

J. S. KNYPL

Katedra Fizjologii Roślin Uniwersytetu Łódzkiego

NATURALNE I SYNTETYCZNE REGULATORY WZROSTU I ROZWOJU ROŚLIN

A. KUMARYNA

II. MECHANIZM DZIAŁANIA KUMARYNY NA KIEŁKOWANIE NASION

Poprzednio przytoczone dane (62) dowodzą, że kumaryna nie jest odpadowym produktem przemiany materii, lecz syntetyzowana z kwasu cynamonowego — podlegającego hydroksylacji w pozycji orto — zostaje w komórce roślinnej przemieniana następnie na kwas melilotowy i szeregu innych, nie zidentyfikowanych pochodnych. Podana z zewnątrz, kumaryna ulega oksydatywnemu rozpadowi w nasionach pszenicy (92) oraz może być wykorzystywana przez mikroorganizmy jako jedyne źródło węgla. Substancję tę spotyka się pospolicie w świecie roślinnym, głównie w ilościach śladowych, lecz u niektórych gatunków występować może w ilościach bardzo znacznych, rzędu 4—5% suchej masy. Zaznaczyć wszakże należy, że *in vivo* kumaryna występuje zasadniczo pod postacią β -glikozydu kwasu cis-o-hydroksycynamonowego. Wolna kumaryna, nawet u takich roślin jak *Melilotus sp.* czy *Asperula sp.*, w warunkach normalnych występuje prawdopodobnie tylko w ilościach śladowych.

Fakt powszechnego występowania kumaryny w świecie roślinnym — w tym również w nasionach — nasuwa myśl, że jest to substancja sprawująca kontrolę nad określonymi funkcjami fizjologicznymi rośliny. Celem obecnego przeglądu jest przedstawienie znanych faktów odnośnie wpływu kumaryny na proces kiełkowania nasion.

Uwagi o naturze zjawiska kiełkowania nasion

Kiełkowanie, z fizjologicznego punktu widzenia, oznacza skojarzenie oddychania ze wzrostem (152). Jeżeli przyjąć, że jest to specyficzne stadium w cyklu rozwojowym rośliny, oddzielające okres uśpienia (dormancy) od wzrostu, to można je zdefiniować jako ów nieprzerwany ciąg

Skróty: B995, 1.1-dwumetylohydrazyd kwasu bursztynowego; CCC, chlorek (2-chloroetylo) trójmetyloamoniowy; Phosfon D, chlorek 2,4-dwuchlorobenzylotrójbutylofosfoniowy; GA, kwas giberelinowy; IAA, kwas indolilo-3-octowy; DNP, 2,4-dwunitrofenol; 2.4-D, kwas 2,4-dwuchlorofenoksyoctowy; R, światło czerwone; FR, daleka czerwień.

nej zawartości tlenu lub dwutlenku węgla. Przy zbyt niskich lub zbyt wysokich temperaturach nasiona nie kiełkują. Jednakże nasiona niektórych gatunków roślin kiełkują dopiero po przebytowaniu przez określony przeciąg czasu przy zmieniającej się niskiej i wysokiej, lub tylko niskiej temperaturze (77, 144), przy czym dodatkowym warunkiem niezbędne jest zapewnienie dostatecznego dopływu wody. Nasiona wymagające stratyfikacji, tzn. przechowywania w niskiej temperaturze w stanie wilgotnym, można niekiedy pobudzić do kiełkowania w inny sposób, na przykład przez całkowite usunięcie łupin nasiennych lub odcięcie liścieni (36); jednak wyrastające w tym ostatnim przypadku siewki są zdeformowane. Wreszcie bardzo istotny wpływ na kiełkowanie nasion wielu gatunków roślin wywiera światło, zarówno jego rodzaj jak i określony cykl zmian oświetlenia w połączeniu z jednoczesnymi zmianami temperatury (35). Niekiedy kiełkowanie tego typu nasion można przyspieszyć przez podziaływanie na nie takimi substancjami jak tiomocznik, kinetyna, giberelina, etylen, lub przez całkowite usunięcie otoczek nasiennych. Stan uśpienia pierwotnego w wielu przypadkach uwarunkowany jest przez występowanie endogennych inhibitorów, lub przez brak stymulatorów.

Z drugiej strony nasiona zdolne do kiełkowania przy sprzyjających warunkach mogą zdolność tę utracić w wyniku zadziałania czynników fizykochemicznych, przechodząc w stan uśpienia wtórnego.

Jeżeli rozpatrywanie czynników wpływających na kiełkowanie ograniczyć tylko do określonych substancji chemicznych, to można je podzielić na stymulatory i inhibitory (44, 155). Inhibitorem kiełkowania określa się substancję zapobiegającą kiełkowaniu w warunkach, przy których bez jej udziału nasienie kiełkuje. Jest oczywiste, że kiełkowanie nasion hamować będą wszystkie substancje hamujące normalny tok przemiany materii, takie jak cyjanki, DNP, kwas jodooctowy itp; ich działanie, z punktu widzenia fizjologii kiełkowania, jest niespecyficzne.

Wewnątrz klasy inhibitorów wyróżnić należy grupę substancji indukujących stan uśpienia wtórnego: są to związki chemiczne, wobec których nasienie nie kiełkuje, lecz ich niekorzystne działanie może być odwrócone lub przynajmniej znacznie obniżone przez któryś z czynników, przerywających stan uśpienia pierwotnego (por. 106).

Według Evenariego (34) właściwe kiełkowanie kończy się z chwilą zakończenia pierwszej mitozy. W związku z tym tylko substancje działające na trzy pierwsze fazy są rzeczywistymi regulatorami kiełkowania; substancje działające na fazę czwartą są, w ścisłym znaczeniu słowa, regulatorami wzrostu. Za specyficzny inhibitor kiełkowania można uznać tylko taką substancję, która albo

I. hamuje przebieg procesu specyficznego dla kiełkowania; albo

II. interferuje z jednym ze specyficznych stymulatorów kiełkowania; albo też

III. taką, której występowanie w naturze ograniczone jest wyłącznie do nasion, owoców, strąków itp.

Jeżeli dana substancja hamuje ten sam proces przy kiełkowaniu co i przy wzroście, to powinna być ona rozpatrywana tylko jako inhibitor wzrostu.

Kumaryna od z górą pół wieku (26, 139, 140) uważana jest za jeden z najbardziej aktywnych inhibitorów kiełkowania (por. 32). Na jej działanie wrażliwe są nasiona zarówno roślin jednoliściennych jak i dwuliściennych: np. sałaty (117), cykorii (41), pszenicy (102), jęczmienia (79, 80) i innych (por. 6, 63). Zwraca uwagę, że kumaryna w niskich stężeniach przyspiesza kiełkowanie nasion jęczmienia (58, 81), ryżu (110), włośnicy (*Setaria italica* L., 47), *Lepidium virginicum* (151), jak również przyspiesza kiełkowanie spor *Puccinia graminis* (147) i *Rhizopus nigricans* (56). We wszystkich wymienionych przypadkach kumaryna silnie hamuje wzrost już przy stężeniach, przy których jeszcze nie wpływa, lub wpływa nieznacznie na kiełkowanie; przy stężeniach bardzo niskich może występować pobudzenie wzrostu siewek. Nasuwa się więc pytanie, czy kumaryna jest specyficznym inhibitorem kiełkowania?

Aby zagadnienie to rozstrzygnąć należy stwierdzić,

I. która faza kiełkowania pozostaje pod jej kontrolą;

II. jaki jest mechanizm jej działania; i

III. jakie współzależności zachodzą pomiędzy kumaryną i pozostałymi czynnikami fizykochemicznymi, regulującymi kiełkowanie.

Niżej przytoczone rozważania, zmierzające do uzyskania odpowiedzi na postawione pytania, dotyczyć będą w głównej mierze nasion sałaty, bowiem jest to obiekt dotychczas stosunkowo najlepiej poznany.

Wpływ kumaryny na pobieranie wody przez kiełkujące nasiona

W roku 1960 Blaim, badając pobieranie wody przez całe ziarna pszenicy i mniej lub bardziej oddzielone od endospermu zarodki, doszedł do wniosku, że kumaryna hamuje kiełkowanie nasion dzięki zahamowaniu pobierania wody (13, 14). Lahiri i Kharabanda (76) również stwierdzili, że kumaryna nie wpływa na pobieranie wody przez endosperm, lecz poważnie hamuje pobieranie wody przez zarodki.

Zagadnienie to było wcześniej badane przez Ishikawę (47), który zaobserwował, że kumaryna w stężeniu całkowicie blokującym kiełkowanie (1000 p.p.m.) nie zaburza pobierania wody przez nasiona *Setaria italica* w ciągu początkowych 24 godzin doświadczenia.

Ponieważ efektywne stężenia kumaryny w wymienionych na wstępie doświadczeniach były stosunkowo duże, wobec tego wydaje się, że wy-

sunięte przypuszczenie (13, 14, 76) nie jest słuszne. Kumaryna hamuje pobieranie wody, lecz efekt ten prawdopodobnie nie jest przyczyną lecz skutkiem zahamowania późniejszych faz kiełkowania, zwłaszcza fazy aktywacji. Stwierdzono bowiem, na przykład, że w nasieniu już od pierwszych minut pęcznienia wzbudza się synteza kwasu ribonukleinowego i białka (89, 154) — te ostatnie doświadczenia wykazują zarazem, jak bardzo umowne i sztuczne jest wyróżnianie odrębnych faz pęcznienia i aktywacji.

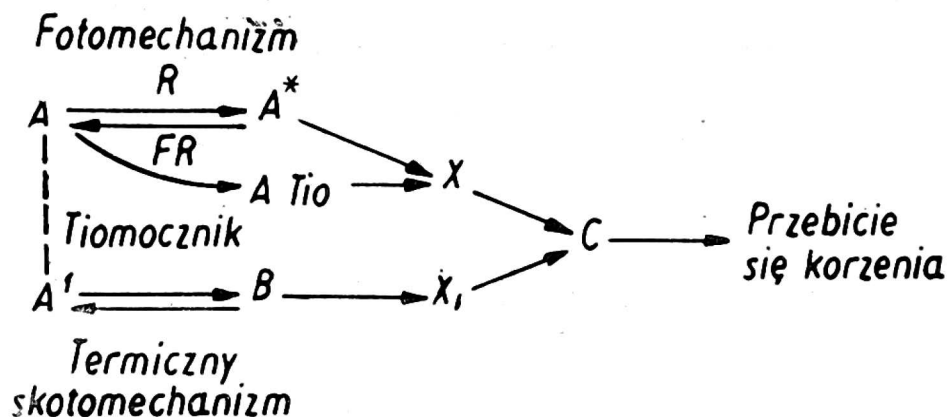
Wpływ temperatury i światła na fizjologiczną aktywność kumaryny

W roku 1949 Nutile sygnalizował, że kumaryna wzbudza stan uspiania nasion sałaty, przy czym jej działanie może być zniesione częściowo przez tiomocznik, światło i azotan potasowy (117).

Nasiona szeregu gatunków roślin wrażliwe są na działanie światła (31, 33, 35, 72, 152), przy czym na szczególną uwagę zasługuje działanie światła czerwonego (R) i dalekiej czerwieni (FR); nasiona wrażliwe na R i FR Evenari zaproponował nazywać nasionami fotoblastycznymi. Światło czerwone o długości fali 6500—6600 Å pobudza kiełkowanie, natomiast daleka czerwień o dł. fali 7200 Å wywiera działanie hamujące (18, 20). Fotomechanizm uwarunkowany jest występowaniem specyficznego białka, zwanego fitochromem (25), które — w zależności od rodzaju oświetlenia — występuje w 2 konfiguracjach (17). Biochemiczne zmiany, indukowane przez światło czerwone, mogą być również osiągnięte na innej drodze: w przypadku niektórych nasion fotoblastycznych (np. sałata, *Lactuca sativa* L. odm. „Grand Rapids”) zamiast światła czerwonego można stosować tiomocznik (33) i kinetynę (109). Nadmienić wszakże należy, że substancje te nie zastępują światła czerwonego, gdyż nie we wszystkich przypadkach pobudzają kiełkowanie nasion fotoblastycznych, przetrzymywanych w ciemności. Co się tyczy kinetyny — stwierdzono, że działa ona uczulająco na nasiona, tzn. minimalna dawka światła wystarcza do pobudzenia kiełkowania (por. 106).

Oprócz fotomechanizmu w nasionach sałaty czynny jest również niezależny od światła skotomechanizm, który ze swej strony uzależniony jest od temperatury. Dzięki skotomechanizmowi część nasion sałaty danej populacji skiełkuje w ciemności bez uprzedniego potraktowania tiomocznikiem lub R; kiełkowanie tej części nasion nie jest hamowane przez FR (rys. 1).

