

RYSZARD M. RUDNICKI

Instytut Sadownictwa w Skierniewicach

WSPÓLDZIAŁANIE KWASU ABCYSYNOWEGO, GIBERELIN I CYTOKININ W REGULACJI SPOCZYNKU NASION JABŁONI

Szereg czynników natury chemicznej o charakterze regulatorów wzrostu, a szczególnie hormony roślinne, może wpływać na procesy wzrostu i rozwoju roślin. Hormony roślinne to drobnocząsteczkowe związki chemiczne o działaniu regulującym wzrost i rozwój roślin, wytwarzane przez roślinę endogennie w określonych tkankach i oddziałujące na procesy wzrostowe w innych tkankach rośliny. Do hormonów roślinnych zaliczamy związki z grupy auksyn, giberelin, cytokinin, kwasu abscysynowego i etylenu.

Dysponujemy olbrzymią ilością danych uzyskanych na drodze doświadczalnej wskazujących na wpływ hormonów roślinnych na podstawowe procesy biochemiczne i fizjologiczne związane ze wzrostem i rozwojem organizmu roślinnego, jednakże mechanizmy ich działania nie zostały dotąd w pełni wyjaśnione. Trudne jest, ustalenie zdecydowanej specyfiki w oddziaływaniu poszczególnych hormonów w stosunku do odpowiednich procesów. Najbardziej ogólnie można przypisać auksynom, giberelinom i cytokininom rolę stymulatorów procesów związanych ze wzrostem i rozwojem, natomiast kwas abscysynowy uważany jest za inhibitora tych procesów. Nie ulega jednak wątpliwości, że wpływ jaki wywiera dany hormon na proces fizjologiczny czy biochemiczny w danej tkance roślinnej jest wynikiem równoczesnego współdziałania innych hormonów, zależy od typu tkanki lub organu roślinnego, rodzaju procesu fizjologicznego oraz wzajemnego stosunku stężeń innych hormonów.

W rolnictwie i ogrodnictwie strefy umiarkowanej spoczynek roślin i ich organów jest zagadnieniem szczególnie intensywnie badanym ze względów praktycznych. Poznanie endogennych mechanizmów regulujących indukcję, utrzymywanie i ustępowanie spoczynku roślin stwarza możliwość sterowania tymi procesami w szerokiej praktyce rolniczej. Coraz powszechniejsze zastosowanie retardantów wzrostu, herbicydów i innych związków chemicznych w rolnictwie i ogrodnictwie jest odzwierciedleniem możliwości zewnętrznej regulacji procesami wzrostowymi roślin.

Przyjmuje się powszechnie (35, 36), że indukcja i ustępowanie spoczynku roślin i ich organów znajduje się pod kontrolą endogennych hormonów. Badania nad współdziałaniem hormonów roślinnych w regulacji spoczynku roślin wymagają wybrania odpowiedniego materiału roślinnego. Wyniki badań uzyskane na takim modelowym materiale roślinnym można w pewnym zakresie uogólniać a uzyskane informacje przenosić na inne obiekty badawcze. Spoczynkowe nasiona różnych roślin pełnią często rolę takiego materiału modelowego.

Jednym z najbardziej interesujących problemów fizjologii nasion jest okresowa niezdolność nasion niektórych roślin do kiełkowania po umieszczeniu ich zaraz po zbiorze w optymalnych warunkach uwodnienia, temperatury i dostępu tlenu. Ta okresowa niezdolność do kiełkowania — zwana powszechnie spoczynkiem nasion — może ustąpić na skutek potraktowania nasion dodatkowym bodźcem fizycznym. Zjawisko spoczynku, występujące powszechnie u nasion roślin klimatu umiarkowanego, uważa się za ewolucyjnie uzyskaną zdolność adaptacyjną do sezonowo zmieniających się warunków środowiska. Spoczynek nasion jest stadium rozwojowym rośliny, charakteryzującym się zahamowaniem wzrostu i rozwoju przy równoczesnym zachodzeniu, z obniżoną intensywnością, szeregu przemian biochemicznych prowadzących do kiełkowania.

Ogólnie przyjętym kryterium zakończenia przez nasiona stadium spoczynku jest uzyskanie przez nie zdolności do kiełkowania. Objawia się ono wzrostem korzenia zarodkowego spowodowanego wydłużaniem się i podziałami komórek. Spoczynek, a tym samym zahamowanie kiełkowania i wzrostu, może być wywołany (1, 2, 35): 1) niedojrzałością morfologiczną lub fizjologiczną zarodka, 2) nieprzepuszczalnością okryw nasiennych dla wody i gazów, 3) mechaniczną twardością okryw nasiennych, 4) istnieniem w zarodku bloku metabolicznego wywołanego obecnością inhibitorów wzrostu, 5) współdziałaniem wyżej wymienionych przyczyn.

Różne przyczyny spoczynku nasion nie wykluczają jednak wspólnego podstawowego mechanizmu jego kontroli (1). Działanie światła na fotoblastyczne nasiona można zastąpić działaniem gibereliny lub cytokininy (13, 14, 15), a także odpowiednią temperaturą kiełkowania. Hamujące działanie endogennych inhibitorów wzrostu na kiełkowanie nasion można eliminować lub równoważyć działaniem egzogennych stymulatorów. Z analizy wyników badań doświadczalnych jak i syntetyzujących je prace kompilacyjnych wynika, że regulacja indukcji i ustępowania spoczynku nasion większości gatunków zachodzi — niezależnie od różnic terminologicznych i interpretacyjnych — jedną wspólną drogą; to jest w wyniku zróżnicowanego w czasie i miejscu działania szeregu hormonów roślinnych (1, 2, 35, 36).

Nasiona wymagające dla normalnego kiełkowania wcześniejszego traktowania niską temperaturą potrzebują szeregu równocześnie działających czynników — odpowiedniego zakresu temperatury, czasu jej trwania, odpowiedniej wilgotności, warunków tlenowych — niezbędnych do przerwania stanu spoczynku. Mechanizmy kontroli spoczynku w tego typu nasionach, wykazujące złożoność działania i współdziałania szeregu czynników różniących się znacznie w zależności od gatunku nasion, pozostają ciągle jeszcze stosunkowo mało poznane. Stąd też prowadzone od szeregu lat, w różnych pracowniach na świecie badania nad regulacją spoczynku nasion jabłoni, doprowadziły do poznania szeregu współzależności i pozwalają na poczynienie wielu uogólnień, o wiele pewniejszych niż w przypadku porównywania danych uzyskanych na nasionach fizjologicznie i genetycznie znacznie się różniących.

Nasienie jabłoni składa się z trzech zasadniczych elementów: okrywy nasiennej, endospermu i zarodka wraz z liścieniami. Zdaniem Wierszyłłowskiego (37) stosunek wagowy poszczególnych elementów wynosi, w przeliczeniu na procent suchej masy całego nasienia: okrywa nasienne 21,7, endosperm 12,3, zarodek 66,0%. Badania Wierszyłłowskiego wykazały poza tym, że nasiona jabłoni, ze względu na skład chemiczny, można zaliczyć do grupy nasion białkowo-tłuszczowych. Zawierają w swym składzie ponad 30% białka, ponad 21% tłuszczu, około 26% węglowodanów oraz 3,20% związków mineralnych (popiół).

