

E 196

INŠTITUT ZA GOZDNO IN LESNO GOSPODARSTVO V LJUBLJANI

HORMONALNA KONTROLA KALITVE
JELOVEGA SEMENA

LJUBLJANA 1982

0x1. 232.315.3 : 161.4 -- 015.3 : 179.7 *Abies alba*

E 196

INŠTITUT ZA GOZDNO IN LESNO GOSPODARSTVO
LJUBLJANA

HORMONALNA KONTROLA KALITVE

JELOVEGA SEMENA

LJUBLJANA, 1982

Sestavil:

Dušan JURČ, dipl.biol.

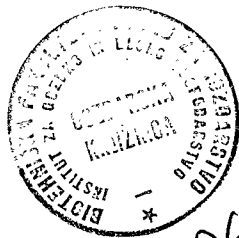
Dušan Jurč



Direktor:

Marko KMECL, dipl.inž.

Marko Kmecl



196

Delo je bilo opravljeno v Fitofiziološkem laboratoriju VTOZD za biologijo, Biotehniška fakulteta, pod vodstvom mentorja prof.dr.Mirana Vardjana. Za vso pomoč pri delu se mu zahvaljujem.

Zahvaljujem se tudi Vandi Golobinek in Nadi Hojnik, saj bi brez njune stalne pomoči dela ne mogel izvesti.

Raziskovalni skupnosti Slovenije, Splošnemu združenju gozdarstva in vodstvu Inštituta za gozdno in lesno gospodarstvo, ki so mi delo omogočili, najlepša hvala.

Nosilec: Dušan JURČ, dipl.biolog,
Inštitut za gozdno in lesno gospodarstvo
pri BF v Ljubljani

Sodelavec: dr.Miran VARDJAN, redni profesor
VDO Biotehniška fakulteta, Ljubljana,
VTOZD za biologijo

Tehnični sodelavki:

Vanda GOLOBINEK, VDO Biotehniška fakulteta,
Ljubljana, VTOZD za biologijo

Nada HOJNIK, VDO Biotehniška fakulteta,
Ljubljana, VTOZD za biologijo

V S E B I N A

Stran:

IZVLEČEK

ABSTRACT

1. UVOD	1
2. MATERIAL IN METODE DE LA	5
2.1. Izvor, obdelava in gojenje semen	5
2.2. Lupljenje in homogeniziranje semen	6
2.3.1. Ekstrakcija in čiščenje giberelinov	7
2.3.2. Papirna kromatografija	8
2.4. Biotest na gibereline	9
2.5. Spremembe metodike dela	10
2.6.1. Ekstrakcija in čiščenje citokininov	11
2.6.2. Papirna kromatografija	11
2.7. Biotest na citokinine	11
3. REZULTATI	13
3.1. Kalitev	13
3.2. Giberelinska aktivnost	13
3.3. Citokininska aktivnost	22
4. DISKUSIJA	29
5. DODATEK	32
6. LITERATURA	41

I z v l e č e k

Spremljali smo spremembe giberelinske in citokininske aktivnosti v jelovih semenih (*Abies alba* Mill.) med hladno stratifikacijo in med gojenjem semen pri sobni temperaturi. Giberelinska aktivnost snovi na Rf 0,7 - 0,8 in Rf 1,0 je v začetku stratifikacije nizka, nato narašča in doseže vrh 2 dni po prenosu semen na sobno temperaturo, to je tik pred pričetkom kalitve. Giberelinska aktivnost snovi na Rf 0,4 je visoka med stratifikacijo, nato upade. V nestratificiranih semenih doseže giberelinska aktivnost vseh treh snovi vrh tretji dan po omočenju semen in 6 dni pred pričetkom kalitve. Citokininska aktivnost v n-butanolu topne snovi na Rf 0,5 med stratifikacijo ne doseže vrha, v nestratificiranih semenih pa je vrh aktivnosti deveti dan, takrat, ko semena prično kaliti.

A b s t r a c t .

