\text{o}$,
4. kinetyny i kwasu β -indoloocetowego do stężenia każdego ze składników $10^{-70}/\text{o}$,
5. kontrola (bez dodatku substancji wzrostowych).

Ponieważ wycinki pływały po powierzchni roztworów, dostęp tlenu był zapewniony.

Zakryte szalki umieszczano w ciemności w temperaturze pokojowej.

Należy nadmienić, że hodowle ulegały bardzo często zakażeniu i, dla czystych kultur materiału, konieczne było stosowanie licznych powtórzeń doświadczenia.

Po 6—7 dniach materiał analizowano na zawartość węglowodanów. W tym celu epikotyle hodowane na pożywkach z dodatkiem badanych substancji wzrostowych osuszano bibułą, a następnie w części ich oznaczano suchą masę, a część utrwalano w alkoholu w następujący sposób: próbki umieszczano w erlenmajerkach o pojemności 50 ml, zalewano 82% etanolem i podgrzewano w łaźni wodnej pod chłodnicą zwrotną w temp.

78°C, przez 30 minut. Tak utrwalony materiał można było przechowywać dowolną ilość czasu.

Z utrwalonego materiału zlewano alkohol (w którym były rozpuszczone cukry proste) do kolby okrągłodennej, o pojemności 200 ml. Pozostały materiał w celu lepszej ekstrakcji rozdrabniano grubą, ostro ściętą bagietką. Rozdrobniony materiał zalewano świeżą porcją 82% alkoholu etylowego i ekstrahowano znów jak poprzednio. Czynność tę powtarzano czterokrotnie. Ostatni ekstrakt był już zupełnie bezbarwny, podczas gdy pierwszy miał kolor słomkowo-żółty. Cukry rozpuszczalne w alkoholu stanowiły pierwszą frakcję. Wyciąg alkoholowy zagęszczano w temp. 45° na łaźni wodnej w próżni (10—12 mm wysokości słupa rtęci). Aby zapobiec przerzucaniu materiału do chłodnicy, wprowadzono do wyciągu przez górny korek kapilarę, która zapewniała stały przepływ małego strumienia powietrza. Małe pęcherzyki powietrza przechodzące przez ekstrakt zapewniały równomierne jego wrzenie. Po odparowaniu alkoholu i wody pozostawał gęsty syrop, który zalewano niewielką ilością ciepłej (ok. 30°C) wody, silnie wytrząsano i odparowywano w tych samych warunkach. Uzyskany syrop rozpuszczano w 20 ml wody i zlewano ilościowo do kolbki miarowej na 50 ml, przepłukując 2—3-krotnie kolbę, w której był syrop, ciepłą (ok. 30°C) wodą. Ciepłą wodę stosowano ze względu na lepszą rozpuszczalność w niej cukrów. Celem wytrącenia zanieczyszczeń charakteru białkowego, do roztworu dodawano kilka kropeł 10-procentowego roztworu octanu ołowiu. Zawartość kolbki uzupełniano do 50 ml, mieszano, a po odstaniu odsączano wytrącony osad. Z przesączu brano 25 ml, z dawano 10-procentowym roztworem siarczanu sodu aż do całkowitego wytrącenia nadmiaru octanu ołowiu. Osad odwirowywano, a klarowny roztwór z nad osadu zlewano do kolbki miarowej i uzupełniano do 50 ml. Z tak przygotowanego roztworu Biełozierski poleca pobieranie próbek do oznaczeń cukrów trzech podfrakcji należących do frakcji I:

- 1) cukrów wprost redukujących,
- 2) sacharozy,
- 3) maltozy i ew. innych.

Cukry wprost redukujące oznacza się bezpośrednio (bez hydrolizy), sacharozę po uprzedniej 5-minutowej hydrolizie 2% kwasem solnym, a maltozę po hydrolizie 1% kwasem solnym w ciągu 3 godzin.

Ponieważ w naszych doświadczeniach nie przeprowadzono analizy jakościowej na występowanie poszczególnych cukrowców w epikotyloch grochu i nie wiedzieliśmy, czy w naszych hydrolizach występuje maltoza, której zdolność redukcyjną po hydrolizie podwaja się, czy też inne dwucukry, które redukują całkowicie dopiero po hydrolizie — przeto węglowodany I grupy oznaczaliśmy tylko sumarycznie po 3-godzinnej hydrolizie 1% kwasem solnym.