Światło czerwone częściowo znosi zahamowanie kiełkowania nasion sałaty, wywołane przez kumarynę i 2.4-D, nie niweluje natomiast toksycznego działania 2.4-dwunitrofenolu. Kumaryna działa więc na fotomechanizm (34, 35); działa ona również na skotomechanizm, bowiem w odpowiednim stężeniu całkowicie hamuje kiełkowanie w ciemności.



Rys. 1. Schematyczne przedstawienie mechanizmów, kontrolujących kiełkowanie nasion sałaty (34). A, A¹; A*, ATio, B; X, X₁; C — poszczególne etapy procesu kiełkowania

W tym ostatnim przypadku aktywność kumaryny zależna jest od temperatury. Jest regułą, że fizjologiczna efektywność kumaryny jest tym słabsza im niższa jest temperatura otoczenia; jej hamujące działanie gwałtownie wzmacnia się po przekroczeniu 26° C. I tak, na przykład, z nasion sałaty potraktowanych roztworem kumaryny o stężeniu 80 p.p.m. przy temp. 26° C na świetle kiełkuje 93.4% a w ciemności 73.4%, podczas gdy przy temperaturze 29° C kiełkowanie zostaje całkowicie zablokowane (34).

Tak więc wyższe temperatury i kumaryna działają synergistycznie inhibitorowo na proces kiełkowania nasion sałaty, bowiem siła kiełkowania tych ostatnich również obniża się po przekroczeniu 30° C. (Odwrotną zależność obserwuje się w przypadku wzrostu korzeni pszenicy, które przy temp. 30° C są około 1000 razy mniej czułe na działanie kumaryny niż przy temp. 10° C (22, 25). Szczegółowe badania wykazały, że skotomechanizm jest bardziej wrażliwy w stosunku do kumaryny niż fotomechanizm — i wtedy światło czerwone nie wywiera działania odwracającego, a na skotomechanizm kumaryna działa już w stężeniach 10—20 razy niższych.

Pod wpływem kumaryny nefotoblastyczne nasiona sałaty odm. „Progress” stają się fotoblastyczne. Z drugiej strony, naturalnie fotoblastyczne odmiany (np. „Grand Rapids”) są bardziej wrażliwe na działanie kumaryny. Należy jednak nadmienić, że nasiona odm. „Grand Rapids” stają się nefotoblastyczne po zdjęciu łupiny nasiennej; równocześnie zmniejsza się ich wrażliwość na działanie kumaryny.

W sumie: kumaryna wpływa zarówno na foto- jak i na skotomechanizm, przy czym jej aktywność jako inhibitora wzmacnia się wraz ze wzrostem temperatury. Fakty te jednak nie wyjaśniają zagadnienia mechanizmu działania kumaryny. W dodatku fotomechanizm nie jest ograniczony tylko do nasion, gdyż światło czerwone i daleka czerwień wpły-

wają na wzrost siewek, morfogenezę, kwitnienie itp. (18, 113, 114, 139a). Pewne jest w każdym razie, że kumarynę — w myśl przytoczonej na wstępie definicji — należy uważać za substancję indukującą stan uśpienia wtórnego, bowiem skutki jej działania są niwelowane przez światło i tiomocznik.

Współdziałanie kumaryny z regulatorami i substancjami czynnymi przy kiełkowaniu

Tiomocznik przyspiesza kiełkowanie nasion fotoblastycznych (93, 117, 149, 150) działając jako czynnik zastępujący światło czerwone (130, 131); odwrotnie działa kumaryna, która przedłuża stan uśpienia i powoduje, że nefotoblastyczne odmiany stają się fotoblastycznymi. Tiomocznik działa więc antagonistycznie w stosunku do kumaryny (47, 79, 80, 98, 120, 130). Co więcej, tiomocznik wobec kumaryny wywiera działanie pobudzające w stężeniach niższych niż to się dzieje normalnie (131).

Tiomocznik odwraca również hamujące działanie 2.4-D na kiełkowanie nasion sałaty. Jednakże pierwszorzędowe mechanizmy działania 2.4-D i kumaryny muszą być różne bo:

I. 2.4-D nie wzbudza fotoblastyczności nasion;

II. niwelujące działanie tiomocznika zaznacza się silniej w przypadku 2.4-D niż kumaryny; i

III. cystyna i arginina przeciwdziałają, a kwas glutaminowy i asparagina oraz cysteina wzmagają toksyczne działanie 2.4-D, nie wpływając istotnie na aktywność kumaryny (34, 101).

Różnice mechanizmów działania obu regulatorów stają się jeszcze bardziej oczywiste w świetle faktu, iż glukoza i sacharoza w pewnej mierze odwracają hamujące działanie kumaryny (11) wzmagając także działanie 2.4-D (84). Kwas askorbinowy wzmacnia inhibitorową czynność obu omawianych substancji.

Większość z przebadanych aminokwasów nie wywiera wpływu na aktywność kumaryny (34). Jedynie β -alanina niweluje, a cysteina wzmacnia jej aktywność jako inhibitora kiełkowania nasion pszenicy i sałaty (101). W przypadku nasion *Lepidium sativum* cysteina nieznacznie odwraca działanie kumaryny (88). BAL (dwumerkaptopropanol) nie wpływa istotnie na aktywność kumaryny w przypadku kiełkujących nasion *Setaria italica* (47). Również glutation i pantotenian wapnia nie odwracają hamującego działania tej substancji na kiełkowanie nasion rzodkwi (11). Glukozo-1-fosforan obniża inhibitorową aktywność kumaryny w przypadku nasion sałaty (por 104).

Kwas giberelinowy (GA), działający jako stymulator kiełkowania nasion sałaty (46, 49, 50) i pod względem fizjologicznym zastępujący światło czerwone, odwraca hamujące działanie kumaryny (96) lecz efektywne

stężenia GA w tym przypadku są stosunkowo bardzo wysokie, rzędu 10^{-4} M. Spostrzeżenie to zostało następnie potwierdzone i rozszerzone na uśpione pąki brzoskwini przez Phillipsa (121), który udowodnił równocześnie, że identycznie jak kumaryna działa naringenina — inhibitor wyizolowany z uśpionych pąków brzoskwini (45), odpowiedzialny za ich stan spoczynkowy.

Doświadczenia przeprowadzone z nasionami jarmużu niskiego zielonego kędzierzawego (*Brassica oleracea* L. var. *acephala*) wykazały, że GA w stężeniach 10^{-5} — 10^{-4} M początkowo nie zmniejsza hamującego działania kumaryny na kiełkowanie; dopiero po 4—5 dniach hodowli obserwuje się nieznaczne działanie dodatnie (65, 67, 69).

Kwas indolilo-3-octowy (IAA), tym silniej przyspieszający kiełkowanie nasion sałaty im głębszy jest ich stan uśpienia i im niższa temperatura otoczenia, nie odwraca hamującego działania kumaryny (127). IAA w stężeniach wyższych niż 10 p.p.m. i kumaryna już w stężeniu 1 p.p.m. hamują rozwijanie się pąków etiolowanych siewek *Pisum sativum*. Najbardziej interesujące jest jednak, że inhibitorowa aktywność IAA wzrasta około 100-krotnie jeżeli zastosować go w mieszaninie z roztworami kumaryny o stężeniach 0.01—0.1 p.p.m. (86). Meinel i Guttenberg (108) również stwierdzili, że kumaryna hamuje wzrost pąków *Phaseolus multiflorus*, lecz w tym przypadku IAA w stężeniach 0.1—1.0 p.p.m. odwraca skutki działania tej substancji. Ponieważ w tych 2 pracach uzyskano wyniki sprzeczne, więc zagadnienie domaga się dalszej analizy (por. 4).

IAA albo nie zmniejsza albo wzmacnia hamujące działanie kumaryny na kiełkowanie nasion jarmużu (65, 66) i kapusty czerwonej „Kissendrup”.

Chromatograficzne analizy składu i ilości naturalnych inhibitorów i stymulatorów w nasionach sałaty poddanych działaniu wody, tiomocznika i kumaryny wykazały, że inhibitory — występujące w suchym nasieniu — w przeciągu początkowych 12 godzin kiełkowania rozpadają się, częściowo pojawiają się inne inhibitory, a przede wszystkim wzrasta poziom stymulatorów (15, 16). Tiomocznik przyspiesza pojawianie się stymulatorów, a w nasieniu inkubowanym w roztworach kumaryny poziom inhibitorów zwiększa się. Wydaje się więc, że kumaryna być może hamuje kiełkowanie nasion m. in. dlatego, że

- I. zapobiega rozpadowi inhibitorów już obecnych w nasieniu;
- II. hamuje syntezę stymulatorów; i
- III. prawdopodobnie sama w nasieniu przemieniana zostaje na pochodne o właściwościach inhibitorów.

To ostatnie przypuszczenie należy przyjmować bardzo ostrożnie, gdyż stwierdzono, że jakakolwiek zmiana w strukturze cząsteczki kumaryny prowadzi do poważnego obniżenia jej aktywności biologicznej (104, 106).

Kinetyna w połączeniu ze światłem czerwonym odwraca hamujące działanie kumaryny na kiełkowanie nasion sałaty odm. „Grand Rapids” (52); efektu takiego nie zanotowano w doświadczeniach przeprowadzanych w ciemności. Natomiast Knypl stwierdził, że kinetyna silnie obniża lub całkowicie odwraca działanie kumaryny na kiełkowanie nasion jarmużu, kapusty czerwonej odm. „Kissendrup”, kalafiora odm. „Erfurcki” i innych (65—69).

Według Khana i Tolberta jeden z retardantów wzrostu — chlorek (2-chloroetylo)trójmetyloamoniowy (CCC) w połączeniu ze światłem czerwonym odwraca skutki hamującego działania kumaryny lub IAA na kiełkowanie nasion sałaty odm. „Grand Rapids”, oraz na wzrost korzeni młodych siewek. Zgoła odmiennie reagują nasiona jarmużu — tutaj CCC wzmacnia inhibitorowe działanie kumaryny (65, 69), przy czym ten synergistyczny inhibitorowy efekt obniża zarówno GA jak i kinetyna. Przypuszcza się, że w omawianym przypadku działanie kinetyny jest ograniczone do fazy aktywacji, bowiem substancja ta w stężeniach obniżających biologiczną aktywność zarówno CCC jak i kumaryny, silnie hamuje wzrost siewek (65). Dwa inne retardanty wzrostu — Phosfon D i B995, również wzmacniają efektywność kumaryny jako inhibitora kiełkowania nasion jarmużu, przy czym w obu przypadkach kinetyna wywiera silne działanie odwracające. Kwas giberelinowy jest stosunkowo słabo aktywny jako czynnik zmniejszający synergistyczne inhibitorowe działanie kumaryny zastosowanej w mieszaninie z Phosfonem D. Warto nadmienić, że wraz ze wzrostem stężenia B995 liczba skiełkowanych nasion poddanych działaniu 100 p.p.m. kumaryny początkowo maleje, osiągając wartość minimalną w zakresie 10^{-3} — 5×10^{-3} M B995, a następnie przy zwiększeniu stężenia B995 rośnie pomimo, iż w stężeniach wyższych niż 5×10^{-3} M B995 sam jako taki hamuje kiełkowanie; występuje tu więc trudne do wytłumaczenia paradoksalne działanie omawianego retardantu (66, por. 70).

W celu wyjaśnienia synergistycznego inhibitorowego działania retardantów wzrostu i kumaryny na kiełkowanie nasion jarmużu wysunięto przypuszczenie, że substancje te blokują alternatywne procesy fazy aktywacji; procesy te są przyspieszane przez kinetynę — są one niezbędne dla wczesnych faz wzrostu, kontrolowanych przez układ giberelinowy (por. rys. 12 w pracy 65).

Wpływ kumaryny na oddychanie nasion

Ishikawa (48) badając wpływ kumaryny na oddychanie nasion włośnicy i grochu stwierdził, że w ciągu początkowych 24 godz. doświadczenia substancja ta w stężeniach całkowicie hamujących kiełkowanie

(1000 p.p.m.) nie wywiera wpływu na oddychanie. Jednakże przy stężeniu 100 p.p.m., również hamującym kiełkowanie, kumaryna pobudza oddychanie nasion grochu o około 20%. Podobny efekt wywiera DNP w zakresie stężeń 10^{-6} — 10^{-4} M.

Ponieważ dwunitrofenol rozkojarza proces oksydacyjnej fosforylacji (9) wobec tego można by przypuszczać, że kumaryna działa podobnie. Jednak w syntezie ATP biorą udział enzymy posiadające grupy —SH jako centra aktywne, a BAL — ochraniający grupy —SH, nie znosi hamującego wpływu kumaryny na kiełkowanie; wydaje się więc, że mechanizm jej działania jest bardziej skomplikowany i nie da się wtłoczyć w ramy prostego założenia, iż kumaryna rozkojarza oksydacyjną fosforylację w taki sam sposób jak DNP.