Nasiona jabłoni wymagają do rozpoczęcia normalnego kiełkowania przejścia okresu tzw. posprzętnego dojrzewania, które odbywa się w niskiej temperaturze i nosi nazwę stratyfikacji. Okres posprzętnego dojrzewania nasion jabłoni waha się w granicach 9—25 tygodni w zależności od odmiany, stosowanej temperatury i terminu rozpoczęcia stratyfikacji (7). Nasiona jabłoni, które nie przeszły posprzętnego dojrzewania można zmusić do kiełkowania i dalszego wzrostu zdejmując okrywy nasienne wraz z endospermem (3, 8), jednakże rośliny wyrosłe z takich nasion tworzą formy karłowate. Przeniesienie tych roślin do niskiej temperatury na okres kilku tygodni przywraca im zdolność do normalnego wzrostu. Pozwala to sądzić, że ani utrudniona wymiana gazowa, ani twardość i nieprzepuszczalność okryw nasiennych nie są czynnikami determinującymi ustępowanie spoczynku nasion jabłoni. Traktowanie wysokimi stężeniami stymulatorów wzrostu i rozwoju przyspiesza kiełkowanie nasion, ale nie daje w efekcie normalnego wzrostu siewek (3, 12). Dane te wskazują na decydującą rolę niskiej temperatury w procesie ustępowania spoczynku nasion, lecz nie tłumaczą mechanizmu działania tego czynnika.

Wydaje się więc, że jakościowe i ilościowe określenie roli hormonów roślinnych w nasionach jabłoni w różnych stadiach ich dojrzewania po-

sprzętnego, określenie wpływu hormonów na metabolizm jak również poznanie mechanizmów łączących efekt hormonu z bodźcem środowiskowym — mogą ułatwić zrozumienie mechanizmu regulacji spoczynku tych nasion. W wyniku wcześniej przeprowadzonych badań stwierdzono występowanie w nasionach jabłoni hormonów z grup auksyn (17, 22), giberelin (6, 18, 34), cytokinin (38) i kwasu abscysynowego (19, 20, 23) oraz ich działanie na szereg procesów biochemicznych w nasionach.

Celem omawianych niżej badań było poznanie roli i współdziałania kwasu abscysynowego, giberelin i cytokinin w regulacji ustępowania spoczynku i dojrzewania posprzętnego nasion jabłoni w niskiej temperaturze. W badaniach starano się określić z jednej strony rolę kwasu abscysynowego w indukcji i utrzymywaniu spoczynku nasion jabłoni oraz z drugiej strony wpływ tego związku na biosyntezę lub aktywację endogennych giberelin i cytokinin, i działanie tych hormonów na proces posprzętnego dojrzewania nasion.

Materiałem stosowanym do badań były owoce i nasiona jabłoni (*Pyrus malus* L.). W większości doświadczeń stosowano nasiona odmiany Antonówka Zwykła. Stosowaną metodykę opisano szczegółowo w cytowanych publikacjach.

Wielu autorów wysuwa hipotezę, że endogenne związki o charakterze inhibitorów wzrostu współuczestniczą wraz z giberelinami i cytokininami w regulacji ustępowania spoczynku nasion (2, 4, 15, 16, 35, 36). Z chwilą wyizolowania kwasu abscysynowego z nasion i pąków wielu różnych roślin i poznania jego współdziałania z innymi hormonami roślinnymi w regulacji szeregu procesów fizjologicznych i biochemicznych — obecności endogennego kwasu abscysynowego w nasionach przypisuje się rolę czynnika kontrolującego, w równowadze z endogennymi giberelinami i cytokininami, spoczynek nasion.

Stwierdzono wcześniej, że kwas abscysynowy jest silnym inhibitorem kiełkowania nasion i izolowanych zarodków jabłoni (11, 12, 19, 20, 24, 27) oraz obserwowano zanikanie tego związku w nasionach w miarę postępującej stratyfikacji (23). Obserwowano przy tym, że kiełkowanie częściowo stratyfikowanych nasion i zarodków jabłoni jest tym lepsze im dłuższy był okres stratyfikacji. Jednakże, jak wykazała praktyka ogrodnicza, kiełkowanie nasion przetrzymywanych dłuższy czas w jabłkach podczas przechowywania tych owoców w chłodni jest słabe, a wyrosłe z takich nasion siewki charakteryzują się słabszym wzrostem w porównaniu z siewkami uzyskanymi z nasion stratyfikowanych normalnie. Badania przeprowadzone przez Kamińskiego (11) wykazały silnie hamujący wpływ soku z jabłek na kiełkowanie izolowanych zarodków i nasion wyjętych z jabłek przechowywanych przez kilka miesięcy w niskiej tem-

peraturze. Siewki otrzymane z nasion traktowanych sokiem charakteryzowały się słabym wzrostem i skróconymi międzywęzłami. Odkrycie kwasu abscysynowego w soku z jabłek (20) oraz stwierdzenie zmiany jego poziomu w owocach podczas przechowywania (5, 28), zasugerowały możliwość hamowania przez ten związek kiełkowania nasion podczas stratyfikacji w owocach.

Przeprowadzono badania korelacji między poziomem kwasu abscysynowego w owocach przechowywanych w chłodni przez 5 miesięcy w niskiej temperaturze, sprzyjającej posprzętnemu dojrzewaniu nasion poza owocem, a zdolnością do kiełkowania wyjętych z tych owoców nasion i wyizolowanych zarodków (21).

W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono, że w miarę dojrzewania jabłek, jak również podczas ich przechowywania w chłodni, wzrasta w nich poziom endogennego kwasu abscysynowego (21, 29). Zdolność do kiełkowania zarodków i nasion izolowanych z owoców trzech odmian jabłoni przechowywanych w chłodni wzrastała wraz z długością okresu przechowywania owoców (tab. 1).

Tabela 1

Zawartość kwasu abscysynowego w miąższu u 3 odmian jabłoni w $\mu\text{g}/\text{kg}$ świeżej masy owoców oraz kiełkowanie w 20°C nasion i zarodków wyjętych z owoców po różnym okresie przechowywania w chłodni, w procentach (21)

Termin analizy	Boiken			Cox's Orange			Jonathan		
	a	b	c	a	b	c	a	b	c
Październik	36	0	—	66	0	—	30	0	—
Listopad	—	0	7	28	9	10	105	0	17
Grudzień	100	1	—	34	31	—	93	3	—
Styczeń	91	6	61	41	42	48	67	15	70
Luty	150	6	74	109	46	90	148	17	64
Marzec	112	4	—	—	—	—	56	20	—

a — zawartość ABA, b — kiełkowanie całych nasion, c — kiełkowanie izolowanych zarodków.

Procent wykiełkowanych nasion różnił się jednak w zależności od odmiany. Obserwowano także znaczne różnice we wrażliwości izolowanych zarodków na egzogeny kwas abscysynowy (tab. 2).