Po zakończeniu hydrolizy roztwory zobojętniano węglanem sodu do pH 7, wlewano płyn Fehlinga i podgrzewano aż do wrzenia, które utrzymywano przez 3 minuty. Płyn odstawiano aż do opadnięcia tlenku miedziawego, a następnie sączono przez lejek porcelanowy C-4. Osad przemywano ciepłą wodą. Tlenek miedziawy rozpuszczano w kwaśnym roztworze siarczanu żelazowego $[\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3]$, a następnie miareczkowano 0,1 n roztworem KMnO_4 .

Przy obliczaniu ilości cukrów, odpowiadającej ilości zredukowanej miedzi, posługiwano się tabelą opracowaną przez Biełozierskiego.

Pozostały po ekstrakcji alkoholowej materiał roślinny suszono w temp. 45°C do stanu powietrznie suchego. Z wysuszonych próbek ekstrahowano cukry rozpuszczalne w wodzie. Ekstrakcję prowadzono czterokrotnie używając ciepłej (ok. 35°C) wody. Wyciąg, który stanowił drugą frakcję węglowodanów, zagęszczano w temp. 100°C , zadawano 20% kwasem solnym w takiej ilości, aby stężenie jego w roztworze wynosiło 2%, i hydrolizowano na wrzącej łaźni wodnej przez 3 godziny. Hydrolizat zobojętniano na gorąco tlenkiem ołowiu (PbO), odsączano, a do przesączu wkraplano octan ołowiu, celem wytrącenia zanieczyszczeń białkowych. Osad odsączano, a z przesączu strącano nadmiar octanu ołowiu 10% siarczanem sodu. Osad odwirowywano, dekantowano, przemywano i oznaczano w nim cukry metodą Bertranda.

Pozostały po ekstrakcji wodnej materiał zadawano znów niewielką ilością wody, wstawiano do łaźni wodnej o temp. 60°C i prowadzono rozklejanie skrobi. Po 30 minutach do roztworu dodawano diastazę przygotowaną ze śliny (około 3 ml śliny rozcieńczone zimną wodą do ok. 50 ml przesączano przez szklany lejek). W części przesączu oznaczano cukry (ślepa próba). Materiał zadany diastazą wstawiano do termostatu o temp. 37°C . Po 24 godz. trawienia materiału diastazą badano płynem Lugala pod mikroskopem obecność skrobi w roztworze. Jeżeli skrobia już nie występowała, to pozostały materiał roślinny dekantowano, przemywano letnią wodą, zadawano 20% kwasem solnym do stężenia 2% i hydrolizowano na wrzącej łaźni wodnej przez 3 godz. Hydrolizat zobojętniano tak jak w przypadku drugiej frakcji i oznaczano cukry metodą Bertranda. Skrobia stanowiła trzecią frakcję.

W pozostałym materiale oznaczano cukry czwartej frakcji. Zadawano więc materiał 2% kwasem solnym i hydrolizowano na wrzącej łaźni wodnej przez 3 godz., odsączano, przesącz zobojętniano tlenkiem ołowiu, odsączano i z przesączu usuwano zanieczyszczenia białkowe octanem ołowiu, odsączano, z przesączu usuwano nadmiar octanu ołowiu siarczanem sodu. Powstały osad siarczanu ołowiu odwirowywano, klarowny roztwór z nad osadu ostrożnie dekantowano i oznaczano w nim zawartość

cukrów. Na czwartą grupę węglowodanów składały się głównie hemice-lulozy.

W pozostałym materiale oznaczano celulozę, która stanowiła w naszych oznaczeniach piątą grupę. Materiał zadawano 20 ml 80% kwasu siarkowego i odstawiano na 2,5 godziny mieszając co pewien czas. Następnie dodawano piętnastokrotnie większą objętość wody i roztwór hydrolizowano na łaźni wodnej przez 5 godzin. Po zakończeniu hydrolizy hydrolizat zobojętniano węglanem sodu i oznaczano w nim cukry metodą Bertranda.

Hodowlę i oznaczenia prowadzono dla grochu zwykłego w jednej serii doświadczeń, dla grochu „Szlachetna Perła“ w dwu równoległych seriach. Oznaczone zawartości poszczególnych grup węglowodanów odno-szono do suchej masy epikotyli (oznaczanej drogą pośrednią, tzn. w części badanego materiału). Poszczególne oznaczenia stanowią średnie z dwu równoległych próbek. Wyniki doświadczeń zestawiono w tabelach.