W przeciwieństwie do powyższych danych (48) kumaryna tylko nieznacznie wpływa na oddychanie nasion sałaty (34, 55, 83) — współczynnik oddechowy serii nasion potraktowanych kumaryną jest z reguły o kilka procent niższy od Q_{O_2} serii kontrolnych; DNP w początkowych kilkunastu godzinach doświadczenia silnie przyspiesza oddychanie. Jednakże w obu przypadkach wyniki ilościowe zależą od rodzaju nasion. Stwierdzono, że Q_{O_2} nefotoblastycznej odmiany „Progress” jest wyższy od Q_{O_2} fotoblastycznej odmiany „Grand Rapids”. Intensywność pobierania tlenu przez nasiona odm. „Grand Rapids” wzrasta się po naświetleniu ich przez kilka sekund światłem czerwonym (R), i wówczas współczynniki oddechowate obu odmian są prawie równe. R nieznacznie przyspiesza oddychanie nasion nefotoblastycznych; nieznacznie wpływa ono również na oddychanie nasion odm. „Grand Rapids” pozbawionych łupiny, które dzięki temu zabiegowi stają się nefotoblastyczne, z jednoczesnym wzrostem wartości Q_{O_2} do wartości charakterystycznych dla odmiany „Progress”.

Jeżeli za miarę wrażliwości na działanie kumaryny przyjąć kiełkowanie, to nefotoblastyczne odmiany sałaty są mniej wrażliwe niż odmiany fotoblastyczne. Z drugiej strony kumaryna słabo wpływa na oddychanie nasion odmiany „Grand Rapids”, lecz dość poważnie obniża Q_{O_2} odmiany „Progress” i pozbawionych łupiny nasion „Grand Rapids”. DNP wzrasta pobieranie tlenu we wszystkich wymienionych przypadkach. Światło czerwone natychmiast, i to w znacznym stopniu, podwyższa współczynnik oddechowy nasion „Grand Rapids” potraktowanych zarówno kumaryną jak i DNP, mimo iż nie znosi zahamowania kiełkowania indukowanego przez obie substancje.

Pierwszorzędowy mechanizm działania R (a raczej fitochromu) zasadniczo nie jest znany. Wiadomo tylko, że znosi ono jedną z barier ograniczających oddychanie, czyli syntezę ATP, a tym samym ogranicza-

jących również kiełkowanie. Z przedstawionych faktów można wnioskować, że reakcje kontrolowane przez kumarynę (i DNP) leżą poza zasięgiem reakcji wzbudzanych przez R. Ponieważ jednak R częściowo zmniejsza inhibitowaną aktywność kumaryny, zwłaszcza w przypadku nasion odmian nefotoblastycznych, wobec tego można przypuszczać, że substancja ta nie blokując rozwijania się i czynności R-katalizowanych reakcji, blokuje ich fizjologiczne wykorzystanie.

Kumaryna wpływa więc na oddychanie nasion; nagromadzone fakty nie dają jednak odpowiedzi na pytanie, czy owe zmiany są pierwotne czy wtórne, i czy są one przyczyną czy też konsekwencją zahamowania kiełkowania.

Wpływ kumaryny na metabolizm kiełkujących nasion

Zagadnienie to szczególnie dokładnie badano na przykładzie nasion sałaty (34, 98, 99, 100, 104, 106). Jak widać z danych przedstawionych w tabeli 1, aktywność szeregu podstawowych układów enzymatycznych w nasieniu potraktowanym kumaryną pozostaje na poziomie aktywności w nasieniu suchym. Ponieważ *in vitro* kumaryna nie wpływa na aktywność tych enzymów to można wnioskować, że obserwowane zmiany nie są przyczyną lecz skutkiem zahamowania kiełkowania. Do wyjątków należy lipaza i proteinaza. Spośród 2 lipaz występujących w nasionach sałaty kumaryna *in vitro* unieczynnia lipazę kwaśną (135). Fakt ten nie tłumaczy aktywności kumaryny jako inhibitora kiełkowania, gdyż lipidy, stanowiące główny materiał zapasowy nasion sałaty, nie są uruchamiane w okresie kiełkowania (rys. 2).

In vitro kumaryna hamuje również aktywność proteinazy (124). Bliższe analizy wykazały, że w przypadku sałaty występują co najmniej dwie proteinazy: pierwsza, zarodkowa, jest enzymem czysto hydrolitycznym; proteinaza druga, wzrostowa, pełni funkcje syntetyczne. *In vitro* kumaryna hamuje aktywność pierwszej lecz nie wpływa na aktywność drugiej; jednakże *in vivo* substancja ta nieznacznie pobudza czynność proteinazy pierwszej i hamuje aktywność drugiej. Tak więc mechanizm działania kumaryny jako inhibitora kiełkowania pozostaje w dalszym ciągu nie objaśniony. Zagadnienia tego nie wyjaśnia również fakt, że *in vivo* substancja ta, proporcjonalnie do zahamowania kiełkowania, hamuje wzrost aktywności amylolitycznej w nasionach pszenicy (124) — prawdopodobnie dzięki zahamowaniu pojawiania się α -amylazy, nie występującej w nasieniu suchym — ponieważ na α -amylazę kumaryna nie działa *in vitro*. Fakt ten jednak może dowodzić, oczywiście pośrednio, że kumaryna przeciwdziała akcji giberelin, gdyż stwierdzono, że GA wzbudza syntezę tego enzymu w endospermie jęczmienia (154).

Tabela 1

Wpływ kumaryny na metabolizm i aktywność enzymatyczną w kiełkujących nasionach i siewkach sałaty, w porównaniu do kontroli hodowanej na wodzie¹

Metabolit lub enzym	Działanie <i>in vivo</i> ²	Działanie <i>in vitro</i> ³	Literatura
Zużywanie sacharozy	Nie zmienione w ciągu początkowych 24 godz., a następnie prawie całkowicie zahamowane		122
Nagromadzanie glukozy	Całkowicie zahamowane		122
Zużywanie tłuszczów	Rozpad tłuszczów całkowicie zahamowany		122, 129
Uwalnianie wolnych kwasów tłuszczowych	Zahamowane w ciągu początkowych 48 godz., lecz pobudzone w ciągu następnych 24 godz.		129
Lotne kwasy tłuszczowe	Wzrost ilości w ciągu początkowych 48 godz., a następnie obniżenie		129
Rozpad fityny	Zahamowany		95
Proteinaza	Aktywność pozostaje na poziomie aktywności w nasieniu suchym	Zablokowanie aktywności enzymu otrzymanego z napęczniałych nasion i młodych siewek	124
Lipaza (obojętna)	Aktywność pozostaje na poziomie aktywności w nasieniu suchym	Silne zahamowanie	135
Lipaza (kwaśna)	Aktywność pozostaje na poziomie aktywności w nasieniu suchym	Bez wpływu	135
Fitaza	Silne zahamowanie	Słabe zahamowanie	95
Fenolaza	Zahamowanie aktywności	Nieznaczne pobudzenie	97, 103
Katalaza	Bez zmian	Bez zmian	123
Peroksydaza	Brak bezpośredniego wpływu. Aktywność enzymu skorelowana jest z procesem kiełkowania; jeżeli kiełkowanie jest zahamowane, to nie obserwuje się wzrostu aktywności peroksydazy	Bez wpływu	125

Tabela 1 (ciąg dalszy)

Metabolit lub enzym	Działanie <i>in vivo</i> ²	Działanie <i>in vitro</i> ²	Literatura
Dehydrogenazy	Kumaryna zapobiega wzrostowi aktywności, postępującemu za kiełkowaniem	Brak wpływu	107
Oksydaza NADH ₂	Brak wpływu	Brak wpływu	97
Pobieranie tlenu przez całe nasiona	Początkowo nieznaczne pobudzenie a następnie zahamowanie		83
Pobieranie tlenu przez mitochondria	Zahamowanie proporcjonalne do zahamowania kiełkowania	Stymulacja pobierania tlenu o 20%	126
Oksydaza kwasu askorbinowego	Bez wpływu	Bez wpływu	94
Oksydaza kwasu askorbinowego	Późniejsze badania wykazały, że enzym ten nie występuje w kiełkujących nasionach sałaty		141, 99, 100
Metabolizm kwasów nukleinowych	Brak bezpośredniego wpływu		105
Fosforylacja oksydacyjna		Rozkojarzona	153

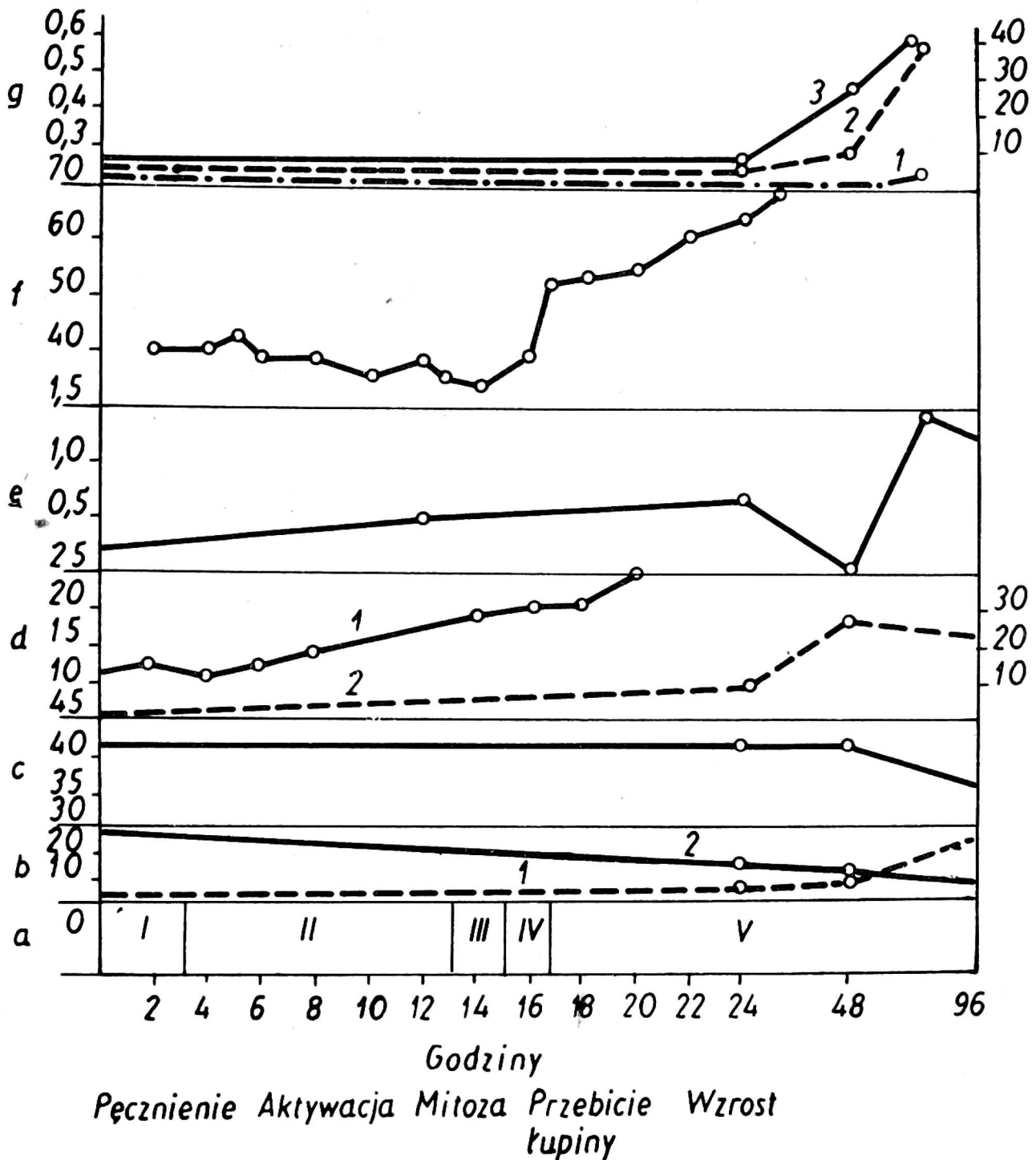
¹⁾ Wg. 104; z uzupełnieniami.

²⁾ Nasiona kiełkowano w roztworach kumaryny.

³⁾ Kumarynę dodawano do mieszaniny reakcyjnej zawierającej badane enzymy otrzymane z materiału hodowanego na wodzie destylowanej.

Donoszono (90), że kumaryna *in vitro* hamuje aktywność dehydrogenazy glukozo-6-fosforanu oraz 2—3-krotnie stymuluje aktywność dehydrogenazy kwasu cytrynowego w nasionach kukurydzy (75). Doniesienia te domagają się weryfikacji, albowiem później stwierdzono, że kumaryna *in vitro* nie wpływa na aktywność dehydrogenaz nasion sałaty (107).