Wyniki powyższych doświadczeń wykazały, że w nasionach przechowywanych w owocach odbywa się proces posprzętnego dojrzewania, jednakże znacznie wolniej niż w warunkach normalnych. Wyniki te sugerowały, że kwas abscysynowy obecny w miąższu owoców mógł wpływać hamująco na ten proces i powodować przedłużenie okresu spoczyn-

Tabela 2

Wpływ kwasu abscysynowego (3 $\mu\text{g/ml}$) na kiełkowanie w 21°C zarodków jabłoni wyizolowanych z nasion przebywających w owocach w temp. 4°C od października (21)

Odmiany	Termin kiełkowania	Procent wykiełkowanych zarodków po dniach					
		kontrola			kwas abscysynowy *		
		3	4	5	3	4	5
Boiken	luty	27	42	64	0	0	0
Boiken	marzec	16	72	92	0	0	0
Cox's Orange	luty	50	70	90	12	12	12
Cox's Orange	marzec **	60	100	—	8	44	84
Jonathan	luty	17	44	64	0	0	0
Jonathan	marzec	32	84	100	12	21	29

*) Nie wykiełkowane izolowane zarodki jabłoni traktowane kwasem abscysynowym przeniesiono do temperatury 4°C na 1 miesiąc, a następnie przeniesiono ponownie do temperatury 20°C. Wszystkie wykiełkowały w tej temperaturze po 3 dniach

***) Nasiona wyjęte z gnijących owoców w celu sprawdzenia czy są żywotne i zdolne do kiełkowania

ku nasion, gdyż zdolność do kiełkowania nasion badanych odmian znajdowała się w odwrotnej proporcji do stężenia ABA w miąższu. Na taką rolę kwasu abscysynowego wskazują również wyniki doświadczeń nad przebiegiem posprzętnego dojrzewania nasion w przechowywanych owocach jabłoni uzyskane przez Grzyba i in. (10).

Zmniejszanie się poziomu kwasu abscysynowego w nasionach jabłoni w czasie stratyfikacji, w miarę ustępowania spoczynku nasion (23) oraz hamowanie przez ten związek kiełkowania nasion przechowywanych w owocach, może świadczyć o jego udziale w regulacji spoczynku nasion jabłoni. Zmniejszająca się, w trakcie stratyfikacji wrażliwość izolowanych zarodków jabłoni na syntetyczny ABA, popiera tę hipotezę.

Nie mając możliwości badania bezpośredniego wpływu endogennego kwasu abscysynowego na przebieg procesu stratyfikacji, badano wpływ egzogennego ABA, podawanego nasionom przez moczenie ich w roztworach ABA przed stratyfikacją (30). Moczenie niestratyfikowanych nasion jabłoni w roztworach kwasu abscysynowego wpływało hamująco na kiełkowanie w 20°C. izolowanych z tych nasion zarodków w początkowych etapach stratyfikacji, ale praktycznie nie wpływało na ich kiełkowanie w końcowym okresie stratyfikacji.

Intensywność kiełkowania nasion traktowanych ABA i stratyfikowanych w 4°C była w niskiej temperaturze znacznie mniejsza, niż nasion nie traktowanych ABA (tab. 3).

Tabela 3

Wpływ moczenia nasion przed stratyfikacją, w roztworach kwasu abscysynowego na ich kiełkowanie w 4°C (30)

Nasiona moczone przed stratyfikacją w	Nasiona ze zbioru					
	1969			1970		
	tygodnie stratyfikacji					
	9	10	11	9	10	11
H ₂ O (kontrola)	6,0	52	95	2,7	80	98
10 ppm ABA	3,8	25	88	1,4	14	75
20 ppm ABA	—	—	—	1,2	10	70
40 ppm ABA	2,0	23	34	1,0	6	50

Obserwowano przy tym, że gdy nasiona traktowane ABA przeniesiono do temp. 20°C ich kiełkowanie było znacznie słabsze, w porównaniu z nietraktowanymi nasionami w kontroli.

Zmniejszone pod wpływem ABA kiełkowanie całych nasion jabłoni w końcowych etapach stratyfikacji mogłoby wskazywać na hamowanie przez ten związek procesu ustępowania spoczynku nasion. Z drugiej strony jednak kiełkowanie zarodków izolowanych z nasion traktowanych ABA nie różniło się praktycznie od kiełkowania zarodków z nasion nietraktowanych. Wydaje się więc, że podwyższony poziom ABA w nasionach w początkowym etapie stratyfikacji powodował raczej zahamowanie procesu kiełkowania całych nasion niż ustępowanie spoczynku embrionalnego. Nie można też wykluczyć, że hamowanie kiełkowania całych nasion przez kwas abscysynowy było wywołane modyfikowaniem oddziaływania tego związku przez tkanki okrywające zarodek, co w sposób pośredni mogło wpłynąć hamująco na kiełkowanie.

Hamowanie procesu kiełkowania, a nie ustępowania spoczynku w nasionach stratyfikowanych po potraktowaniu syntetycznym ABA potwierdzają w pewnym stopniu wyniki doświadczeń nad przemieszczaniem się radioaktywnego 1-¹⁴C-ABA w nasionach jabłoni podczas moczenia i stratyfikacji (26). W wyniku tych badań stwierdzono, że całkowita radioaktywność znakowanego ABA, obecnego w nasionach po 24 godzinach moczenia suchych, niestratyfikowanych nasion w roztworze 1-¹⁴C-ABA, zanika stopniowo podczas ich stratyfikacji (tab. 4).

Tabela 4

Zmiany w poziomie $1\text{-}^{14}\text{C-ABA}$ w tkankach nasion jabłoni,
wyrażone w impulsach min/gram suchej masy (26)

Badana tkanka	Dni stratyfikacji				
	2	7	21	35	63
Okrywy nasienne	28 546	28 265	20 492	19 607	8 326
Endosperm	16 271	11 038	12 331	11 364	7 250
Liścienie	43	247	388	414	101
Korzeń zarodkowy	326	1 917	2 914	3 557	2 003