Tabela 1

Zawartość węglowodanów 5 grup w epikotylach *Pisum sativum*
(w % w stosunku do suchej masy)

Content of carbohydrates of five groups in peas (*Pisum sativum*)
epicotyls (% of dry weight)

Rodzaj doświadczenia Kind of experiment	Zawartość węglowodanów 5 grup Content of carbohydrates of five groups				
	I	II	III	IV	V
Kontrola Controls	4,20	0,19	0,13	5,09	18,67
Kinetyna Kinetin	2,35	0,14	0,16	5,46	22,05

Wyniki doświadczeń wskazują na spadek zawartości węglowodanów grupy I (o ok. 45%) i grupy II (o ok. 25%) oraz na wzrost polisacharydów grupy III (o ok. 25%), grupy IV (o ok. 8%), grupy V (o ok. 18%) w epikotylach stymulowanych kinetyną.

Wyniki naszych analiz wykazują wyraźny spadek zawartości węglowodanów I grupy (o ok. 50%) w epikotylach stymulowanych kinetyną oraz mieszaniną kinetyny i IAA.

Spadek tej zawartości o ok. 30% obserwujemy także w epikotylach hodowanych na pożywce z dodatkiem adeniny.

W epikotylach zaś stymulowanych IAA stwierdzamy w obu seriach doświadczeń pewien nieznaczny (5—7%) wzrost zawartości węglowodanów grupy I. Być może, że kwas β -indolooctowy, stymulując szybkość

Tabela 2

Zawartość węglowodanów 5 grup w epikotylach grochu „Szlachetna Perła”), (w % w stosunku do suchej masy)

Content of carbohydrates of five groups in peas „Szlachetna Perła” epicotyls (% of dry weight)

Rodzaj doświadczenia Kind of experiment	Zawartość węglowodanów 5 grup Content of carbohydrates of five groups				
Doświadczenie I — Experiment I					
	I	II	III	IV	V
Kontrola Controls	17,48	0,96	0,34	3,43	12,90
Kinetyna Kinetin	9,64	0,62	0,59	3,36	41,03
Adenina Adenine	12,14	0,58	1,41	4,78	14,04
IAA	18,49	0,68	0,39	6,29	14,12
Kinetyna + IAA Kinetin + IAA	8,95	0,48	0,59	3,10	30,32
Doświadczenie II — Experiment II					
Kontrola Kontrols	18,19	0,84	0,42	4,49	14,90
Kinetyna Kinetin	9,0	0,60	0,58	3,25	30,30
Adenina Adenine	11,88	0,65	1,38	5,41	15,10
IAA	19,54	0,1	0,36	3,40	16,19
Kinetyna + IAA Kinetin + IAA	8,15	0,47	0,58	3,35	30,15

wsysania wody przez komórki, zwiększa jednocześnie szybkość wnikania sacharozy, rozpuszczonej w pożywce.

Jeśli chodzi o węglowodany II grupy, to i w tym wypadku obserwujemy spadek ich zawartości: największy, bo około 50%, w epikotylach stymulowanych mieszaniną kinetyny i IAA, mniejszy, ok. 30%, w epikotylach stymulowanych pozostałymi substancjami wzrostowymi.

W grupie III węglowodanów widzimy bardzo duży (3—4-krotny) przyrost zawartości skrobi w epikotylach hodowanych na pożywkach z dodatkiem adeniny oraz mniejszy w epikotylach stymulowanych kinetyną i mieszaniną kinetyny i kwasu β -indoloocetowego. Nadmienić przy tym należy, że w tym wypadku istnieje rozbieżność w wynikach obu serii doświadczeń, gdyż w serii I przyrost ten wynosi zarówno dla kinetyny, jak i dla mieszaniny kinetyny i kwasu β -indoloocetowego ok. 75%, zaś w serii II tylko ok. 40%. Charakterystyczna jest zbieżność wyników dla kinetyny oraz mieszaniny kinetyny + IAA w obu seriach doświadczeń.