Changes in gibberellin - like and cytokinin - like activities were investigated in silver fir (*Abies alba* Mill.) seeds during cold stratification and growth at room temperature. At the beginning of stratification are the activities of gibberellin - like substances at Rf 0,7 - 0,8 and Rf 1,0 low, then they increase and reach the highest point 2 days after having been transferred to room temperature i.e. directly before the germination start. Activity of gibberellin - like substance at Rf 0,4 is high during the stratification period, then it drops. In nonstratified seeds gibberellin - like activities of all three substances culminate the third day after soaking and 6 days before the germination start. Cytokinin - like activity of the n-butanol soluble substance at Rf 0,5 does not culminate, while in nonstratified seeds the activity culminate the ninth day i.e. when germination begins.

1. UVOD

Nastanek zigote je začetni, prodor korenčice skozi semensko lupino pa končni dogodek v razvoju semena. Med tema mejama je nerazjasnjenih še vrsta fizioloških in biokemičnih procesov.

Po oploditvi se celice hitro delijo, v nastajajoče seme pritekajo hranilne snovi, oblikujejo se rezervni organi in embrio. Ta burni razvoj pa se z dozoritvijo semena nenadoma ustavi. Seme izloči ali kako drugače izgubi vodo, dihanje skoraj preneha, mnoge zunanje celice semena odmro. V takem stanju lahko semena preživijo različno dolga obdobja in to je čas, ko se seme običajno loči od materinske rastline in je prenešeno na bodoče rastišče. Od mnogih dejavnikov izven semena in tistih v njem je odvisno, kdaj bo seme pričelo sprejemati vodo, kdaj bodo aktivirani posamezni encimi, kdaj bo na voljo dovolj energije, da bo embrio pričel rasti in da bo seme končno vzkli-
lo (Thimann, 1977).

V številnih laboratorijih raziskujejo predvsem procese v semenu od osamosvojitve do kalitve. Glede na biološki in ekonomski pomen kalitve moramo obravnavati te raziskave kot temeljne. Gre namreč za proces, s katerim prične delovati (živeti) biološki sistem, za katerega pred tem ne moremo reči, da živi in ki je ključnega pomena za kmetijstvo in gozdarstvo.

Rastline so razvile različne mehanizme, s katerimi kontrolirajo kalitev. Ti mehanizmi zagotavljajo preživetje potomcev v specifični ekološki niši določene rastline. Skupna značilnost vseh teh mehanizmov je, da ostanejo semena viabilna (viabilnost je sposobnost ohraniti kalivost) tudi po različno dolgih obdobjih in kalijo, ko so ekološke razmere ugodne za rast.

Semena, ki se morfološko ne spreminjajo, biokemično in fiziološko pa so malo aktivna zaradi neugodnih ekoloških razmer za rast, imenujemo mirujoča (angl. quiescent, quiescence - Jann in Amen, 1977, imposed dormancy - Nikolajeva, 1977). Semena, ki so mirujoča zaradi aktivne inhibicije rasti, pa imenujemo dormantna. (tudi slov. speča, počivajoča, spanje, počitek in angl. dormant, dormancy - Jann in Amen, 1977). *

Nikolajeva (1977) je razvrstila dormantna semena po vzrokih, ki povzročajo dormanco. Loči eksogeni, endogeni in kombinirani tip dormance. Vzroki eksogene dormance so fizikalni (semenski ovoji so nepropustni za vodo), kemijski (semenska lupina ali perikarp vsebujeta inhibitorje) ali mehanski (mehanska trdnost semenskih ovojev preprečuje rast embria). Endogeno dormanco povzročajo morfološki (embrio ni razvit) ali fiziološki dejavniki (kalitev preprečuje fiziološki inhibicijski mehanizem). Fiziološki dejavniki imajo glede na jakost inhibicijskih mehanizmov kalitve tri podtipe. Razlikuje tudi kombinacije različnih tipov endogene dormance, obstojajo pa verjetno tudi kombinacije med eksogeno in endogeno dormanco. Ta razvrstitev ima tudi praktičen pomen, kajti semenom z istim tipom dormance, lahko dormanco prekinemo z enakimi postopki.

Pregled konceptov in teorij dormance podaja Khan (1977). Ugotavlja, da so se teorije o vzrokih dormance in njeni prekinitvi opirale na naslednje trditve: 1) semenski ovoji preprečujejo izmenjavo snovi z okoljem, 2) inhibitorji so prisotni ali ne, 3) rastlinski hormoni imajo selektivno vlogo, 4) fitohrom je v aktivni ali neaktivni obliki, 5) v oksidativnih poteh pride do premika, 6) translacija in transkripcija genetskega materiala poteka ali ne.