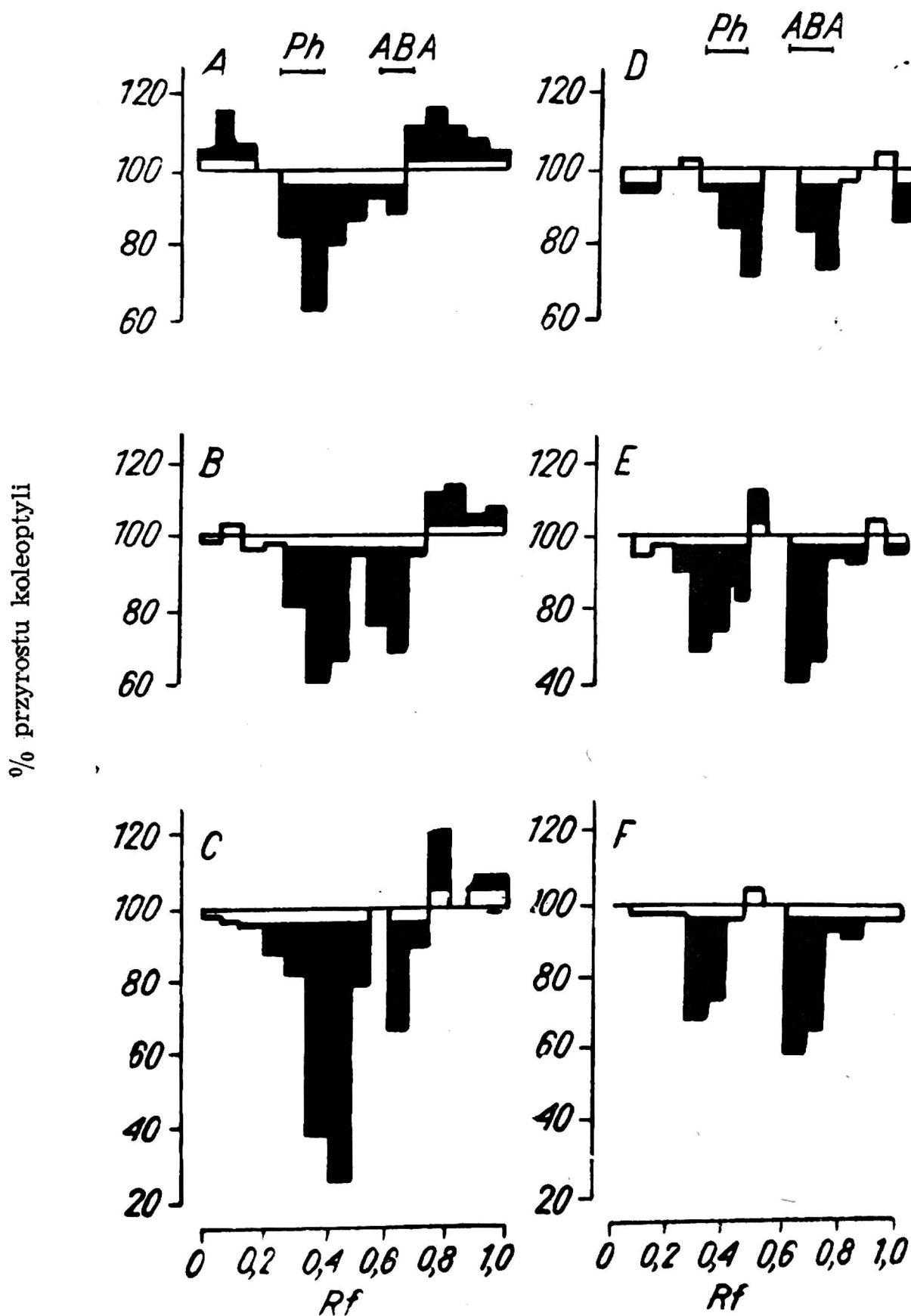
Obserwowano przy tym spadek radioaktywności w okrywach nasiennych i endospermie, przy równoczesnym znacznym jej wzroście do 35 dnia stratyfikacji w liścieniach i korzeniu zarodkowym.

Można sądzić, że podobnemu do radioaktywnego ABA przemieszczaniu się w stratyfikowanych nasionach podlega endogenne kwas abscysynowy. Na taką możliwość wskazują wyniki doświadczenia nad akumulacją endogenego kwasu abscysynowego w nasionach jabłoni podczas ich dojrzewania (24). Stwierdzono, że poziom endogenego ABA w nasionach zwiększa się w miarę dojrzewania nasion i osiąga maksimum w nasionach w pełni dojrzałych (rys. 1).

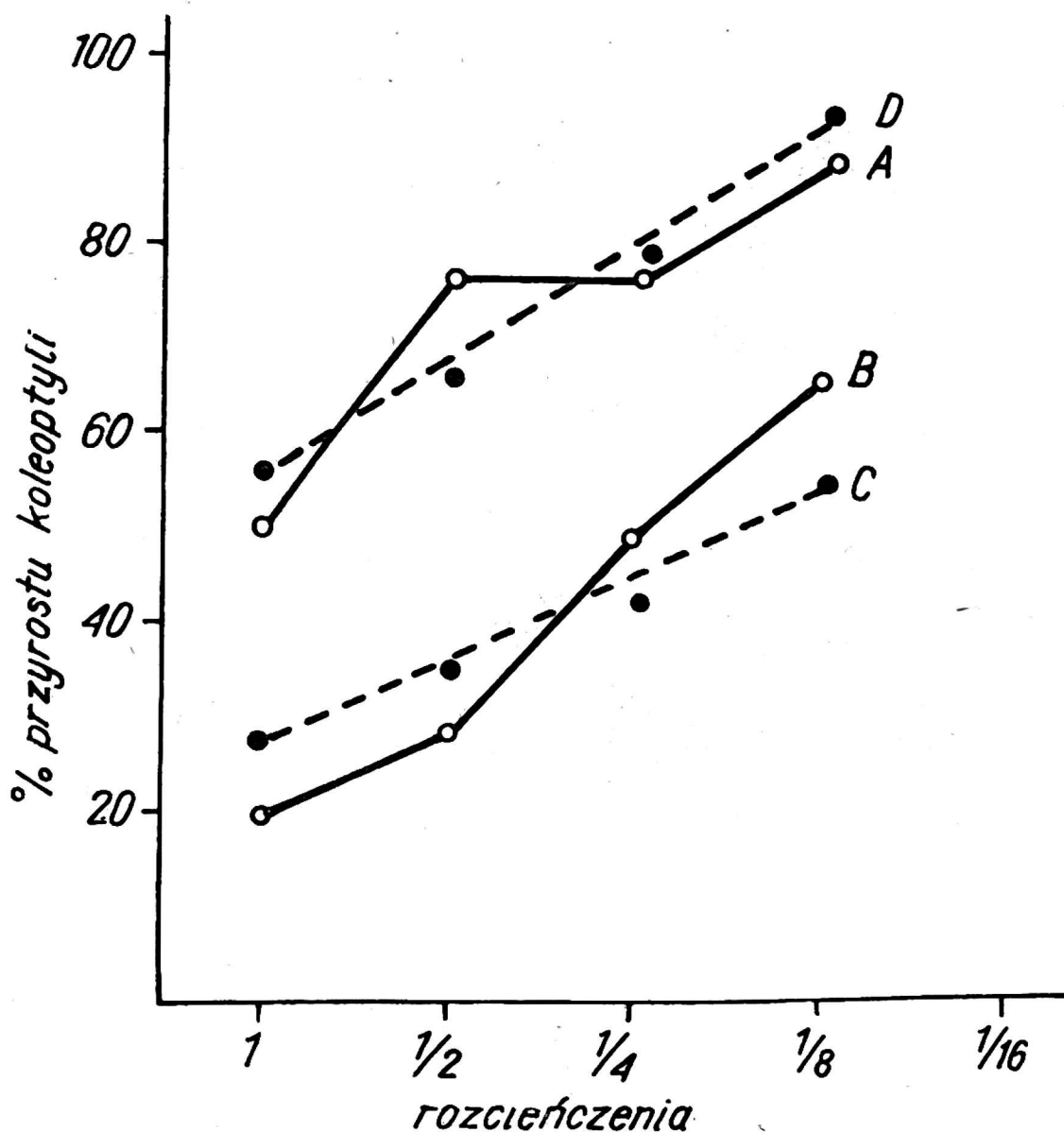
Zawartość tego związku w okrywach nasiennych jest około 8 razy wyższa niż w zarodkach (rys. 2). Jeżeli stężenie tego związku przeliczyć na jednostki suchej masy tkanek, to jest ono około 16 razy wyższe w okrywach nasiennych niż w zarodkach (24).