Jeśli chodzi o zawartość węglowodanów grupy IV, obejmującej hemicelulozy i substancje pektynowe, to wyniki analiz są bardzo rozbieżne, nawet dla materiału kontrolnego i wobec tego trudne do interpretacji. Prawidłowe oznaczenie tej grupy wielocukrów przedstawia ogromne trudności metodyczne, które zostaną omówione niżej.

Przy rozpatrywaniu węglowodanów grupy V, obejmującej błonnik, uderzający jest przyrost przede wszystkim w epikotylach stymulowanych kinetyną oraz mieszaniną kinetyny i IAA. Przyrost ten jest około dwukrotny, a nawet w serii I dla kinetyny 3-krotny.

Pewną ilustrację przesunięć w zawartości poszczególnych grup węglowodanów oraz faktu, że kosztem cukrów prostych powstaje pod wpływem badanych substancji wzrostowych celuloza, stanowić może wyliczony z powyższych tabel stosunek węglowodanów grupy V do węglowodanów grupy I.

Tabela 3

Stosunek zawartości węglowodanów grupy V do węglowodanów grupy I w doświadczeniach I i II
 Relation of content of carbohydrates of group V to carbohydrates of group I in the experiments I and II

Rodzaj doświadczenia Kind of experiment	Doświadczenie Experiment	
	I	II
Kontrola Controls	0,74	0,81
IAA	1,09	1,12
Adenina Adenine	1,15	1,27
Kinetyna + IAA Kinetin + IAA	3,39	3,70
Kinetyna Kinetin	4,25	3,37

Stosunek zawartości węglowodanów grupy V do węglowodanów grupy I kształtuje się najwyżej dla kinetyny w I serii doświadczeń, następnie dla mieszaniny kinetyny i IAA. Wartości tego stosunku dla adeniny i IAA kształtują się pośrednio.

Charakterystyczny jest duży (3—4-krotny) wzrost zawartości skrobi w epikotyloch stymulowanych adeniną.

Fakt ten nasuwa przypuszczenie, że działanie adeniny polega w tym wypadku na stymulowaniu aktywności enzymów związanych z syntezą skrobi. Enzymem odgrywającym ogromną rolę w procesie syntezy skrobi jest fosforylaza. W obecności tego enzymu następuje synteza skrobi z estru Corich.

Wobec tego przebadano wpływ adeniny, kinetyny, IAA oraz mieszaniny kinetyny i IAA na aktywność fosforylazy w epikotyloch grochu.

W tym celu jednogramowe odważki epikotyli, hodowanych jak w doświadczeniach poprzednich, homogenizowano przez rozcieranie ich w porcelanowych moździerzach, a następnie dodawano po 0,2 ml homogenizatów do 1 ml 10% roztworu estru Corich, zaszczipionego 1 kroplą bardzo słabego roztworu kleiku skrobiowego (jednym z zasadniczych warunków zapoczątkowania procesu syntezy skrobi z estru Corich jest obecność śladów wielocukrowca, będącego jakby ośrodkiem, w którym rozpoczyna się proces syntezy, polegający na wydłużeniu istniejącego już łańcucha cząsteczek glukozy) i rozcieńczonego 3 ml wody.

Co 5 minut mieszano na białej porcelanowej płytce po kilka kropel badanej mieszaniny z kilkoma kroplami bardzo rozcieńczonego roztworu jodu i obserwowano szybkość pojawiania się fioletowego zabarwienia, świadczącego o syntezie skrobi.

Porównywano czas pojawienia się tego zabarwienia w mieszaninach zadanych homogenizatami z epikotyli kontrolnych i poddanych działaniu badanych substancji wzrostowych. Wyniki doświadczenia (dane otrzymane dla trzech powtórzeń były bardzo zbieżne) podajemy w tabeli 4.

Przytoczone dane wskazują, że nasza próba ilościowego oznaczenia aktywności fosforylazy w epikotyloch kontrolnych i poddanych działaniu badanych substancji wzrostowych posiada tylko charakter orientacyjny.

Wprawdzie synteza skrobi w środowiskach, do których dodano homogenizatu z epikotyli stymulowanych adeniną, była obserwowana najszybciej, gdyż już po 10 minutach, to jednak przy homogenizatach z epikotyli stymulowanych kinetyną oraz mieszaniną kinetyny z kwasem β -indoloctowym syntezę tę obserwowano również szybko, bo po 15 minutach.