Początkowo sądzono, że kumaryna nie wpływa na aktywność oksydazy kwasu askorbinowego (94); później wykazano jednak, że enzym ten nie występuje w nasionach sałaty (99, 100, 141). Kwas askorbinowy jest w nich utleniany przez fenolazę rozpuszczalną — wykazującą aktywność katecholazy i krezolazy (100) — na drodze oksydacji sprzężonej (141). *In vitro* kumaryna nieznacznie hamuje aktywność tej fenolazy wówczas, gdy substratem reakcji jest DOPA (dwuhydroksyfenyloalanina), a wzmacnia jej katalityczne właściwości przy utlenianiu p-krezolu.



Rys. 2. Główne zmiany fizjologiczne w nasionach sałaty odmiany „Grand Rapids” kiełkujących w wodzie przy temp. 26° C po naświetleniu światłem czerwonym (R; 34): a — Fazy kiełkowania (I—V) i czas ich trwania (godziny). b — Zawartość glukozy (1) i sacharozy (2) w mg/g suchej masy nasion. c — Zawartość tłuszczów (procenty suchej masy). d — Aktywność katalazy (1) w ml O₂/50 mg nasion/60 sek. (skala lewa) oraz aktywność peroksydazy (2) w mg purpurogalliny/g suchej masy nasion (skala prawa). e — Aktywność proteolityczna (ml 0.1 N NaOH). f — Q_{o2} (mg O₂/100 mg nasion suchych). g — Zawartość glutationu (1) i asparaginy (2) wyrażona jako gęstość optyczna chromatogramów (skala prawa) oraz zawartość azotu rozpuszczalnego (3) w procentach suchej masy (skala lewa)

Nadmienić należy, że w nasionach grochu kiełkujących w roztworach kumaryny czynne są wszystkie enzymy cyklu glikolizy (99).

W suchym nasieniu sałaty połowa ogólnej ilości fosforu występuje w postaci fityny, ulegającej rozpadowi już od pierwszych godzin kiełkowania i całkowicie zużywanej w przeciągu trzech dni (95). Kumaryna *in vivo* hamuje aktywność fitazy, a tym samym zapobiega hydrolizie fityny. Jest oczywiste, że takie zablokowanie prowadzi bezpośrednio do zaburzenia przemiany związków fosforowych, a dalej azotowych, cukrowych i oddychania. Wydaje się jednak, że obserwowane *in vivo* zmiany są wtórne, bowiem *in vitro* kumaryna nieznacznie hamuje aktywność fitazy (95).

Stwierdzono, że w nasieniu moczonym w roztworach kumaryny nie rozpada się ATP zarodkowy i nie syntetyzuje się 1,6-dwufosfofruktoza (104). I znów wydaje się, że są to następstwa opóźnionego kiełkowania gdyż udowodniono na przykład, że kumaryna nie wpływa na aktywność enzymów przenoszących fosforan na ADP, ani nie zmienia aktywności enzymów cyklu glikolizy, w związku z czym fosforylacja glikolityczna w wolnych od mitochondriów ekstraktach z nasion kontrolnych i kiełkowanych w roztworach kumaryny przebiega podobnie. Fakt ten niewiele mówi o mechanizmie inhibitorowego działania kumaryny, bowiem w kiełkującym nasieniu sałaty ATP syntetyzowany jest początkowo na drodze utleniania glukozo-6-fosforanu prawdopodobnie wyłącznie w cyklu pentozowym z następnym przeniesieniem elektronów poprzez kwas askorbinowy i fenole w reakcji sprzężonej, z udziałem fenolazy jako przenośnika tlenu lub z bezpośrednim udziałem NADH₂ oksydazy (97). Dopiero w późniejszych stadiach kiełkowania uruchamiany zostaje cykl kwasów trójkarboksylowych, glikoliza i system cytochromowy przenoszący elektrony (128, 99). Z faktu, że kumaryna przyspiesza do 20% pobieranie tlenu przez izolowane mitochondria (126) i hamuje pobieranie przez nie fosforu nieorganicznego (153) można wnioskować, że pod jej kontrolą być może bezpośrednio znajduje się proces oksydacyjnej fosforylacji (por. 59, 143). Tłumaczyłoby to hamujące działanie kumaryny na wzrost, ale w żadnym wypadku nie tłumaczy inhibitorowej czynności kumaryny przy kiełkowaniu.

Wpływ kumaryny na podziały komórkowe

Faza pierwszej mitozy jest trzecią, zasadniczo specyficzną fazą kiełkowania. W związku z tym szczególnego znaczenia nabierają doniesienia o hamującym działaniu kumaryny na podziały komórkowe. Cornman (29, 30) stwierdził, że kumaryna zastosowana w dużych stężeniach hamuje mitozy w korzeniach cebuli (*Allium cepa* L.) i lilii (*Lillium longiflorum* L.), a w niskich stężeniach pobudza podziały komórkowe w siewkach buraka (156). Kumaryna zwalnia podziały komórkowe w strefie wzrostu korzeni *Phleum pratense* L. (7), uszkodza chromosomy zarówno w spo-

czynkowych jak i w dzielących się komórkach korzeni cebuli (2b) oraz zaburza tworzenie się i funkcjonowanie wrzecion (C-mitozy; por. 118, 119). Zastosowana w dużych stężeniach kumaryna jest inhibitorem preprofazy (2a); dotyczy to również niektórych jej pochodnych (27, 28, 133, 134, 142).

W oparciu o wyżej wymienione fakty można by sądzić, że kumaryna być może hamuje kiełkowanie nasion poprzez zahamowanie pierwszej mitozy. Przypuszczenie to należy jednak odrzucić jako niesłuszne, gdyż na podziały komórkowe kumaryna działa dopiero w stężeniach bardzo wysokich (roztwory bliskie nasycenia). Należy sądzić, że zmiany w aparacie genetycznym pojawiające się po zastosowaniu kumaryny są zmianami wtórnymi. Stwierdzono bowiem, że kumaryna w stężeniu 50 $\mu\text{g/ml}$ nie zmienia istotnie zawartości DNA w kiełkujących nasionach sałaty pomimo, iż wzrost siewek zostaje zahamowany (105). Podobny wynik uzyskano również w przypadku nasion grochu, kiełkowanych w roztworach kumaryny bardziej stężonych niż 100 $\mu\text{g/ml}$; w siewkach potraktowanych bardziej rozcieńczonymi roztworami tej substancji, rzędu 5–100 $\mu\text{g/ml}$, ilość DNA wzrasta pomimo, że wzrost korzonków uległ poważnemu zahamowaniu (42).

Pozostaje więc stwierdzić, że praktycznie nic nie wiadomo o mechanizmie działania kumaryny jako specyficznego inhibitora kiełkowania nasion. Ale czy kumaryna jest rzeczywiście specyficznym inhibitorem kiełkowania?

Czy kumarynę należy uważać za specyficzny inhibitor kiełkowania?

Zebrane niżej dane zdają się świadczyć, że kumaryna nie jest specyficznym inhibitorem kiełkowania, a powinna być rozpatrywana głównie jako regulator wzrostu, gdyż pod jej bezpośrednią kontrolą znajduje się prawdopodobnie proces podstawowy dla wzrostu (czyli syntezy cytoplazmy); jako składowa niespecyficzna proces ten może być i jest czynny przy kiełkowaniu.

I. *In vivo* kumaryna występuje pod postacią nieaktywnego fizjologicznie β -glikozydu kwasu kumarynowego (62, 73). A jeśli nawet występuje jako taka, to w ilościach znikomych, zbyt małych aby wywołać zahamowanie kiełkowania, lecz wystarczających do jego p o b u d z e n i a. Wykrywa się ją w nasionach, lecz w nieporównanie większych ilościach występuje w częściach wegetatywnych, zwłaszcza w młodych liściach i łodygach. W okresie wegetacyjnym poziom kumaryny zarówno w całej roślinie jak i w poszczególnych tkankach podlega określonym fluktuacjom, osiągając maksimum w okresie zakwitania (3) i zawiązywania pąków (146) oraz w okresie wydawania owoców. Fakty te przeczą słuszności dotychczasowego poglądu, iż kumaryna w warunkach naturalnych

czynna jest jako specyficzny inhibitor kiełkowania, a przemawiają na korzyść założenia, iż substancja ta może być jednym z regulatorów wzrostu. Jedyne przypadki, gdzie kumaryna występuje w ilościach wystarczających do zahamowania kiełkowania stanowią nasiona *Trigonella arabica* (82); nie wiadomo jednak, czy w tym przypadku występuje ona w postaci wolnej czy też — co jest bardziej prawdopodobne — pod postacią β -glikozydu kwasu kumarynowego.

II. Libbert (87) stwierdził, że wrażliwość nasion *Lepidium sativum* L. na działanie kumaryny zależy od ich wieku i od pory roku. Najbardziej wrażliwe są nasiona tuż po zbiorze, a następnie ich wrażliwość zmniejsza się odpowiednio do czasu przechowywania. I tak np., kumaryna w stężeniu 10^{-5} g/l tuż po zbiorze hamuje kiełkowanie 90% nasion danej generacji, a po upływie 1,5 roku już tylko 10%; po upływie 4,5 lat od zbioru nasiona znów stają się bardziej czułe. Niezależnie od wieku obserwuje się również cykliczne zmiany wrażliwości w okresie rocznym: maksima inhibicji pojawiają się w jesieni i zimą, zaś minima na wiosnę i latem. Nasiona nie poddane działaniu kumaryny nie wykazują sezonowych fluktuacji podobnego typu, kiełkując z jednakową szybkością niezależnie od pory roku. Na uwagę zasługuje, że nasiona *L. sativum* tuż po zbiorze kiełkują bardzo słabo — znajdują się więc w stosunkowo głębokim stanie uśpienia. Następnie ich zdolność do kiełkowania rośnie, osiągając maksimum po 2 latach przechowywania. Nie można więc nie zauważyć, że na inhibitorowe działanie kumaryny najbardziej wrażliwe są nasiona z natury słabo zdolne do kiełkowania.

Stwierdzono, że ozime odmiany pszenicy są znacznie bardziej wrażliwe na działanie kumaryny niż odmiany jare (74). Fakt ten nabiera właściwej wymowy gdy się zważy, że ozime odmiany pszenicy — w porównaniu do odmian jarych — posiadają znacznie więcej endogennych inhibitorów kiełkowania (111). Inhibitory te, odpowiedzialne w dużej mierze za indukcję stanu uśpienia nasion po zbiorze, zlokalizowane są głównie w łupinie nasiennej; w miarę przechowywania poziom ich obniża się, przy jednoczesnym wzroście zdolności nasion do kiełkowania. Kwas giberelinowy obniża hamujące działanie tych inhibitorów na kiełkowanie nasion pszenicy, lecz nie odwraca takiegoż ich działania na nasiona sałaty.

Fotoblastyczne odmiany sałaty, jak wspomniano poprzednio, są kilkakrotnie bardziej wrażliwe na inhibitorowe działanie kumaryny niż odmiany nefotoblastyczne, zdolne do kiełkowania w ciemności. Fotoblastyczność zanika po zdjęciu łupiny nasiennej, czemu towarzyszy wzrost oporności na działanie kumaryny; pozbawione łupiny nasiona odm. „Grand Rapids” są tak samo odporne na kumarynę jak nasiona odm. „Progress” (34). Dowodzi to, że

1) układ sprawiający iż nasienie wymaga do kiełkowania naświetlenia światłem czerwonym zlokalizowany jest w łupinie; i

2) obecność tego układu determinuje stopień wrażliwości nasion na kumarynę.

Inhibitorowa efektywność kumaryny silnie wzmacnia się wraz ze wzrostem temperatury, zwłaszcza po przekroczeniu 26°C . Przy wyższych temperaturach procent kiełkujących nasion w kontroli ulega również poważnemu obniżeniu: już w roku 1938 Borthwick i Robbins stwierdzili, że nasiona sałaty nie kiełkują przy temperaturze około 30°C ; natomiast zarodek jest zdolny do kiełkowania przy tej temperaturze, pod warunkiem, że wszystkie otoczki nasienne zostały usunięte (19, 152).

Zarówno fotomechanizm jak i wyższe temperatury stanowią bariery ograniczające kiełkowanie. Analizując wyżej przytoczone dane stwierdza się, że kumaryna działa najsilniej na nasiona naturalnie słabo zdolne do kiełkowania; działa więc ona — zewnętrznie rzecz rozpatrując — „synergistycznie” z naturalnymi barierami ograniczającymi kiełkowanie. Jeżeli przyjąć, że termin „bariera” oznacza niemożność zapoczątkowania lub kontynuowania określonego ciągu reakcji biochemicznych, i jeśli założyć, że pod barierami kryją się — w niektórych przynajmniej przypadkach — określone układy inhibitorów, to można przypuszczać, że kumaryna albo 1) hamuje ich rozpad, albo 2) wzmacnia ich syntezę przy jednoczesnym zahamowaniu syntezy stymulatorów.