*

Horvat-Maroltova (1979) uvaja nov slovenski izraz "kalilni zastoj" in ga razloži: "Kalilni zastoj predstavlja obdobje mirovanja kalitve odn. čakalno dobo." Iz razlage v preostalem tekstu lahko razberemo, da ima avtorica v mislih dormanco semen. Morfološko je kalitev prodor korenčice skozi semenske ovoje, torej je kalilni zastoj začasna prekinitve že začete kalitve. Izraza kalilni zastoj zato ne moremo uporabiti namesto izraza dormanca.

Med temi teorijami imajo pomembno mesto tiste, ki upoštevajo vlogo rastlinskih hormonov pri dormanci in njeni prekinitvi. Hormoni namreč pospešujejo ali zavirajo rast in razvoj rastline ali njenih organov, povzročajo pa tudi kvalitativne spremembe. Seme je razvojna stopnja v življenju vsake rastline in ni čudno, da tudi v tem obdobju rastlinski hormoni odločilno vplivajo na njegov razvoj.

Že zgodnje raziskave dormantnih semen so pokazale, da je prisotnost inhibitorjev lahko vzrok dormance. Inhibitorje kalitve so izolirali iz perikarpa, teste, endosperma in embria. Kemično nedifinirane so imenovali npr. blastokolin, γ -inhibitor kompleks. Za inhibitorje kalitve so spoznali tudi fenole in kumarin (več avtorjev po Khan, 1977). Z odkritjem abscizinske kisline (ABA) v letu 1963 je kazalo, da bo inhibicijska teorija dormance postala splošno veljavna. Ugotovili so pozitivno korelacijo med količino ABA in globino dormance pri vrsti semen (*Fraxinus americana*, jabolani, *Juglans regia*, *Acer saccharum*, *Acer pseudoplatanus*). Nadaljnje raziskave pa so to teorijo omajale, kajti nekatera dormantna semena ne vsebujejo inhibitorjev, v nekaterih nedormantnih pa so ugotovili visoko aktivnost ABA. (npr. *Acer saccharinum*).

Naslednje teorije upoštevajo tudi vpliv drugih hormonov. Po eni od teh teorij (Amen, 1968, po Khan, 1977) je vzrok dormance prisotnost inhibitorjev, dormanca semen pa se prekine z aktivnostjo "promotorjev" (angl. promotor). Med "promotorje" šteje endogene gibereline ter citokinine in najvažnejšo vlogo pri prekinitvi dormance pripisuje giberelinom. Druga teorija (Webb in sod., 1973, Lewak in sod., 1975, po Khan, 1977) vključuje spoznanja, da se določeni hormoni med stratifikacijo pojavljajo v določenih obdobjih. Najprej se zniža aktivnost ABA, v naslednji fazi postanejo aktivni giberelini in citokinini, v tretji fazi pa pride do sprememb, ki povzročijo kalitev. Vsaka faza sproži določene procese, pomembne za kalitev. Posebno vlogo citokininov v teorijah prekinitve dormance je poudaril Khan (1971). Po tej teoriji dormanca in njena prekinitvev pri različnih semenih nimata enotnega mehanizma (npr. inhibitorji - dormanca, "promotorji" - kalitev), ampak obstaja večje število kombinacij hormonov, od katerih nekatere povzročijo dormanco semen, druge pa kalitev. V tem modelu imajo odlo-

čujoč pomen giberelini (angl. primary role), citokinini kalitev dopustijo (angl. permissive role), inhibitorji pa jo preprečujejo (angl. preventive role). Kontrola kalitve je po tej teoriji regulirana z medsebojno interakcijo inhibitorjev in citokininov, ki kontrolirajo aktivnost giberelinov, hormonov, ki imajo odločilno vlogo v prekinitvi dormance. Enak mehanizem kontrole rasti je bil ugotovljen tudi pri brstenju, rasti poganjkov, delitvi celic, odpiranju listnih rež, prepustnosti celičnih membran itd. (Khan, 1975, po Thomas., 1977).

Mehanizem hormonalne kontrole kalitve v jelovih semenih smo skušali ugotoviti s pričujočo raziskavo. Delne raziskave hormonov jelovih semen so bile že opravljene (Vardjan, 1978), vendar so ostali odprti številni problemi.