Dane te nie pokrywają się z przyrostem zawartości skrobi w epikotyloch stymulowanych kinetyną i kwasem β -indoloctowym, który to przyrost był znacznie mniejszy niż w epikotyloch hodowanych na pożywce zawierającej adeninę.

Tabela 4

Rodzaj doświadczenia Kind of experiment	Pojawianie się zabarwienia w badanych mieszaninach po: Appearance of colouring in the examined mixtures after:										
	5'	10'	15'	20'	25'	30'	35'	40'	45'	50'	
Kontrola Controls	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+
Kinetyna Kinetin	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Adenina Adenine	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IAA	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+
Kinetyna + IAA Kinetin + IAA	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Pomimo jednak że próba nasza nie mogłaby stanowić podstawy dla porównania stopnia zwiększenia aktywności fosforylasy w epikotyloch stymulowanych poszczególnymi substancjami wzrostowymi, to jednak wyniki jej wydają się wskazywać na to, że adenina, kinetyna oraz mieszanina kinetyny i kwasu β -indoloocetowego wpływają na zwiększenie się aktywności fosforylasy w badanym materiale.

Ester Corich przygotowano według metody enzymatycznej, opisanej przez Bieliżerskiego, a polegającej zasadniczo na otrzymaniu estru przez działanie na substrat zawierający skrobię rozpuszczalną oraz Na_2HPO_4 i KH_2PO_4 wyciągiem z ziemiaka jako źródłem fosforylasy.

OMÓWIENIE WYNIKÓW I DYSKUSJA

Reasumując wyniki doświadczeń nad wpływem badanych substancji wzrostowych na zawartość węglowodanów w epikotyloch grochu można powiedzieć, że pod wpływem kinetyny oraz mieszaniny kinetyny i kwasu β -indoloocetowego nastąpiły znaczne przesunięcia w zawartości węglowodanów poszczególnych grup: kosztem węglowodanów bardziej prostych — jedno- i dwucukrów zwiększyła się zawartość wielocukrów: skrobi oraz polisacharydów, wchodzących w skład błon komórkowych, a mianowicie błonnika.

Charakterystyczny jest również duży (przeszło 3-krotny) przyrost ilości skrobi w epikotyloch poddanych działaniu adeniny.

Wyniki te nasuwają przypuszczenie, że badane substancje wzrostowe, a w szczególności kinetyna i adenina, działają jako stymulatory aktyw-

ności procesów enzymatycznych, związanych z syntezą wielocukrów, co zostało stwierdzone w odniesieniu do fosforylazy.

Wyniki jednak naszych doświadczeń, zmierzających do ustalenia, w jakiej mierze badane substancje wzrostowe wpływają na syntezę polisacharydów, wchodzących w skład błon komórkowych, posiadają tylko charakter orientacyjny.

Oznaczenia bowiem IV grupy węglowodanów, obejmującej hemicelulozy (heksozany i pentozany) oraz substancje pektynowe, są bardzo rozbieżne i trudne do interpretacji. Wiąże się to prawdopodobnie z dużymi trudnościami metodycznymi w oznaczaniu węglowodanów tej grupy.

IV grupa węglowodanów jest bardzo różnorodna i, przy oznaczaniu jej z jednej odważki materiału, należy liczyć się przede wszystkim z faktem, że część substancji pektynowych, rozpuszczalnych w wodzie, przechodzi w toku kolejnych ekstrakcji alkoholem i wodą do węglowodanów grupy II.

Poza tym przy przeprowadzaniu hydrolizy hemiceluloz 2% kwasem solnym na gorąco, w ciągu 3 godzin, mogą nie wszystkie hemicelulozy przejść w monozy. Dlatego też, szczególnie przy pracy z nieznanym materiałem, należałoby kontrolować, czy hydroliza jest całkowita, przeprowadzając próbę z kwasem o większym stężeniu (3,5—5%). Jednakże przy podwyższeniu stężenia kwasu hydroliza mogłaby również naruszyć błonnik (wg danych Biełozierskiego przy 5-godzinnej hydrolizie 3,6% kwasem solnym ok. 1,5% błonnika przechodzi do hemiceluloz).

Obliczanie ilości węglowodanów IV grupy daje zwykle wartości raczej rozbieżne, gdyż mogące występować w hydrolizacie obok heksoz: pentozy i kwas galakturonowy mogą stanowić źródło błędu.