Słuszność tego przypuszczania bezpośrednio potwierdzają wyniki analiz Blumenthal-Goldschmidta (16), który stwierdził, że w potraktowanych kumaryną nasionach sałaty nie pojawiają się stymulatory kiełkowania, pojawiające się w nasionach moczonych w wodzie lub w roztworach tiomocznika i — w porównaniu do poziomu w nasieniu suchym — wzrasta znacznie poziom inhibitorów. Za słusznością tego przypuszczenia przemawiają również, pośrednio, wyniki doświadczeń Blacka (12), który badając stan naturalnego i wtórnego uśpienia nasion *Avena fatua* L. doszedł do wniosku, że w nasieniu czynne mogą być dwie grupy reakcji: jedna z nich wiedzie do kiełkowania, a druga do syntezy inhibitorów. Przy sprzyjających warunkach pierwsza z dróg przeważa i nasienie kiełkuje; przy warunkach niesprzyjających (wysokie temperatury, daleka czerwień, warunki beztlenowe) uczynnione zostają reakcje wiodące do syntezy i nagromadzania się substancji inhibitorowych, pogłębiających stan uśpienia.

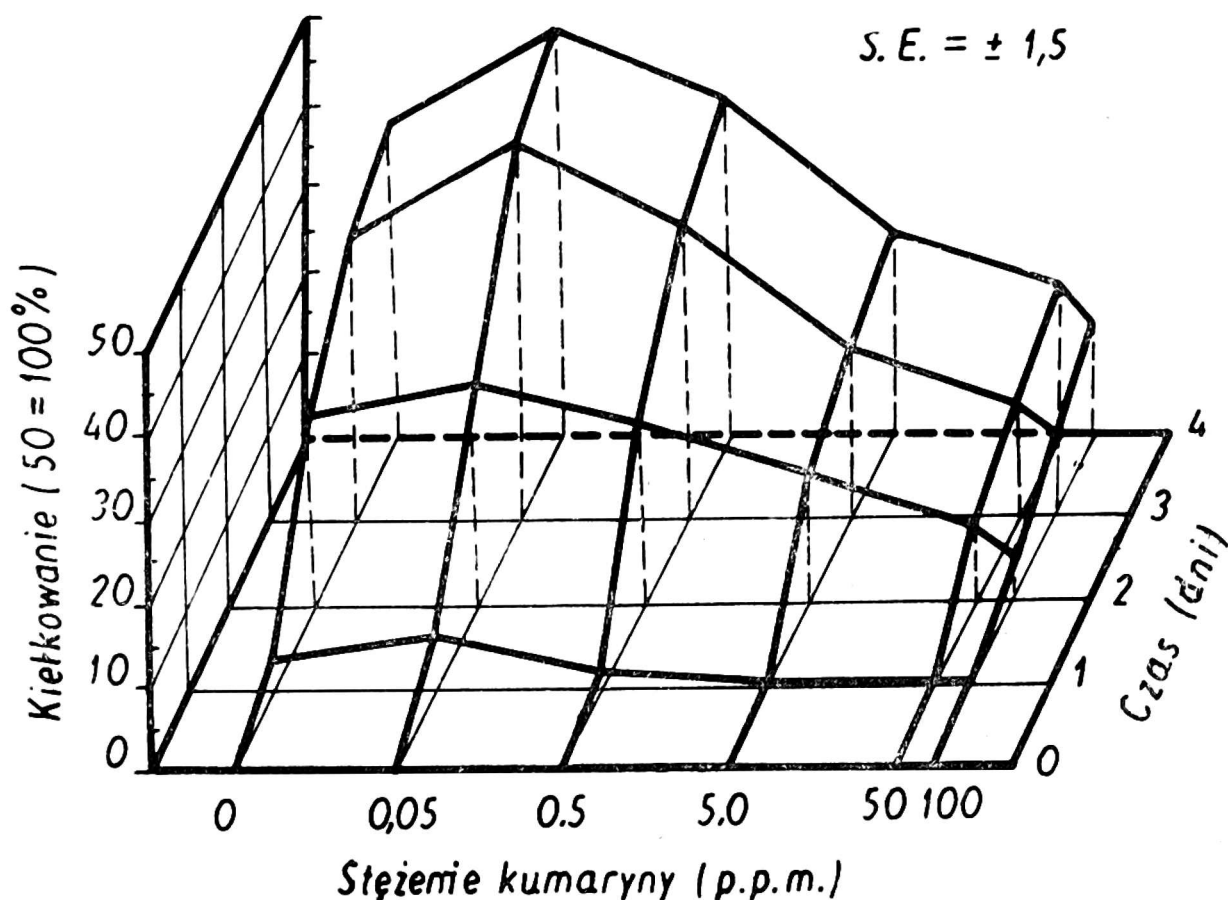
Nasiona różnych gatunków roślin pod względem wrażliwości na inhibitorowe działanie kumaryny można podzielić na 4 grupy, przy czym do każdej z nich należą przedstawiciele różnych rodzin. Jednakże w każdym przypadku można ustalić graniczne stężenie kumaryny, po przekroczeniu którego występuje gwałtowne zahamowanie kiełkowania, w większości

przypadków przemijające wraz z upływem czasu hodowli; w niższych stężeniach kumaryna może działać pobudzająco (por. 57, 58, 63).

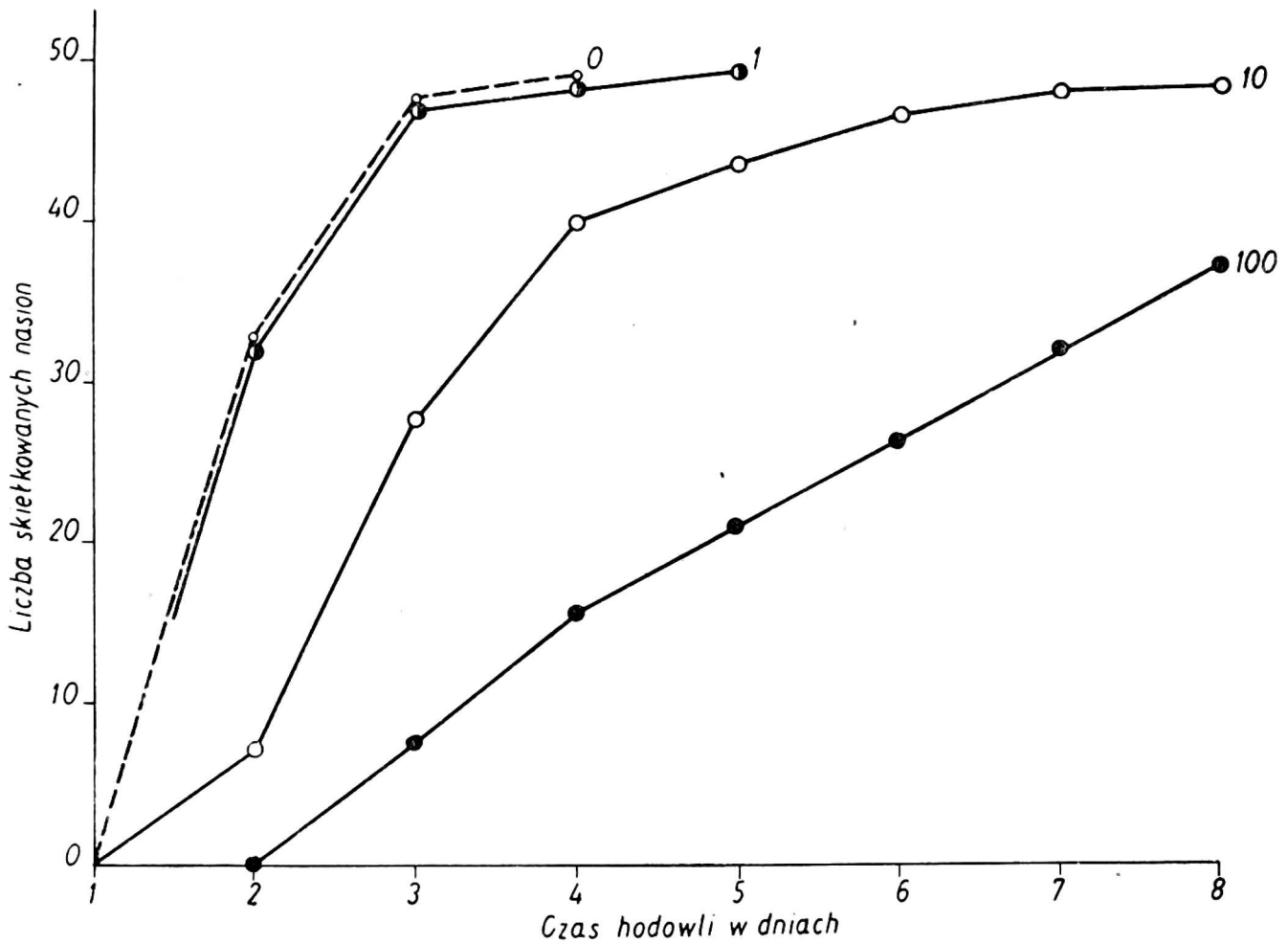
Do pierwszej grupy należą nasiona nie kiełkujące przy 100 p.p.m. kumaryny, nawet po 7-dniowym okresie inkubacyjnym; kiełkowanie przy 10 p.p.m. jest bardzo opóźnione (63, 57). Należy tu owies, wyczyniec łąkowy, tymotka, rzeżucha ogrodowa.

Do drugiej grupy należą nasiona nie kiełkujące przy 1000 p.p.m. kumaryny; jako przykłady można wymienić jęczmień (na który kumaryna w niższych stężeniach działa pobudzająco, por. rys. 3), ogniślepek, kapustę wiosenną wczesną odm. „Przodownica”, pozłotkę, złocień margarytkę (rys. 4) i inne.

Trzecia grupa jest równie liczna jak druga. Należą do niej nasiona *sensu stricto* kiełkujące przy 1000 p.p.m. kumaryny, chociaż początek kiełkowania może być znacznie opóźniony w czasie w porównaniu do kontroli kiełkującej w wodzie, a po dłuższej hodowli kiełkować może 20—80% nasion, zależnie od gatunku i warunków. Wymienić tu można pietruszkę odm. „Lenka” (grupa 3-A), *Arrhenatherum elatius* L. (rys. 5; grupa 3-B), aksamitkę wysoką (rys. 6; grupa 3-C) i inne.



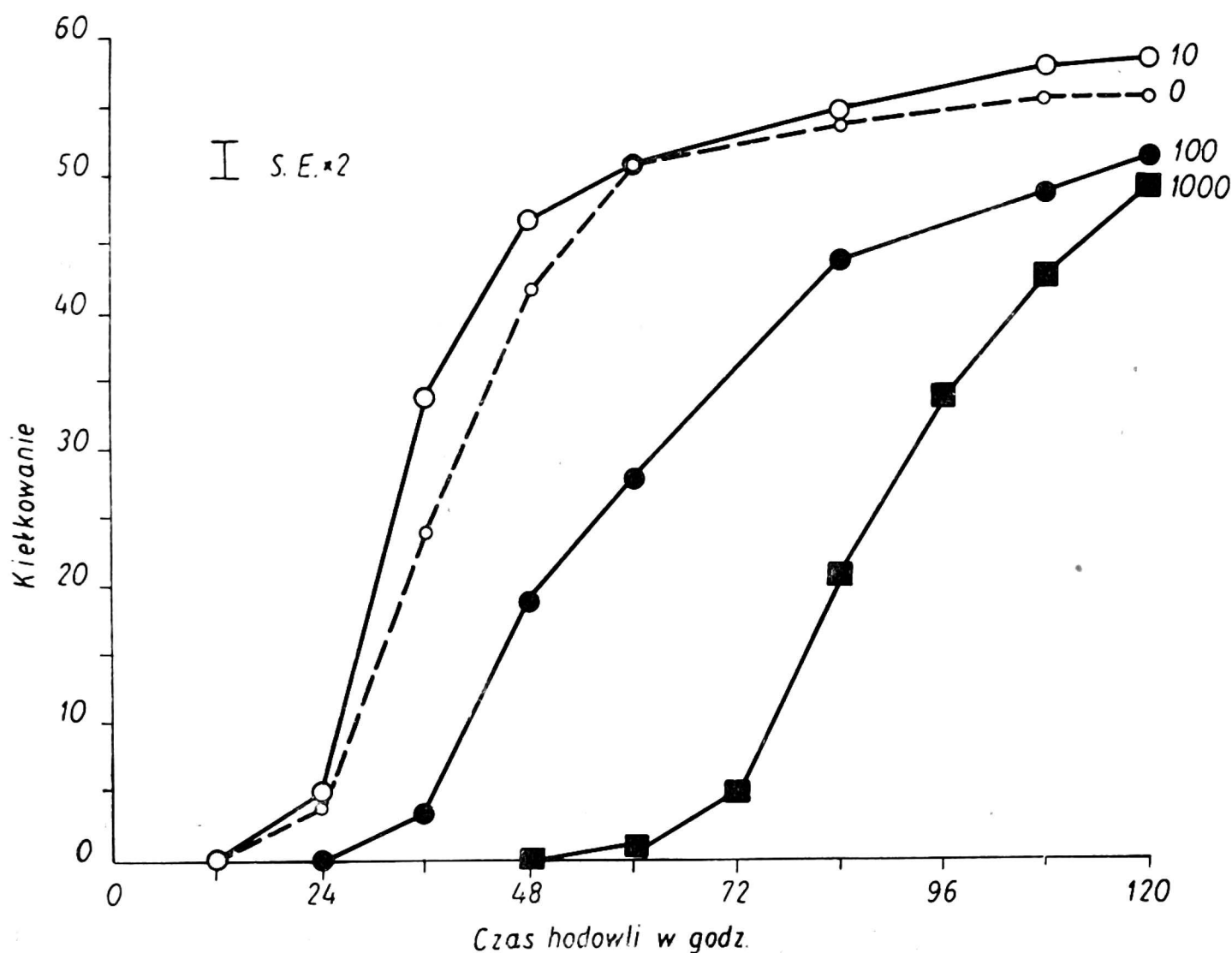
Rys. 3. Wpływ kumaryny na kiełkowanie ziarn jęczmienia *Hordeum vulgare* L. var. „Browarny PZHR” (63). Kiełkowanie prowadzono w ciemności, przy temp. 22° C. Kiełkowanie = liczba skiełkowanych ziarn, przy czym 50 nasion (w jednej szalce Petriego) stanowi 100% kiełkowania. S.E. = Błąd standardowy