Wyniki powyższych doświadczeń wskazują na to, że przemieszczanie się endogenego kwasu abscysynowego, podczas pęcznienia nasion, z okryw nasiennych do liścieni i korzenia zarodkowego w początkowych etapach stratyfikacji, może hamować wzrost i wydłużanie się korzenia zarodkowego pod koniec stratyfikacji. Wydaje się więc, że różnice w energii kiełkowania i długości okresu posprzętnego dojrzewania nasion jabłoni z różnych sezonów wegetacyjnych, zależą od początkowego poziomu kwasu abscysynowego w suchych niestratyfikowanych nasionach i od zdolności nasion do dezaktywacji tego związku w początkowym okresie stratyfikacji.

Wysoki poziom kwasu abscysynowego w dojrzałych nasionach jabłoni może być wynikiem jego przemieszczania się z miąższu dojrzewających owoców do nasion. Przeprowadzone badania nad zmianami stężeń kwasu abscysynowego w owocach jabłoni, w miarę ich dojrzewania na drzewie (29), wykazały kilkakrotny wzrost stężenia tego związku w miąższu owoców w pełni dojrzałych, w porównaniu z owocami z wcześniejszych stadiów rozwoju.



Rys. 1. Zmiany w poziomie kwasu abscysynowego ABA i florydzy Ph w dojrzewających nasionach jabłoni oznaczone na podstawie aktywności w teście wydłużeniowym koleoptyli pszenicy. Nasiona zbierane: A — 13.07, B — 31.07, C — 14.08, D — 29.08, E — 6.09, F — 14.09.1972 roku



Rys. 2. Różnice w zawartości kwasu abscysynowego w izolowanych zarodkach jabłoni i okrywach nasiennych z tej samej ilości nasion. Oznaczono na podstawie aktywności w teście wydłużeniowym koleoptyli pszenicy. A-D — krzywe wzrostowe koleoptyli w obecności szeregu geometrycznych rozcieńczeń; A — ABA izolowanego z zarodków, B — ABA izolowanego z okryw nasiennych, C — 1,0 $\mu\text{g/ml}$ syntetycznego ABA, D — 0,12 $\mu\text{g/ml}$ syntetycznego ABA.

Rezultaty badań nad wpływem kwasu abscysynowego na syntezę i aktywność niektórych enzymów w nasionach jabłoni (16, 31, 33) wskazują na współdziałanie ABA w regulowaniu w nasionach tych procesów fizjologicznych i biochemicznych, o których wiadomo, że są sterowane przez gibereliny i cytokininy. Stąd też w kolejnym etapie pracy starano się określić wpływ egzogennych giberelin i cytokinin na przebieg stratyfikacji i ustępowania spoczynku nasion jabłoni oraz poznać wpływ kwasu abscysynowego na aktywność endogennych giberelin i cytokinin, w różnych etapach stratyfikacji nasion.

W nasionach jabłoni zidentyfikowano gibereliny A_4 , A_7 (6) oraz A_9 (Lewak i in., niepublikowane dane). Wykazano także stymulujący wpływ giberelin i cytokinin na kiełkowanie częściowo stratyfikowanych nasion i zarodków jabłoni (3, 9, 12, 27).

W badaniach nad wpływem egzogennych cytokinin i giberelin — podanych spoczynkowym nasionom przed stratyfikacją — na zdolność nasion do kiełkowania i długość ich spoczynku (31), stwierdzono stymulujący wpływ tych związków, szczególnie GA_{4+7} , na kiełkowanie izolowanych zarodków i nasion w początkowym okresie stratyfikacji. Po dłuższym okresie stratyfikacji stymulujące działanie tych związków zanikało.

Badano również wpływ egzogennych hormonów roślinnych na pobieranie tlenu przez izolowane z nasion zarodki i ich homogenaty oraz aktywność enzymów oksydacyjnych katalazy i oksydazy fenolowej. Stwierdzono podwyższoną aktywność oksydazy fenolowej i katalazy w nasionach traktowanych GA_{4+7} i obniżoną aktywność tych enzymów, w porównaniu do kontroli, w nasionach traktowanych ABA (tab. 5).

Pobieranie tlenu przez stratyfikowane przez 80 dni izolowane zarodki i ich homogenaty było w porównaniu do kontroli, wyższe w przypadku nasion traktowanych GA_{4+7} i kinetyną i znacznie obniżone w nasionach traktowanych ABA. Dane te wskazują na współdziałanie ABA, giberelin i cytokinin w regulacji procesów oksydacyjnych w nasionach.

Wpływ traktowania spoczynkowych nasion przed stratyfikacją roztworami giberelin i kinetyną na kiełkowanie nasion w niskiej temperaturze (4°C) był zróżnicowany w zależności od stosowanego hormonu roślinnego (rys. 3; 31).

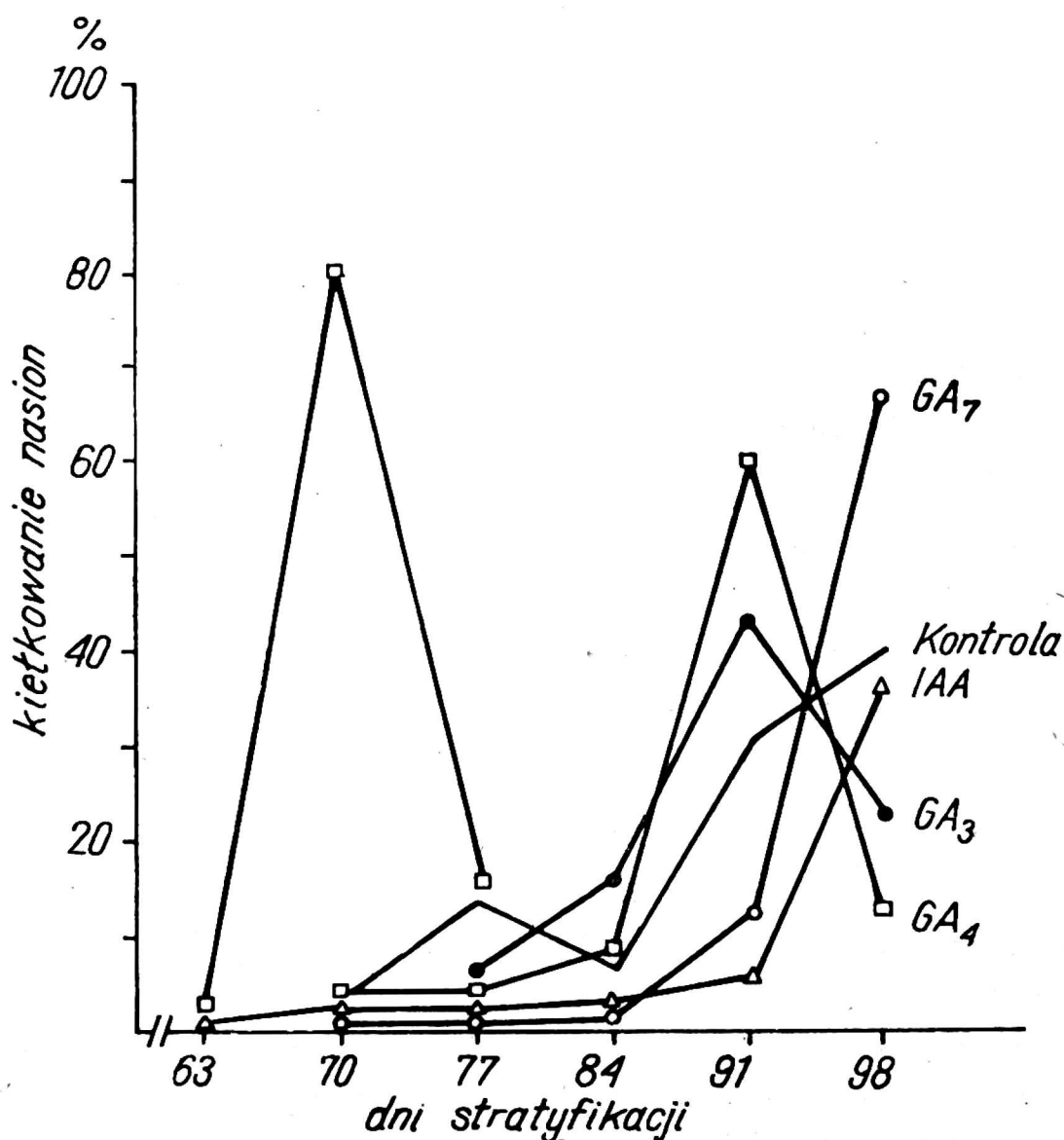
Obserwowano, że nasiona traktowane GA_7 kiełkowały w 98 dniu stratyfikacji w znacznie wyższym procencie niż nasiona kontrolne. Nasiona traktowane GA_3 i GA_4 kiełkowały najintensywniej o tydzień wcześniej. Nasiona traktowane kinetyną wykiełkowały w 80 procentach już w 10 tygodniu stratyfikacji. Jeżeli zdolność nasienia do kiełkowania w niskiej temperaturze świadczy o zakończeniu przez nie procesu posprzętnego dojrzewania — to możemy przyjąć, że traktowanie nasion przed stratyfikacją roztworem kinetyny spowodowało skrócenie okresu stratyfikacji nasion co najmniej o 4 tygodnie. Wyniki tych doświadczeń wykazały ponadto, że poziom giberelin i cytokinin w nasionach jabłoni w początkowym okresie pęcznienia nasion podczas stratyfikacji decyduje o czasie posprzętnego dojrzewania, intensywności i równomierności kiełkowania nasion po stratyfikacji.