Po stratifikaciji kalijo jelova semena hitro in z dobro končno kapaciteto. Kalijo pa tudi brez stratifikacije, a z manjšo energijo in končno kapaciteto. Vardjan (1978) jih označuje kot relativno slabo dormantna, Mučalo in Regent (1966) postavljata, da jelovo seme ne spada v skupino dormantnih semen v pravem pomenu besede. V klasifikacijo po Nikolajevi (1977) uvršča Vardjan (1980) dormanco jelovih semen v kombiniran tip. Eksogeni povzročitelji dormance so trda semenska lupina in eterična olja v njej, endogeni pa eterična olja v embriju in endospermu.

Glede na poudarjen pomen rastlinskih hormonov v razvoju semena, smo želeli ugotoviti spreminjanje aktivnosti giberelinov in citokininov v jelovih semenih med hladno stratifikacijo in gojenjem pri sobni temperaturi. Nadejali smo se, da bodo ugotovljene spremembe aktivnosti hormonov nakazale postopke, s katerimi bi v prihodnosti poizkušali dormanco prekiniti in doseči hitro in dobro kalitev jelovih semen.

2. MATERIAL IN METODE DE LA

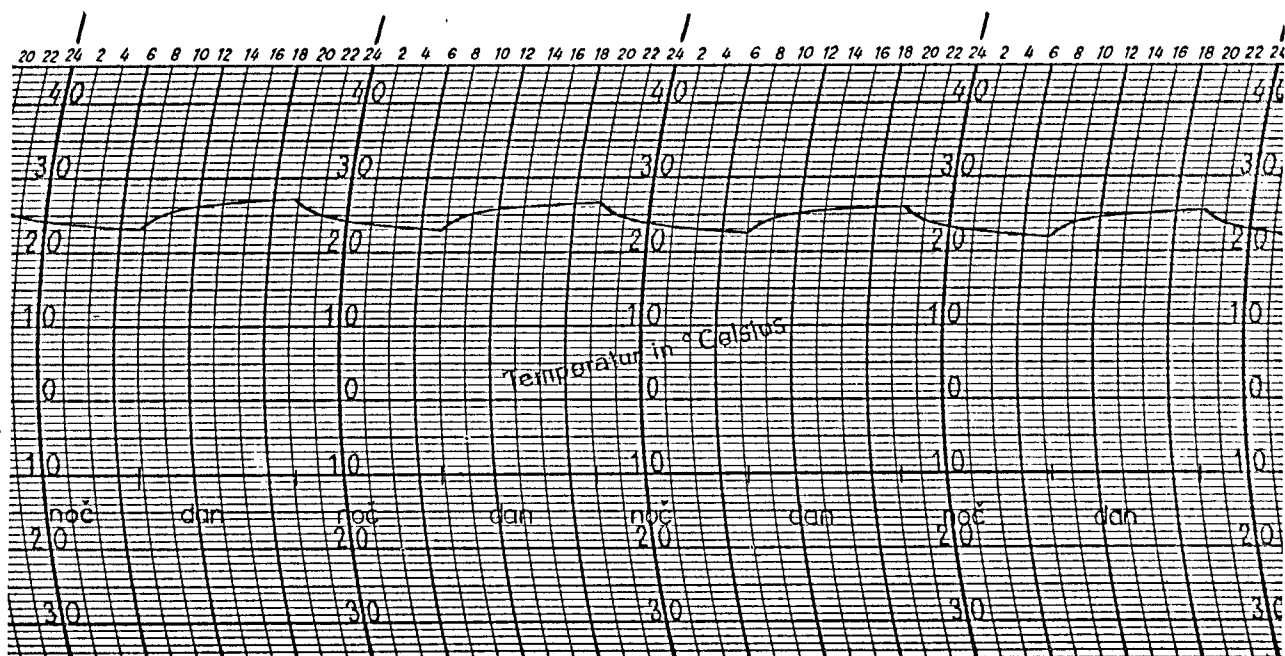
2.1. Izvor, obdelava in gojenje semen

Pri vseh poizkusih smo uporabljali jelovo seme (*Abies alba* Mill.), ki je bilo nabrano jeseni 1980. leta na Papuku (SR Hrvaška, občina Slavonska Požega) v semenskem sestoju z republiško oznako Djedovica 23 c. Seme so nabrali delavci podjetja Semesadike Mengeš. V tem podjetju so storže posušili, seme očistili, odstranili so mu krilca in ga shranili v plastični vreči pri -5 do -8°C .