Rys. 4. Wpływ kumaryny na kiełkowanie nasion złocieni margarytki, *Chrysanthemum leucanthemum* odm. „Shasta Daisy” (kolor biały), (68).
Metoda: Nasiona, w grupach po 50 sztuk, wysiewano do 10-cm szalek Petriego zawierających 2 krążki bibuły chromatograficznej Whatman nr 1 i 5 ml badanego roztworu; kiełkowanie prowadzono w ciemności przy temp. $24,8^{\circ} \pm 0,2^{\circ} \text{C}$. 50 nasion (w jednej szalce Petriego) stanowi 100% kiełkowania.
 0 — Woda destylowana; 1 — kumaryna, 1 p.p.m.; 10 — kumaryna, 10 p.p.m.; 100 — kumaryna, 100 p.p.m. Kumaryna w stężeniu 1000 p.p.m. całkowicie blokuje kiełkowanie nasion

Do czwartej grupy należą nasiona, których kiełkowanie w przeciągu początkowych 24 godzin ulega zahamowaniu o około 50%, lecz w następnych godzinach liczba skielkowanych nasion w seriach zawierających 1000 p.p.m. kumaryny szybko zbliża się do liczby nasion skielkowanych w kontroli. Słonecznik i kukurydza ilustrują ten typ zależności (por. 63).

Nadmienić należy, że różne odmiany jednego gatunku mogą należeć do różnych grup, czego przykładem może być kapusta wiosenna wczesna, należąca do grupy drugiej, i kapusta pastewna, należąca do grupy trzeciej. Można przypuszczać, że o przynależności nasion do danej grupy decyduje jakość i ilość substancji inhibitorowych występujących w nasieniu (przy założeniu, że przepuszczalność łupin nasiennych dla kumaryny jest jednakowa); i można również, jak się wydaje, powiedzieć, że



Rys. 5. Wpływ kumaryny na kiełkowanie nasion rajgrasu, *Arrhenatherum elatius* L. (63). Cyfry z prawej strony (0—1000) oznaczają stężenie kumaryny (p.p.m.); kiełkowanie prowadzono w ciemności przy temp. 26° C. Kiełkowanie = liczba skielkowanych nasion; 60 nasion (w jednej szalce Petriego) = 100% kiełkowania. S.E. × 2 = Podwójna wartość błędu standardowego

Tabela 2

Wpływ kumaryny na wzrost siewek żyta (*Secale cereale* L. var. „Ludowe”)

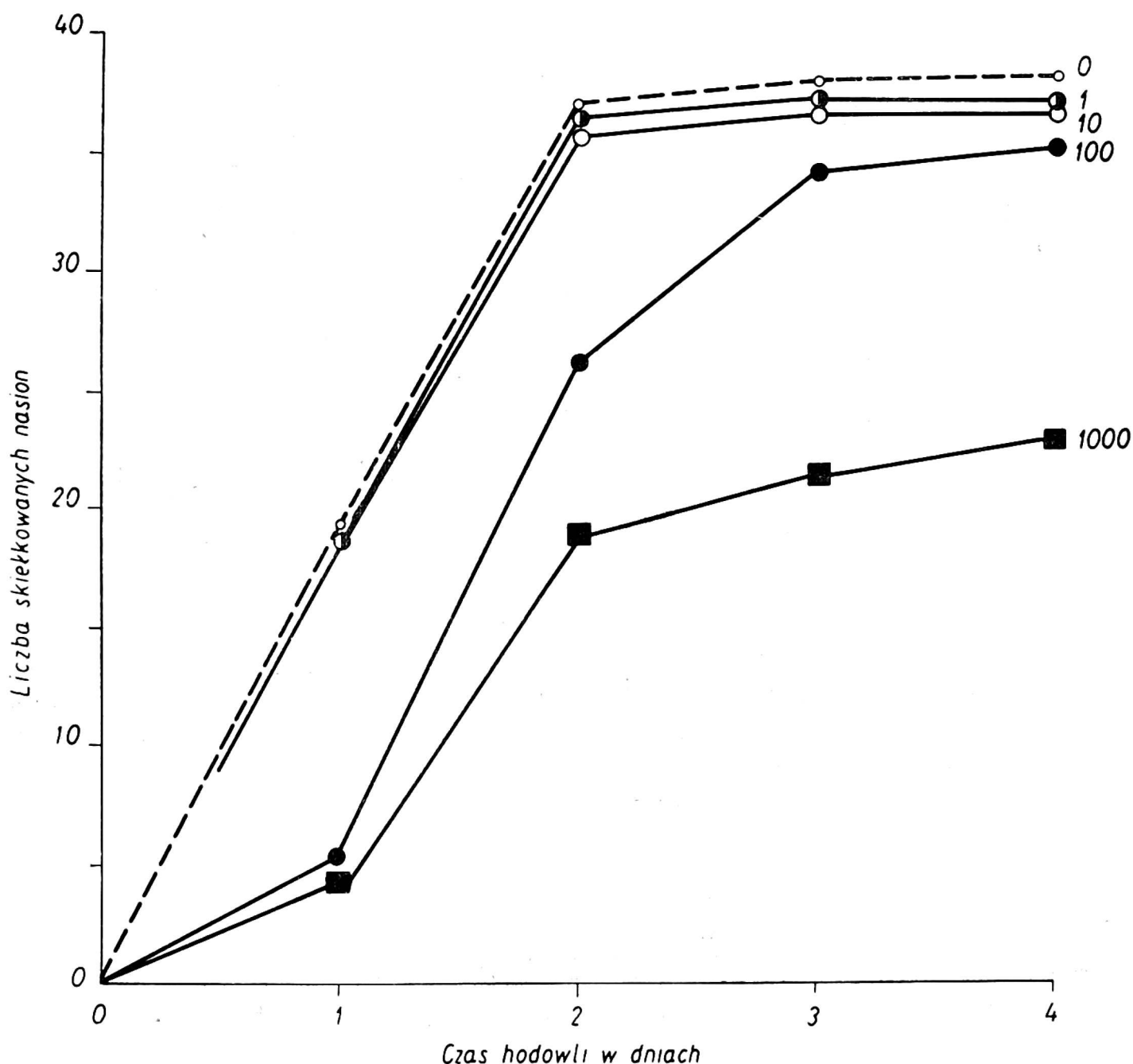
Mierzony parametr	Stężenie kumaryny p.p.m.				
	0	1	10	100	1000
Długość coleoptile, mm	32,5	32,0	31,6	13,7 ¹ ²
Długość korzeni, mm	52,6	51,8	45,8	4,3 ³ ²
Sucha masa coleoptile, mg	3,75	3,70	3,66	1,75 ¹ ²
Sucha masa korzeni, mg	2,77	2,66	2,45	0,80 ³ ²

¹⁾ Wynik dotyczy około 50% nasion, gdyż reszta albo nie skielkowała albo coleoptile były bardzo krótkie.

²⁾ Brak wzrostu.

³⁾ Analizowano około 25% siewek, bowiem reszta nasion albo nie skielkowała albo korzenie nie przekroczyły długości 1 mm.

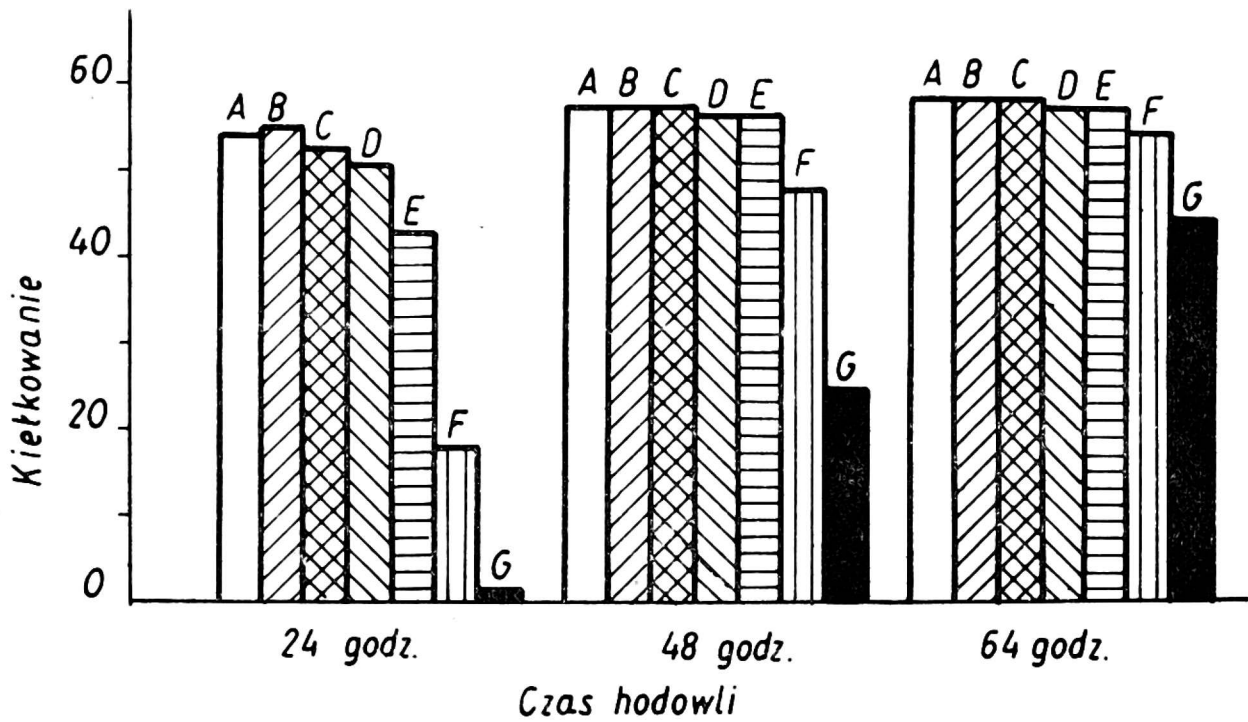
Metoda: ziarna kiełkowano w ciemności przy temp. 26—27° C; do analiz pobierano siewki trzydniowe. W przypadku pomiaru długości korzeni analizowano 2—3 korzenie najdłuższe; przedstawione dane cyfrowe dotyczą jednej, „statystycznej” siewki (63).



Rys. 6. Wpływ kumaryny na kiełkowanie nasion aksamitki wysokiej, *Tagetes erectus* odm. „Smiles” (kolor złotożółty), (68). Metoda: taka sama jak opisano pod rys. 4. 40 nasion (w jednej szalce Petriego) stanowi 100% kiełkowania. Cyfry z prawej strony wykresu (0—1000) oznaczają stężenie kumaryny (p.p.m.)

im głębszy jest stan uśpienia nasienia, im bardziej jest ono bogate w wewnętrzne bariery znoszone przez światło czerwone, odpowiedni cykl zmian temperatury, tlen, itp., tym bardziej jest ono wrażliwe na działanie kumaryny.