Równoczesne występowanie w spoczynkowych nasionach jabłoni endogennych cytokinin, giberelin i kwasu abscysynowego w różnych wza-

Tabela 5

Aktywność oksydazy fenolowej i katalazy w zarodkach izolowanych z nasion jabłoni po różnym okresie stratyfikacji. Aktywność wyrażona w $\mu\text{M O}_2/\text{g}$ świeżej masy/min (31)

Kombinacje	Dni stratyfikacji					
	oksydaza fenolowa				katalaza	
	7	37	57	80	37	57
Kontrola	0	0,027	0,040	0,040	114,29	224,6
GA ₄₊₇ — 200 ppm	0	0,190	0,396	0,336	141,84	310,3
Kinetyna 50 ppm	0	0,010	0,040	0,047	106,38	255,3
IAA — 20 ppm	0	0,012	0,012	0,032	85,69	239,3
ABA — 10 ppm	0	0,000	0,004	0,028	98,70	236,0
ABA — 50 ppm	0	0,000	0,000	0,008	73,87	209,6
ABA — 50 ppm + + kinetyna 50 ppm	0	0,004	0,000	0,012	92,60	176,2



Rys. 3. Kiełkowanie nasion jabłoni w 4°C podczas stratyfikacji, po uprzednim traktowaniu roztworami hormonów roślinnych

jemnych proporcjach oraz zmiany stężeń tych związków podczas stratyfikacji się pod kontrolą endogennych giberelin i cytokinin, 5) równowag-stymulatorów w regulacji ustępowania spoczynku nasion jabłoni. O zmianach w tej równowadze decyduje aktywność układów biosyntetyzujących i inaktywujących poszczególne hormony. Aktywność tych układów może być regulowana czynnikami fizycznymi środowiska, może być także regulowana hormonalnie poprzez wpływ jednych hormonów na produkcję innych. Wychodząc z założenia, że kwas abscysynowy jest czynnikiem indukującym i utrzymującym spoczynek nasion jabłoni, badano jego wpływ na biosyntezę lub aktywację endogennych giberelin (32) i cytokinin (25) w nasionach.

Doświadczenia Sińskiej i Lewaka (34) wykazały, że poziom endogennych giberelin A_4 i A_7 w nasionach jabłoni podlega znacznym fluktuacjom podczas stratyfikacji. Obserwowano znaczny wzrost stężenia GA_4 w nasionach między 3 i 5 tygodniem ich stratyfikacji.

W badaniach nad wpływem egzogenego kwasu abscysynowego na biosyntezę lub aktywację giberelin porównano poziom giberelin w nasionach stratyfikowanych w obecności syntetycznego ABA, z poziomem giberelin w nasionach stratyfikowanych bez kwasu abscysynowego (32). W wyniku tych doświadczeń stwierdzono, że traktowanie nasion kwasem abscysynowym wywoływało drastyczne zmniejszenie poziomu gibereliny A_4 i znaczne zmniejszenie poziomu gibereliny A_7 w nasionach w pierwszych 4 tygodniach stratyfikacji (tab. 6 — A, B).

Tabela 6

Zawartość giberelin (10^{-12} M) w 100 zarodkach jabłoni izolowanych z nasion A. stratyfikowanych w wodzie i kiełkujących przez 7 dni w obecności wody lub ABA (7×10^{-8} M; 32)

Dni stratyfikacji	H_2O		ABA	
	GA_4	GA_7	GA_4	GA_7
7	12,6	33,0	3,9	6,6
14	21,0	43,5	6,4	16,5
21	214,0	32,0	13,6	27,5
28	143 000,0	31,0	64,0	31,0
35	10,6	43,5	9,9	36,5

Tabela 6

B. stratyfikowanych w obecności ABA (7×10^{-8} M) i kiełkujących w obecności tego samego stężenia ABA (32)

Dni stratyfikacji	Świeżo izolowane zarod.		Zarodki po 7 dn. kiełk.	
	GA ₄	GA ₇	GA ₄	GA ₇
7	6,6	8,2	11,6	10,0
14	9,9	3,1	8,2	—
21	9,7	—	12,6	31,0
28	12,6	31,0	9,9	37,5
35	12,6	31,0	12,6	31,0

W nasionach nietraktowanych ABA gwałtowny wzrost poziomu endogennej GA₄ między 3 i 5 tygodniem stratyfikacji jest skorelowany z równoczesnym zanikaniem endogennego kwasu abscysynowego. Dane te, jak również wyniki doświadczeń nad włączaniem znakowanego mewalonianu do GA₄ w nasionach jabłoni (I. Sińska, St. Lewak, niepublikowane dane) wskazują na hamowanie przez kwas abscysynowy biosyntezy giberelin w tych nasionach podczas stratyfikacji.