Seme, ki smo ga prinesli iz hladilnice v Mengšu, smo v laboratoriju hranili v plastični vrečki pri $+3^{\circ}\text{C}$ največ 2 meseca.

Seme, ki smo ga nameravali stratificirati, smo najprej namakali 24 ur v destilirani vodi pri $+3^{\circ}\text{C}$. Nato smo ga namestili med vermikulit v cvetlične lončke in ga hranili pri $+3^{\circ}\text{C}$. Med stratifikacijo smo seme enkrat zalili z ohlajeno destilirano vodo. Po 21 dneh smo seme večkrat sprali z destilirano vodo, ga namestili v petrijevke na 2 plasti vlažnega filtrirnega papirja in ga prenesli v kalilno komoro.

Seme, ki smo ga nameravali gojiti na sobni temperaturi, smo najprej namakali 24 ur v destilirani vodi pri $+18^{\circ}\text{C}$, nato smo ga namestili v petrijevke na 2 plasti vlažnega filtrirnega papirja. Petrijevke smo hranili v kalilni komori, ki je bila osvetljena 12 ur dnevno s fluorescentnimi žarnicami Sylvania gro-lux F40T12GR0. Na površini, kjer smo gojili seme, je imela svetloba energijo sevanja $3,2 \text{ Watt/m}^2$. Nihanje temperature smo beležili s termografom (slika 1). V nadaljevanju teksta označujemo te temperaturne in svetlobne razmere kot sobna temperatura ali $+25^{\circ}\text{C}$.



Slika 1 : Nihanje temperature v dnevno-nočnem ciklusu v kalilni komori.

2.2. Lupljenje in homogeniziranje semen

Za vse poizkuse smo seme najprej sprali z destilirano vodo; s tem smo odstranili večino površinsko razraslih plesni. Seme smo s skalpelom podolžno prerezali in s preparirno iglo ločili endosperm in embrio od teste. Endosperm in embrio smo skupaj dajali v čašo z 80% metanolom, ki je bila v vodni kopeli z ledom. Endosperm obdaja z zunanje strani kožasta endotesta (Vardjan, 1978). V različnih obdobjih kalitve je endotesta bolj ali manj močno povezana ali s sklerotesto, ali pa z endospermom. Ekstrakt je zato včasih vseboval več, včasih pa manj endoteste.

Poseben problem so predstavljala polna semena, ki med kalitvijo zginejo. V začetnih obdobjih stratifikacije in gojenja pri sobni temperaturi je težko oceniti, katera semena bodo zgnila, katera pa bodo

vzklila. Nepravilno bi bilo ekstrahirati semena, ki so mrtva in ki kasneje zgnijejo, saj bi tako v zgodnjih obdobjih kalitve ekstrakt vseboval manjše število viabilnih semen kot v kasnejših. Zato smo odstranjevali vsa semena, ki so imela rumen ali prozoren endosperm, rumen embrio, embrio z rjavo koreničico, semena, ki so bila mehka in sluzasta, prelomljena ali kako drugače poškodovana.

TABELA 1

	Zdrava semena	Gnila semena	Gluha semena
Suha	100	25	39
1 dan namočena	100	43	51
1 teden stratificirana	100	41	51
2 tedna stratificirana	100	46	42
3 tedne "	100	34	39
3 t.str. + 2 dni (+ 25°C)	100	26	54
3 t.str. + 4 dni (+ 25°C)	100	29	67
3 t.str. + 6 dni (+ 25°C)	100	44	34
3 dni sobna temp.	100	27	36
6 dni sobna temp.	100	20	34
9 dni sobna temp.	100	31	32

Tabela 1 prikazuje število zdravih semen, ki smo jih uporabili za ekstrakcijo, nato število semen, ki smo jih odstranili, ker so bila gnila (ali smo ocenili, da bodo zgnila) in število gluhih semen. V zdravih semenih smo merili aktivnost giberelinov.

2.3.1. Ekstrakcija in čiščenje giberelinov

Ekstrakcijo in čiščenje giberelinov smo izvedli po močno spremenjeni metodi, ki jo opisujeta Oegama in Fletcher, (1972). Spremembe temeljijo na izsledkih, ki so jih objavili Coombe in sodelavci (1967/b) in Glenn in sodelavci (1972).