Fakt, że nasienie kiełkuje przy danym stężeniu kumaryny nie oznacza, że kiełek rośnie. Przeciwnie, we wszystkich przebadanych przypadkach kumaryna hamuje wzrost siewek już przy stężeniach 10—100 razy niższych od stężenia blokującego kiełkowanie (63). Zależność tę można prześledzić na przykładzie żyta (rys. 7 i tabela 2).



Rys. 7. Wpływ kumaryny na kielkowanie ziarn żyta *Secale cereale* L. odm. „Ludowe” (63). Kielkowanie prowadzono w ciemności przy temp. 27° C; 60 ziarn (w jednej szalce Petriego) stanowi 100% kielkowania. Stężenia kumaryny w p.p.m.: A — 0 (woda destylowana); B — 1; C — 10; D — 62,5; E — 125; F — 250; G — 500

III. Zjawisko hamowania wzrostu korzeni przez kumarynę najbardziej dokładnie było badane na przykładach korzeni *Triticum vulgare* i *Phleum pratense* oraz *Melilotus alba* (138) i *Avena sativa* (40, 132). Burström (21, 23) stwierdził, że proces wydłużania się (elongacji) korzeni pszenicy jest dwustopniowy:

1. pierwsza faza — plastycznego rozciągania ścian komórkowych — stymulowana jest przez IAA i hamowana przez kumarynę; natomiast

2. faza druga — aktywnego wzrostu ścian komórkowych przez włączanie włókien celulozowych — jest hamowana przez IAA.

Na uwagę zasługuje fakt, że korzenie rosnące pod wpływem kumaryny, nieelastyczne i skrócone o około 50% w porównaniu do kontroli, charakteryzują się wyższą od normalnej zawartością pektyn (23). W przeciwieństwie do wniosków Burströma, Avers i Goodwin (7) doszli do wniosku, że kumaryna hamuje drugą fazę wydłużania się korzeni tymotki. Pomijając tę niezgodność wszyscy wymienieni badacze stwierdzają, że najbardziej wrażliwe na kumarynę są komórki bardzo młode, znajdujące się tuż pod stożkiem wzrostu, które jeszcze nie osiągnęły lub dopiero co osiągają strefę maksymalnej elongacji (por. 137). Pod wpływem kumaryny komórki te zamiast wydłużać się zaczynają pęcznić lateralnie, co prowadzi do powstania charakterystycznej bulwki subterminalnej. Naj-

istotniejsze w tym przypadku jest spostrzeżenie, że korzenie pszenicy fizjologicznie zdekapitowane — tzn. potraktowane 10^{-2} M roztworem galaktozy, są względnie znacznie bardziej odporne na działanie kumaryny niż korzenie normalne. IAA przeciwnie, silniej hamuje wzrost korzeni fizjologicznie zdekapitowanych niż korzeni kontrolnych, co świadczy, że IAA hamuje „czyste wydłużanie się” podczas gdy kumaryna hamuje bardziej ogólny (aktywny) wzrost niż czystą elongację (137). Ponieważ szczytowa część korzenia jest miejscem syntezy zarówno stymulatorów jak i substancji inhibitorowych (5, 38, 39, 91, 145) działających najintensywniej na podszczytową część korzenia, wobec tego wnioskować można, że hamujące działanie kumaryny uzależnione jest albo od

1. występowania w korzeniu określonych inhibitorów; albo od
2. potencjalnej zdolności tkanki do syntezy tychże inhibitorów — syntezy, przyspieszanej lub wzbudzanej przez egzogennie podaną kumarynę.

Jeżeli inhibitorów takich brak, lub jeśli tkanka nie jest zdolna do ich syntezy, to na taką tkankę kumaryna działać będzie słabo lub słabiej inhibitorowo, lub nawet pojawi się stymulacja wzrostu. Za słuszością tego przypuszczenia przemawiają również następujące fakty:

1. kilkakrotnie większa wrażliwość korzeni niż kiełków na inhibitorowe działanie kumaryny (63);
2. większa oporność wycinków siewek niż siewek nienaruszonych (por. 58, 63);
3. brak reakcji na kumarynę wycinków hypokotyli słonecznika pozostających w łączności z liścieniami oraz wybitna reakcja na kumarynę fragmentów hypokotyli bez liścieni (60, 63); oraz
4. dane dotyczące wpływu kumaryny na wzrost wycinków i nienaruszonych siewek innych gatunków roślin, zwłaszcza kukurydzy (57, 63).

IV. Kumaryna, sama w wielu przypadkach działając jako silny stymulator wzrostu (1, 57, 60, 71, 115), obniża efekty wzrostowe wzbudzone przez gibereliny (51, 57, 63), kwas indolilo-3-octowy (60, 61, 71, 116), kinetynę (57, 63, 71) oraz odwraca hamujące działanie chlorku (2-chloroetylo) trójmetyloamoniowego na wzrost (61, 71). Jest więc oczywiste, że kumaryna współdziała z innymi regulatorami wzrostu roślin.

V. Kumaryna działa nie tylko na kiełkowanie i wzrost roślin, lecz wpływa również na wzrost i rozwój grzybów oraz bakterii (10, 56, 78, 85, 148), drożdży (57, 63, 71a) oraz glonów (112, 136). Analiza kinetyki kiełkowania nasion oraz rozwój grzybów i drożdży poddanych działaniu kumaryny prowadzi do wniosku, że we wszystkich przypadkach zablokowaniu ulega prawdopodobnie ten sam proces. Procesem tym jest albo oksydacyjna fosforylacja (59, 143, 153) albo proces syntezy białka i kwa-

sów nukleinowych (64, 71), albo oba te procesy jednocześnie. Część, i tylko część, inhibitorowych efektów obserwowanych po zastosowaniu kumaryny są to prawdopodobnie zmiany postępujące za rozkojarzeniem oksydacyjnej fosforylacji. Co się zaś tyczy roślin wyższych, to w rachubę należy brać również fakt, iż kumaryna wchodzić może w określone współzwiązki czynnościowe z pozostałymi regulatorami wzrostu i rozwoju. Dane wykazujące, że kumaryna jest regulatorem wzrostu, oraz hipoteza odnośnie jej roli w roślinie zostaną przedstawione w następnym przeglądzie tej serii. Natomiast dane przedstawione obecnie zdają się wykazywać, że kumarynę niesłusznie uważa się za *s p e c y f i c z n y* inhibitor kiełkowania. Wydaje się, że kumaryna hamuje kiełkowanie albo dzięki temu, że zaburza przemiany energetyczne, albo też pośrednio, poprzez stabilizowanie układu wewnętrznych inhibitorów przy jednoczesnym zahamowaniu syntezy lub przeciwdziałaniu akcji stymulatorów kiełkowania typu np. giberelin lub fytokinin. Ale w ten sam sposób kumaryna działać będzie i przy wzroście, a więc powinna być rozpatrywana jako regulator wzrostu.

LITERATURA

1. A b e r g, B.: Kgl. Lantbrukshögsk. Ann., 27: 99—123, 1961.
- 2a. D' A m a t o, F.: Caryologia, 6: 160—179, 1954.
- 2b. D' A m a t o, F. i M. d' A m a t o - A v a n z i: Caryologia, 6: 134—150, 1954.
3. A s h t o n, W. M. i E. J o n e s: J. Brit. Grassland. Soc., 14: 47—54, 1959.
4. A u d u s, L. J.: J. Linn. Soc. London, Bot., 66: 177—187, 1959.
5. A u d u s, L. J.: Plant Growth Substances. Leonard Hill (Books) Ltd., London, 1959.
6. A u d u s, L. J. i J. H. Q u a s t e l: Nature (London), 159: 320—324, 1947.
7. A v e r s, C. J. i R. G o o d w i n: Amer. J. Bot., 43: 612—620, 1956.
8. B a r t o n, L. V.: W książce W. Ruhland (red.) Handbuch der Pflanzenphysiologie, tom XV/2. A. Lang (red.) Differenzierung und Entwicklung. Springer Verl., Berlin, Heidelberg, New York, str. 727—745, 1965.
9. B e e v e r s, H.: Respiratory Metabolism in Plants. Row-Peterson Biol. Monographs, Row, Peterson and Co., Evanston, Ill., 1961.
10. B e l l i s, D. M.: Nature (London), 182: 806—807, 1958.
11. B e r n h a r d, R. A.: Bot. Gaz., 121: 17—21, 1959.
12. B l a c k, M.: Can. J. Bot., 37: 393—402, 1959.
13. B l a i m, K.: J. Exp. Bot., 11: 377—380, 1960.
14. B l a i m, K.: Roczn. Nauk Roln., 81-A-2: 401—413, 1960.
15. B l u m e n t h a l - G o l d s c h m i d t, S.: Bull. Res. Counc. Israel, 6D: 91, 1958.
16. B l u m e n t h a l - G o l d s c h m i d t, S.: Bull. Res. Counc. Israel, 9D: 93—99, 1960.
17. B o r t h w i c k, H. A. i S. B. H e n d r i c k s: Science (Wash.), 132: 1223—1228, 1960.
18. B o r t h w i c k, H. A. i S. B. H e n d r i c k s: W książce W. Ruhland (red.) Handbuch der Pflanzenphysiologie, Springer Vrl., Berlin, Göttingen, Heidelberg, tom 14, str. 299—330, 1961.

19. Borthwick, H. A. i W. W. Robbins: *Hilgardia*, 3: 275—305, 1938. (Cyt. za 152).
20. Borthwick, H. A., S. B. Hendricks, M. W. Parker, E. H. Toole i V. K. Toole: *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, 38: 662—666, 1952.
21. Burström, H.: *Physiol. Plant.*, 7: 548—559, 1954.
22. Burström, H.: *Physiol. Plant.*, 9: 682—692, 1956.
23. Burström, H.: *Symp. Soc. Exp. Biol.*, 11: 44—62, 1957.
24. Burström, H.: *Kgl. Fysiogr. Sällsk. Lund Förh.*, 28: 53—64, 1958.
25. Butler, W. L., K. H. Norris, W. H. Siegelman i S. B. Hendricks: *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*, 45: 1073—1078, 1959.
26. Cameron, F. K.: *J. Phys. Chem.*, 14: 393, 1910.
27. Constantinescu, D. Gr., M. Constantinescu i M. Retezeanu: *Conf. Nat. Farm., Bucuresti*, 29. VI.—2. VII., 1958.
28. Constantinescu, D. Gr., M. Constantinescu i M. Retezeanu: *Naturwissenschaften*, 46: 272, 1959.
29. Cornman, I.: *Amer. J. Bot.*, 33: 217, 1946.
30. Cornman, I.: *J. Exp. Biol.*, 23: 292—297, 1947.
31. Czopek, M.: *Wiadom. Bot.*, 7: 11—23, 1963.
32. Evenari, M.: *Bot. Rev.*, 15: 153—194, 1949.
33. Evenari, M.: *Radiation Biol.*, 3: 519—549, 1956.
34. Evenari, M.: *Symp. Soc. Exp. Biol.*, 11: 21—43, 1957.
35. Evenari, M.: W książce W. Ruhland (red.) *Handbuch der Pflanzenphysiologie*, Tom XV/2, A. Lang (red.) *Differenzierung und Entwicklung*, Springer Vrl., Berlin, Heidelberg, New York, 1965, str. 804—847.
36. Flemion, F. i P. L. Prober: *Contr. Boyce Thompson Inst.*, 20: 409, 1960. (Cyt. za 106).
37. Goo, M.: *J. Jap. Forestry Sci.*, 34: 3, 1952. (Cyt. za 106).
38. Goodwin, R. H. i F. Kavanagh: *Bull. Torrey Club*, 76: 255—265, 1949.
39. Goodwin, R. H. i B. M. Pollock: *Amer. J. Bot.*, 41: 516—520, 1954.
40. Goodwin, R. H. i C. Taves: *Amer. J. Bot.*, 37: 224—231, 1950.
41. Graillet, G.: *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 33: 1584—1590, 1951.
42. Greef, J. A. de: *Enzymologia*, 27: 311—326, 1964.
43. Haber, A. H. i H. J. Luippold: *Plant Physiol.*, 35: 168, 1960. (Cyt. za 106).
44. Hemberg, T.: W książce W. Ruhland (red.) *Handbuch der Pflanzenphysiologie*, Tom XV/2, A. Lang (red.) *Differenzierung und Entwicklung*, Springer Vrl., Berlin, Heidelberg, New York, 1965, str. 669—698.
45. Hendershott, C. H. i D. R. Walker: *Science (Wash.)*, 130: 798—800, 1959.
46. Ikuma, H. i K. V. Thimann: *Plant Physiol.*, 35: 557—560, 1960.
47. Ishikawa, S.: *Kumamoto J. Sci.*, 2B: 97—103, 1955.
48. Ishikawa, S.: *Kumamoto J. Sci.*, 4B: 9—15, 1958.
49. Kahn, A.: *Plant Physiol.*, 35: 333—339, 1960.
50. Kahn, A., J. A. Goss i D. E. Smith: *Science (Wash.)*, 125: 645—646, 1957.
51. Kato, J.: *Physiol. Plant.*, 11: 10—15, 1958.
52. Khan, A. A., i N. E. Tolbert: *Physiol. Plant.*, 18: 41—43, 1965.
53. Khan, A. A. i N. E. Tolbert: *Physiol. Plant.*, 19: 76—80, 1966.
54. Khan, A. A. i N. E. Tolbert: *Physiol. Plant.*, 19: 81—86, 1966.
55. Klein, S.: Ph.D. Thesis, Hebrew University, Jerusalem, 1956. (Cyt. za 34).
56. Knypl, J. S.: *Nature (London)*, 200: 800—802, 1963.
57. Knypl, J. S.: *Materiały II Symp. Reg. Wzrostu*, Toruń 4—5. VI. 1963. *Zeszyty Naukowe Uniw. M. Kopernika*, Zeszyt 12, Biol. VIII, str. 257—258, 1966.