Należy również nadmienić, że w obecności dużej ilości pektyn oznaczanie węglowodanów IV grupy jest bardzo niepewne (Biełozierski). Według danych Bonnera ilościowe oznaczanie hemiceluloz obok pektyn w tkankach jest niezmiernie trudne i wymaga oddzielenia substancji pektynowych, będących pochodnymi kwasu poligalakturonowego, występujących szczególnie obficie w pierwotnych błonach komórkowych.

Czynnienia pektyn przeprowadza się na podstawie ilości dwutlenku węgla, odszczepiającego się od kwasów uronowych pektyn przy ogrzewaniu z kwasem mineralnym, a pentoz (zwykle arabinozy i ksylozy) na podstawie ilości tworzącego się furfurułu.

Wobec niemożności dokładnego oznaczenia IV grupy węglowodanów uzyskane wyniki trudno jest zinterpretować.

Wiemy, że kinetyna, a także (choć w mniejszym stopniu) adenina, wzmaga ilość podziałów komórkowych (Das, Dmochowski, Gutmann, Miller i Skoog, Olszewska), co wiązałoby się oczywiście ze wzrostem ilości błon komórkowych w badanym materiale.

Wzrost więc frakcji celulozowej może być odpowiednikiem ilości błon komórkowych w epikotylach.

Gdybyśmy jednak mieli dokładne oznaczenia hemiceluloz i pektyn, to można by stwierdzić, czy stosunek tej frakcji do frakcji celulozowej kształtuje się tak samo we wszystkich rodzajach doświadczeń, czy też ulega on zachwianiu na korzyść np. frakcji celulozowej.

Na tej bowiem podstawie można by sądzić, czy działanie badanych substancji wzrostowych związane jest z zakładaniem się nowych błon komórkowych, czy też z odkładaniem się błonnika i coraz większą jego przewagą nad pozostałymi składnikami błony.

Rozstrzygnięcie tego zagadnienia wymagałoby jednak dalszych badań z zastosowaniem metodyki, umożliwiającej dokładnie oznaczenie IV frakcji węglowodanów.

STRESZCZENIE

Skoog i jego współpracownicy wykazali, że w wycinkach rdzenia lodygi tytoniu hodowanych na pożywce mineralnej zestalonej agarą, zawierającej kwas β -indoloocetowy zachodzi intensywne zwiększanie się rozmiarów komórek. Następuje przy tym wiele podziałów mitotycznych, którym jednak nie towarzyszy cytokineza, co prowadzi do powstawania komórek wielojądrowych.

Jeżeli do środowiska dodać kinetyny, zaczyna przebiegać normalna cytokineza z zakładaniem się błon komórkowych.

Glasziou interpretując mechanizm działania kinetyny wysuwa koncepcję, że związek ten jest stymulatorem metabolizmu błon komórkowych.

Celem niniejszej pracy było zbadanie wpływu: 1. kinetyny, 2. adeniny, 3. kwasu β -indoloocetowego, 4. mieszaniny kinetyny i kwasu β -indoloocetowego na zawartość węglowodanów w etiolowanych epikotylach grochu.

W badanym materiale oznaczano 5 grup węglowodanów: 1. jedno-, dwu- i trójcukry, 2. dekstryny, śluzy i część substancji pektynowych, 3. skrobię, 4. hemicelulozy i pektyny, 5. celulozę.

Wyniki naszych analiz wydają się potwierdzać pogląd Glasziou o roli kinetyny jako stymulatora metabolizmu błon komórkowych, gdyż pod wpływem kinetyny i mieszaniny kinetyny i kwasu β -indoloocetowego nastąpiły znaczne przesunięcia w zawartości węglowodanów poszczególnych grup. Kosztem węglowodanów bardziej prostych, jedno- i dwucukrów, zwiększyła się zawartość wielocukrów skrobi oraz polisacharydów, wchodzących w skład błon komórkowych, przede wszystkim zaś błonnika.

Charakterystyczny jest również duży (prawie 3-krotny) przyrost ilości skrobi w epikotylach poddanych działaniu adeniny.

Wyniki te nasuwają przypuszczenie, że badane substancje wzrostowe działają jako stymulatory aktywności procesów enzymatycznych związanych z syntezą wielocukrów.