Badanie wpływu kwasu abscysynowego na poziom endogennych cytokinin w nasionach jabłoni (25) wykazało znaczne zmniejszenie aktywności związków cytokinino-podobnych w stratyfikowanych nasionach, traktowanych przed rozpoczęciem stratyfikacji kwasem abscysynowym (tab. 7).

Tabela 7

Przyrost masy tkanki kalusowej tytoniu w obecności związków cytokinino-podobnych, izolowanych z nasion po różnym czasie stratyfikacji, wyrażony w procentach przyrostu powyżej kontroli. Frakcje zawierające cytokiny rozdzieleno chromatograficznie przed i po ich hydrolizie (25)

Tygodnie stratyfikacji	Aktywność w ekstraktach bez hydrolizy		Dodatkowa aktywność w ekstraktach po hydrolizie	
	nasiona moczone w:			
	H ₂ O	ABA-40 ppm	H ₂ O	ABA-40 ppm
0	43	—	611	—
1	113	—	279	—
3	256	202	80	182
5	287	93	310	26
7	213	100	107	—25
12	156	138	—62	—96

Obserwowano przy tym, że w nasionach niestratyfikowanych aktywność związków cytokininowych obecnych w ekstrakcie po hydrolizie jest znacznie wyższa niż w ekstrakcie niehydrolizowanym. Dane te wskazują na możliwość uwalniania się w nasionach, podczas stratyfikacji, aktywnych cytokinin z mniej aktywnych lub nieaktywnych ich kompleksów. Hipotezę tę potwierdza wysoka aktywność cytokinin w ekstraktach hydrolizowanych, otrzymanych z nasion niestratyfikowanych i stopniowy spadek ich aktywności, oraz stopniowy wzrost aktywności wolnych cytokinin w ekstraktach niehydrolizowanych, w miarę wydłużania stratyfikacji nasion. Maksymalny poziom wolnych cytokinin obserwowano w nasionach po 5 tygodniach ich stratyfikacji.

Wyniki tego doświadczenia pozwalają sądzić, że działanie kwasu abscysynowego w nasionach jabłoni polega na hamowaniu rozkładu nieaktywnych kompleksowych związków cytokinin lub hamowaniu ich biosyntezy.

Wyniki przeprowadzonych doświadczeń wskazują, że hamowanie przez kwas abscysynowy biosyntezy giberelin i cytokinin może powodować w efekcie hamowanie, w sposób pośredni, biosyntezy i aktywności niektórych układów enzymatycznych, których aktywność jest kontrolowana przez endogenne gibereliny i cytokininy.

Zgodnie z hipotezą Amena (2) okres spoczynku nasion można podzielić na cztery zasadnicze fazy:

- 1) Faza indukująca — charakteryzująca się uaktywnieniem lub nagromadzeniem się czynnika indukującego spoczynek.
- 2) Faza kryptobiotycznego mechanizmu kontroli — wytworzenie się i hamujące działanie bloku metabolicznego na kiełkowanie.
- 3) Faza wyzwalaająca — charakteryzująca się akumulacją lub aktywacją czynników prowadzących do zaktywowania metabolizmu.
- 4) Faza kiełkowania — związana z rozpoczęciem intensywnego rozmnażania się komórek, degradacją materiałów zapasowych przez enzymy, mobilizacją składników pokarmowych i rozpoczęciem wzrostu.

Na podstawie przeprowadzonych badań wydaje się, że kwas abscysynowy pełni w nasionach jabłoni rolę czynnika indukującego i utrzymującego ich spoczynek i wywiera swoje działanie głównie w fazie indukującej i fazie kryptobiotycznej kontroli. O takiej roli kwasu abscysynowego w nasionach świadczy jego nagromadzenie się w nasionach podczas ich dojrzwania, hamowanie przez ABA kiełkowania nasion w owocach, hamowanie kiełkowania — zarówno w niskiej jak i wysokiej temperaturze — nasion traktowanych przed stratyfikacją syntetycznym ABA.

Działanie swoje może kwas abscysynowy wywierać poprzez: 1) hamowanie biosyntezy giberelin, 2) hamowanie biosyntezy lub aktywacji cytokinin, 3) hamowanie biosyntezy lub aktywacji enzymów oksydacyjnych, 4) hamowanie produkcji lub aktywacji innych enzymów znajdujących się pod kontrolą endogennych giberelin i cytokinin. 5) równoczesne działanie w kilku lub wszystkich wyżej wymienionych procesach.

Hamowanie przez kwas abscysynowy biosyntezy giberelin może powodować pośrednio hamowanie produkcji cytokinin, poprzez inhibicję biosyntezy lub aktywacji enzymów hydrolizujących nieaktywne kompleksy cytokinin. Wysoki poziom endogennego ABA w okrywach nasionnych, oraz jego przemieszczanie się i akumulacja w korzeniu zarodkowym może powodować hamowanie wzrostu korzenia, szczególnie w niskiej temperaturze. Na takie działanie endogennego ABA wskazuje hamowanie przez syntetyczny ABA — podany nasionom przed stratyfikacją — kiełkowania nasion po dłuższym okresie stratyfikacji, w wysokiej i niskiej temperaturze, mimo że nie obserwowano hamowania kiełkowania izolowanych zarodków. Ten brak hamowania kiełkowania zarodków mógł być wywołany albo zastosowaniem zbyt niskiego stężenia syntetycznego ABA w początkowym okresie stratyfikacji, albo wysoką aktywnością w fazie kiełkowania układu metabolizującego nadmiar ABA.

Znaczny wzrost poziomu endogennych giberelin i cytokinin w nasionach w 4—5 tygodniu stratyfikacji — to jest po znacznym obniżeniu poziomu endogennego ABA w nasionach — wskazuje na działanie tych hormonów głównie w fazie wyzwalającej. Obniżenie poziomu endogennych giberelin i cytokinin w nasionach w późniejszym okresie stratyfikacji popiera tę hipotezę.

Traktowanie nasion przed stratyfikacją kinetyną i przesunięcie równowagi hormonalnej na korzyść cytokinin w początkowym okresie stratyfikacji — powodowało znaczne skrócenie okresu stratyfikacji nasion. Może to wskazywać na kontrolowanie i stymulowanie przez cytokiny aktywności układu dezaktywującego endogenne kwas abscysynowy, co w konsekwencji prowadzi do skrócenia fazy kryptobiotycznej kontroli. Na taką możliwość wskazuje z jednej strony wysoki poziom endogennych cytokinin (w formie związanej) w spoczynkowych nasionach, z drugiej strony szybkie zmniejszanie się poziomu endogennego kwasu abscysynowego w pierwszych tygodniach stratyfikacji przy równoczesnym wzroście aktywności cytokinin.

Wyniki te potwierdzają postulowaną przez Khana (15) hipotezę, że kwas abscysynowy hamuje stymulowane przez endogenne gibereliny procesy prowadzące do kiełkowania, a rola cytokinin polega przede

wszystkim na przeciwdziałaniu ABA i umożliwienia działania gibereliny. Nie można także wykluczyć wzajemnego wpływu tych związków na ich biosyntezę.

Traktowanie nasion przed stratyfikacją gibereliną powodowało stymulację kiełkowania nasion w niskiej temperaturze pod koniec stratyfikacji. Wskazuje to na działanie tego hormonu, poprzez kontrolę produkcji szeregu enzymów hydrolitycznych i rozkład substancji zapasowych, głównie w fazie wyzwalającej i kiełkowania.