58. Knypl, J. S.: *Naturwissenschaften*, 51: 117—118, 1964.
59. Knypl, J. S.: *Physiol. Plant.*, 17: 771—778, 1964.
60. Knypl, J. S.: *Planta (Berlin)*, 61: 352—360, 1964.
61. Knypl, J. S.: *Curr. Sci. (Bangalore)*, 33: 518—519, 1964.
62. Knypl, J. S.: *Post. Nauk Roln.*, nr 6 (96): 31—50, 1965.
63. Knypl, J. S.: *Biologiczna czynność kumaryny. Tezy, Uniwersytet Łódzki*, 1965.
64. Knypl, J. S.: *Nature (London)*, 206: 844—846, 1965.
65. Knypl, J. S.: *Acta Soc. Bot. Pol.*, (w druku), 1966.
66. Knypl, J. S.: *Can. J. Bot.*, (w druku), 1966.
67. Knypl, J. S.: *Biol. Plantarum (Praha)*, (w druku), 1966.
68. Knypl, J. S.: w przygotowaniu do druku, 1966.
69. Knypl, J. S.: *Planta (Berlin)*, 72: 292—296, 1967.
70. Knypl, J. S.: *Kosmos, Ser. A. Biol. (Warszawa)*; 15: 369—386, 1966.
71. Knypl, J. S.: *Acta Soc. Bot. Pol.*, 35: 357—373; 611—625, 1966.
- 71a. Knypl, J. S. i J. S. Szopa: *Nature (London)*, 185: 933, 1960.
72. Koller, D., A. M. Mayer, A. Poljakoff-Mayber i S. Klein: *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 13: 437—464, 1962.
73. Kosuge, T. i E. E. Conn: *J. Biol. Chem.*, 234: 2133—2137, 1959.
74. Krekule, J.: *Biol. Plantarum (Praha)*, 3: 107—114, 1961.
75. Kuhn, R., G. Pfeleiderer i W. Schulz: *Ann. Chem. Liebigs*, 578: 159—170, 1952.
76. Lahiri, A. N. i B. C. Kharabanda: *Proc. Nat. Inst. Sci., India*, 29B: 287—296, 1963.
77. Lang, A.: W książce W. Ruhland (red.) *Handbuch der Pflanzenphysiologie*, Tom XV/2 A. Lang (red.) *Differenzierung und Entwicklung*, Springer Vrl., Berlin, Heidelberg, New York, 1965, str. 848—893.
78. Lavee, S.: *J. Exp. Bot.*, 10: 359—366, 1959.
79. Lavollay, J. i F. Laborey: *C. R. Acad. Sci.*, 226: 2015—2016, 1948.
80. Lavollay, J. i F. Laborey: *Compt. Rend. Soc. Biol.*, 142: 825—826, 1948.
81. Lavollay, J. i F. Laborey: *C. R. Acad. Sci.*, 232: 2348—2350, 1951.
82. Lerner, H. R., A. M. Mayer i M. Evenari: *Physiol. Plant.*, 12: 245—250, 1959.
83. Levari, R.: *Palest. J. Bot. (Jerusalem Ser.)*, 6: 47—59, 1953.
84. Levari, R., A. M. Mayer i M. Evenari: *Bull. Res Counc. Israel*, 2: 27—36, 1952.
85. Levy, C. C.: *Nature (London)*, 204: 1059—1061, 1964.
86. Libbert, E.: *Planta (Berlin)*, 44: 286—318, 1954.
87. Libbert, E.: *Flora*, 151: 509—517, 1961.
88. Libbert, E., i H. Zatschler: *Flora*, 153: 233—241, 1963.
89. Marcus, A. i J. Feeley: *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*, 51: 1075—1079, 1964.
90. Marrè, E.: *Atti Acad. Naz. Lincei Rend.*, 15: 533—539, 1953.
91. Masuda, Y.: *Physiol. Plant.*, 15: 780—790, 1962.
92. Mayer, A. M.: *Physiol. Plant.*, 6: 413—424, 1953.
93. Mayer, A. M.: *J. Exp. Bot.*, 7: 93, 1956.
94. Mayer, A. M.: *Physiol. Plant.*, 11: 75—83, 1958.
95. Mayer, A. M.: *Enzymologia*, 19: 1—8, 1958.
96. Mayer, A. M.: *Nature (London)*, 181: 826, 1959.
97. Mayer, A. M.: *Enzymologia*, 20: 313—326, 1959.
98. Mayer, A. M.: *Indian J. Plant Physiol.*, 3: 13—23, 1960.

99. Mayer, A. M.: W książce N. Grossowicz (red.) *Cryptobiotic Stages in Biological Systems*, Elsevier Publ. Co., Amsterdam, 1961, str. 191—201.
100. Mayer, A. M.: *Physiol. Plant.*, 14: 322—331, 1961.
101. Mayer, A. M. i M. Evenari: *Bull. Res. Counc. Israel*, 1: 125—129, 1951.
102. Mayer, A. M. i M. Evenari: *J. Exp. Bot.*, 3: 246—252, 1952.
103. Mayer, A. M., i J. Friend: *J. Exp. Bot.*, 11: 141—150, 1960.
104. Mayer, A. M. i A. Poljakoff-Mayber: W książce R. M. Klein (red.) *Plant Growth Regulation*, Iowa University Press, Ames 1961, str. 735—749.
105. Mayer, A. M. i A. Poljakoff-Mayber: *Physiol. Plant.*, 15: 283—292, 1962.
106. Mayer, A. M. i A. Poljakoff-Mayber: *The Germination of Seeds*, Pergamon Press, Oxford, London, New York and Paris, 1963.
107. Mayer, A. M., A. Poljakoff-Mayber i W. Appelman: *Physiol. Plant.*, 10: 1—13, 1957.
108. Meinl, G. i H. von Guttenberg: *Planta* (Berlin), 44: 121—135, 1954.
109. Miller, C. O.: *Plant Physiol.*, 33: 115, 1958. (Cyt. za 106).
110. Misra, G. i S. N. Patnaik: *Nature* (London), 183: 989—990, 1959.
111. Miyamoto, T., N. E. Tolbert i E. H. Everson: *Plant Physiol.*, 36: 739—746, 1961.
112. Moewus, F. i B. Banerjee: *Nature* (London), 168: 561—562, 1951.
113. Mohr, H.: *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 13: 465—488, 1962.
114. Mohr, H.: *Biol. Rev.*, 39: 87—112, 1964.
115. Neumann, J.: *Physiol. Plant.*, 13: 328—341, 1960.
116. Nitsch, J. P. i C. Nitsch: *Bull. Soc. bot. Fr.*, 108: 349—362, 1961.
117. Nutile, G. E.: *Plant Physiol.*, 20: 433—442, 1945.
118. Östergren, G. i T. Wakoning: *Atti del IX Congr. Int. di Genetica in Caryologia*, vol. suppl., 1954.
119. Östergren, G., i T. Wakoning: *Bot. Notiser*, str. 357, 1964.
120. Ota, T.: *Sci Repts., Fac. Agr. Ibaraki Univ.*, 4: 15, 1956 (Abstr.).
121. Phillips, I. D. J.: *J. Exp. Bot.*, 13: 213—226, 1962.
122. Poljakoff-Mayber, A.: *Palest. J. Bot. (Jerusalem Ser.)*, 5: 180—185, 1952.
123. Poljakoff-Mayber, A.: *Bull. Res. Counc. Israel*, 2: 239—245, 1952.
124. Poljakoff-Mayber, A.: *Palest. J. Bot. (Jerusalem Ser.)*, 6: 101—106, 1953.
125. Poljakoff-Mayber, A.: *Enzymologia*, 16: 122—124, 1953.
126. Poljakoff-Mayber, A.: *J. Exp. Bot.*, 6: 313—320, 1955.
127. Poljakoff-Mayber, A.: *Bull. Res. Counc. Israel*, 6D: 78, 1958.
128. Poljakoff-Mayber, A. i M. Evenari: *Physiol. Plant.*, 11: 84—91, 1958.
129. Poljakoff-Mayber, A. i A. M. Mayer: *J. Exp. Bot.*, 6: 287—292, 1955.
130. Poljakoff-Mayber, A. i A. M. Mayer: *Indian J. Plant Physiol.*, 3: 125—138, 1960.
131. Poljakoff-Mayber, A., A. M. Mayer i S. Zacks: *Bull. Res. Counc. Israel*, 6D: 118—124, 1958.
132. Pollock, B. M., R. H. Goodwin i S. Greene: *Amer. J. Bot.*, 41: 521—529, 1954.
133. Quercioli, E.: *Atti. Acad. Naz. Lincei Rend.*, 16: 645—649, 1954.
134. Quercioli, E.: *Atti. Acad. Naz. Lincei Rend.*, 18: 313—318, 1955.
135. Rimon, D.: *Bull. Res. Counc. Israel*, 5D: 53—55, 1957.
136. Ron, A., i A. M. Mayer: *Bull. Res. Counc. Israel*, 7D: 94—96, 1959.

137. Rufelt, H.: *Svensk Bot. Tidskr.*, 53: 312—318, 1959.
138. San Antonio, J. P.: *Bot. Gaz.*, 114: 79—95, 1952.
139. Schreiner, O. i H. S. Reed: *Bot. Gaz.*, 45: 73—102, 1908.
- 139a. Shternberg, M. B.: W książce V. V. Polevoi (red.) *Regulatory rosta rastenii i nukleinovy obmen*, Izd. Nauka, Moskva 1965, str. 65—102.
140. Sigmund, W.: *Biochem. Z.*, 62: 339—386, 1914.
141. Stavy, L. i A. M. Mayer: *Bull. Res. Council Israel*, 11B: 31, 1962.
142. Steinegger, E. i H. Leupi: *Pharm. Acta Helv.*, 30: 452—461, 1955.
143. Stenlid, G. i K. Saddik: *Physiol. Plant.*, 15: 369—379, 1962.
144. Stokes, P.: W książce W. Ruhland (red.) *Handbuch der Pflanzenphysiologie*, Tom XV/2. A. Lang (red.) *Differenzierung und Entwicklung*. Springer Verl., Berlin, Heidelberg, New York, 1965, str. 746—803.
145. Street, H. E.: *Nature (London)*. 188: 272—274, 1960.
146. Sulma, T. i K. Wierzchowska: *Acta Pol. Pharm.*, 20: 77—82, 1963.
147. Sumere, C. van, i L. Massart; W książce K. H. Spitzzy and R. Brunner (red.) *Proc. IVth Int. Congr. Biochem. V. Biochemistry of Antibiotics*, Pergamon Press, London, New York, Los Angeles, 1959, str. 20—32.
148. Sumere, C. F. van, C. van Sumere-de Preter, L. C. Vining i G. A. Ledingham: *Can. J. Microbiol.*, 3: 847—862, 1957.
149. Thompson, R. C. i W. F. Kosar: *Science (Wash.)*, 87: 218, 1938.
150. Thompson, R. C. i W. F. Kosar: *Plant Physiol.*, 14: 567—573, 1939.
151. Toole, E. H., V. K. Toole, H. A. Borthwick i B. Hendricks: *Plant Physiol.*, 30: 15—21, 1955.
152. Toole, E. H., S. B. Hendricks, H. A. Borthwick i V. K. Toole: *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 7: 299—324, 1956.
153. Ulitzur, S. i A. Poljakoff-Mayber: *J. Exp. Bot.*, 14: 95—100, 1963.
154. Varner, J. E. i G. R. Chandra: *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*, 52: 100—106, 1964.
155. Wareing, P. F.; W książce W. Ruhland (red.) *Handbuch der Pflanzenphysiologie*, Tom XV/2 A. Lang (red.) *Differenzierung und Entwicklung*, Springer Vrl., Berlin, Heidelberg, New York, 1965, str. 909—924.
156. Winter, H.: *Planta (Berlin)*, 44: 636—668, 1954.