Przebadano więc ich wpływ na aktywność fosforylazy. Okazało się, że aktywność tego enzymu wzrasta bardzo wybitnie szczególnie w epikotyloch hodowanych na pożywce z dodatkiem adeniny.

(Wpłynęło dn. 24.6.1958 r.)

*Zakład Biochemii
Uniwersytetu Łódzkiego*

SUMMARY

Skog and his co-workers have demonstrated that tobacco pith sections cultured on nutrient agar containing β -indoleacetic acid undergo considerable cell enlargement. Many mitotic divisions occur which are however unaccompanied by cytokinesis, and thus lead to the rise of multinucleate cells.

If kinetin is added to the medium, rapid cell division and cytokinesis with the formation of cell walls occur.

Glasziou interpreting the mechanism of the kinetins action gives the conception that this compound stimulates cell wall metabolism.

The theme of our work was the influence of: kinetin, adenine, β -indoleacetic acid and the mixture of kinetin and β -indoleacetic acid on the carbohydrates content in etiolated peas epicotyls.

We have analysed 5 groups of carbohydrates: 1. mono- di- and trisaccharides, 2. dextrans, mucilages and part of pectic substances, 3. starch, 4. hemicelluloses and pectic substances, 5. celluloses.

The results of our analyses seem to confirm Glasziou's opinion concerning the role of kinetin as a stimulant of the cell wall metabolism, because under the influence of kinetin and the mixture of kinetin and β -indoleacetic acid the great change-over in the carbohydrate levels of the individual groups ensued:

At the expense of the more simple carbohydrates mono- and disaccharides increase the content of polysaccharides — starch and polysaccharides entering into the cell walls, first of all of cellulose.

A very considerable increase (about 3 times) of the level of starch is very characteristic in the epicotyls stimulated by adenine.

From these results it can be surmised that the investigated growth substances stimulate the activity of enzymes taking part in the synthesis of polysaccharides, and therefore we have investigated their influence on the activity of phosphorylase. We asserted that the activity of that enzyme increases remarkably, especially in the epicotyls cultured on the nutrient containing adenine.

LITERATURA

- Biełozierski A., Proskuriakow N., 1954, *Ćwiczenia z biochemii roślin* (tłum. z rosyj.), 35—45, 49—51, Warszawa.
- Bonner J., 1950, *Plant Biochemistry*: 299—327, N. York.
- Brachet J., 1954, *Arch. Biol.* 65: 1.
- Das K., Patau K., Skoog F., 1956, *Physiologia Plantarum* 9: 640.
- Dmochowski A., Maciejewska-Potapczyk W., Sempłńska E., 1957, *Acta Soc. Bot. Pol.* 26: 361.
- Glasziou K. T., 1957, *Nature* 179: 1083.
- Guttman R., 1956, *Chromosoma* 8: 341.
- Jabłoński J., Skoog F., 1954, *Physiol. Plant.* 7: 16.
- Jensen W. A., 1955, *Exp. Cell. Res.* 8: 506.
- Maciejewska-Potapczyk W., Keller Z., 1958, *Acta Soc. Bot. Pol.* 27 (2): 161—177.
- Mazia D., Prescott D. M., 1954, *Science* 120.
- Miller C., Skoog F., Okumura F., 1955, *J. Amer. Chem. Soc.* 77: 2662.
- Miller C., Skoog F., Saltz M., Strong F., 1955, *J. Amer. Chem. Soc.* 77: 139.
- Naylor J., Sander G., Skoog F., 1954, *Physiologia Plantarum* 7: 25.
- Olszewska M. J., Maciejewska-Potapczyk W., Sempłńska E., 1957, *Acta Soc. Bot.* 26: 583.
- Olszewska M. J., 1958, *Bul. de la Soc. des Sciences et des Lettres de Łódź*, Cl. III, IX, 1, 1—4.
- Ropp R. S., 1956, *Plant Physiology* 31: 253.
- Sabinin D., Połozowa L., 1957, *Fizjologija Rastienji*, t. IV, wyp. 1: 38.
- Skinner Ch., Schive W., 1955, *J. Amer. Chem. Soc.* 77: 6692.
- Skoog F., Tsui C., 1948, *Amer. J. Botany* 35: 783.
- Thimann K., Chouard P., 1956, cyt. wg art. w książce J. A. Thomasa: *Les facteurs de la croissance cellulaire (activation et inhibition)* Paris, 77—156.