LITERATURA

1. Amen R.D.: The concept of seed dormancy. Amer. Sci. 51, 408—424, 1963.
2. Amen R.D.: A model of seed dormancy. Bot. Rev. 34 1—31, 1968.
3. Badizadegan M., Carlson R. F.: Effect of N⁵ benzyloadenine on seed germination and seedling growth of apple (*Malus sylvestris* Mill). Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. 91, 1—8, 1967.
4. Black M.: Seed germination and dormancy. Sci Prog. Oxf. 58, 379—393, 1970.
5. Borecka H., Pieniążek J.: Stimulatory effect of abscisic acid on spores germination of *Gleosporium album* Ostrew. and *Botritis cinerea* Pers. Bull. Acad. Polon. Sci., ser. biol. 16, 655—659, 1968.
6. Dennis F. G., Nitsch J. P.: Identification of gibberellins A₄ and A₇ in imature apple seeds. Nature 211, 781—782, 1966.
7. Duczmal K.: Badania nad przemianami fizjologicznymi w stratyfikowanych nasionach jabłoni. Soc. Scient. Stetiensis 18, z 2, 1—48 1963.
8. Flemion F.: Dwarf seedlings from non -after-ripened embryos of peach, apple and hawthorn. Contr. Boyce Thopm. Inst. 6, 205—209 1943.
9. Frankland B.: Effect of gibberellic acid, kinetin, and other substances on seed dormancy. Nature 192, 678—679, 1961.
10. Grzyb Z.S., Zagaja S.W., Kamiński W.: Przebieg posprzętnego dojrzewania nasion w przechowywanych owocach jabłoni. Prace Inst. Sad. 13, 39—50, 1969.
11. Kamiński W.: Inhibitory effect of apple juice on the germination of apple and cherry seeds and the growth of apple seedlings. Acta. Soc. Bot. Polon. 37, 173—178, 1968.
12. Kamiński W., Pieniążek J.: The effect of different growth regulators on the germination of the apple cultivar Antonovka dehusked seeds. Bull. Acad. Pol. Sci., ser. biol. 16, 719—723, 1968.
13. Khan A.A.: Promotion of lettuce seed germination by gibberellin. Plant Physiol. 35. 333—339, 1960.
14. Khan A.A., Tolbert N.E.: Reversal of inhibitors of seed germination by red light plus kinetin. Physiol. Plant. 18, 41—43, 1965.
15. Khan A.A.: Cytokinins: permissive role in seed germination Science 171, 853—859, 1971.
16. Lewak St., Rychter A., Sińska I.: Gibberellins and the dormancy of apple seeds. Proc. International Conf. on Natural Plant Growth Substances Libice 1972, Czechosłowacja.

17. Luckwill L.C.: Studies of fruit development in relation to plant hormones. IV: Acidic auxins and growth inhibitors in leaves and fruits of the apple. *J. Hort. Sci.* 32, 18—32, 1957.
18. Luckwill L.C., Weaver P., MacMillan J.: Gibberellins and other growth hormones in apple seeds. *J. Hort. Sci.* 44, 413—424, 1969.
19. Pieniżek J., Grochowska M.J.: The role of the natural growth inhibitor (Abscisin II) in apple seed germination on the changes in the content of phenolic substances during stratification. *Acta. Soc. Bot. Polon.* 36, 579—587 1967.
20. Pieniżek J., Rudnicki R.: The presence of abscisic acid in apple leaves and apple fruit juice. *Bull. Acad. Polon. Sci. ser. biol.* 15, 251—254, 1967.
21. Pieniżek J., Rudnicki R.: The inhibitory effect of endogenous abscisic acid on after-ripening of apple seed in the fruit. *Bull. Acad. Polon. Sci., ser. biol.* 17, 707—711, 1969.
22. Raussendorf-Bargen G.Von: Indolderivate in Apfel. *Planta* 48, 471—482, 1962.
23. Rudnicki R.: Studies on abscisic acid in apple seeds. *Planta (Berl.)* 86, 63—68, 1969.
24. Rudnicki R.: Accumulation of abscisic acid in the maturing apple seeds Proc. 3-rd Symposium on Accumulation and Translocation of Nutrients and Regulators in Plant Organism, Warszawa, May. 14 th-18 th Proc. Res. Inst. Pomol. Ser. E, No 3, 283—290, 1973.
25. Rudnicki R., Borkowska B.: The effect of abscisic acid on the cytokinin level in apple seeds during stratification. *Proc. Res. Inst. Pomol. Ser. E, No 3, 291—296, 1973.*
26. Rudnicki R., Czapski J.: The uptake and degradation of 1—¹⁴C-ABA apple seeds during stratification. *Ann. of Botany*, 38, 189—192, 1974.
27. Rudnicki R., Kamiński W., Pieniżek J.: The interaction of abscisic acid with growth stimulators in germination of partially after-ripened apple embryos. *Biol. Plantarum (Praha)* 13, 122—128, 1971.
28. Rudnicki R., Machnik J., Pieniżek J.: Accumulation of abscisic acid during ripening of pears (Clapp's Favourite) in various storage conditions. *Bull. Acad. Polon. Sci., ser. biol.* 16, 509—512 1968.
29. Rudnicki R., Pieniżek J.: The changes in the concentration of abscisic acid (ABA) in developing and ripe apple fruits. *Bull. Acad. Polon. Sci., ser. biol.* 18, 577—580, 1970.
30. Rudnicki R., Pieniżek J.: The effect of abscisic acid on stratification of apple seeds. *Bull. Acad. Polon. Sci., ser. biol.* 21, 149—154, 1973.
31. Rudnicki R., Saniewski M., Millikan D.F.: The effect of exogenous plant hormones upon the stratification of apple seeds. Proc. 3-rd Symposium on Accumulation and Translocation of Nutrients and Regulators in Plant Organism. Warszawa, May 11 th-18 th. Proc. Res. Inst. Pomol. Ser. E, No 3, 539—552, 1973.
32. Rudnicki R., Sińska I., Lewak St.: The influence of abscisic acid on the gibberellin content in apple seeds during stratification. *Biol. Plantarum (Praha)* 14, 325—329, 1972.
33. Rychter A., Rudnicki R., Lewak St.: Regulation of acid phosphatase activity by abscisic acid and gibberellin in apple seeds during stratification. *Bull. Acad. Polon. Sci. ser. biol.*, 19, 211—214, 1971.

34. Sińska I, Lewak St.: Apple seeds gibberellins. *Physiol. Veg.* 8, 661—667, 1970.
35. Villiers T.A.: Seed dormancy, in *Seed Biology* vol. II ed TT. Kozłowski, Academic Press, N.Y. London 1972 pp 219—281.
36. Wareing P.F., Saunders P.F.: Hormones and dormancy. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 22, 261—288, 1971.
37. Wierszyłowski J.: O budowie anatomicznej i składzie chemicznym nasion jabłoni i grusz. *Rocz. N. Roln.* 81, 205—228, 1960.
38. Zwar J.A., Bottomley W., Kefford N.P.: Kinin activity from plant extracts. II: Partial purification and fractionation of kinins in apple extract. *Aust. J. Biol. Sci.* 10, 407—415, 1963.