Olupljena semena smo strli v terilnici v 80% metanolu . Ekstrahirali smo 3 x 24 ur pri + 3^oC , vsakič s 100 ml topila za 150 semen (ali 65 ml topila za 100 semen). Po filtriranju smo ekstrakt uparili do vodne faze z rotavaporjem pri + 30^oC . Vodni ekstrakt smo shranili pri - 15^oC . Fenole smo iz vodnega ekstrakta odstranili z netopnim polivinilpirolidonom (PVP - ime pripravka je Polyclar AT insoluble - Glenn in sod., 1972). Približno 50 mg PVP /ml ekstrakta smo stresali 15 minut in PVP odstranili z vakumsko filtracijo. PVP smo sprali 2 x , vsakič z 10 ml distilirane vode in filtrate združili. Tako dobljen filtrat (pH 7 - 7,2) smo umerili na pH 8,5 z 0,25 M KOH in stresali 2 x 20 minut z enakim volumnom petrol etra 40 - 70^oC . Petrol etrovo fazo smo od vodne ločili s centrifugiranjem 10 minut pri 3000 obratih na minuto. Vodno fazo smo iz centrifugirk odpipetirali in jo umerili na pH 2,5 z 0,1 N HCl . Petrol eter smo zavrgli, vodni ekstrakt pa smo stresali 5 x 15 minut z enakim volumnom etil acetata. Vodo in etil acetat smo ločili v liju ločniku (obe fazi se dobro ločita po približno 15 minutah). Vodo smo zavrgli, etil acetatne faze pa združili in etil acetat odparili z rotavaporjem pri 30^oC . Pri zmanjševanju volumna etil acetata se izloči voda, ki smo jo odstranili s pipeto, ko se je volumen etil acetata zmanjšal na približno 1/5 prvotnega (iz 250 ml etil acetata se izloči 0,2 - 2 ml vode). Posušen ekstrakt smo shranili pri - 15^oC .

2.3.2. Papirna kromatografija

Posušen ekstrakt smo povzeli z 90% etanolom (1 ml + 0,4 ml + 0,4 ml) in ga nanegli na 6 cm širok kromatografski papir Whatman 1. Kromatogram smo ekvilibrirali približno 4 ure nad topilom izopropanol : voda(4 : 1) in ga razvili v istem topilu do višine 20 cm. Kromatogram se je razvijal 12 - 17 ur , odvisno od temperature okolja. Razvit kromatogram smo posušili, ga takoj zavili v steriliziran papir in še isti dan opravili biotest.

2.4. Biotest na gibbereline

Gibberelinsko aktivnost smo ugotavljali s spremenjenim biotestom na ječmenov endosperm (Nicholls in Paleg, 1963). Spremembe temeljijo na izsledkih, ki jih opisujejo Coombe in sod. (1967/a, b) in Tomaszewska (1976).

Uporabljali smo ječmenovo seme neznane sorte, kupljeno pri kmetu 1979 leta. Rezultati biotesta so bili s tem semenom boljši, kot s semenom drugih sort (npr. Union).

Ječmenova semena smo namakali 3 ure v 50% H_2SO_4 , ki deloma razgradi semensko lupino in seme sterilizira (Coombe in sod., 1967/a). Seme smo nato stresali 10 x 5 minut v destilirani sterilizirani vodi (skupna količina vode je 1,5 l za približno 500 semen). S tem smo semenom odstranili semenске ovoje. V sterilni komori smo vsako seme prečno prerezali s skalpelom in dele z embriji zavrgli. Endospermalne dele ječmenovih semen (dolgi so približno 4 mm) smo sterilizirali 20 minut v 10 % raztopini natrijevega hipoklorita (varikina, 3,6 % aktivnega klora). Nato smo jih 5 x sprali z destilirano sterilizirano vodo (skupna količina vode je 0,5 l za približno 250 endospermalnih delov). Shranili smo jih v sterilni destilirani vodi, 16 - 18 ur pri $+3^{\circ}C$.

V sterilni komori smo razrezali kromatogram na 10 delov (vsak predstavlja ustrezno R_f vrednost), jih namestili v sterilizirane petrijevke (premer 5 cm), dodali 3 ml sterilne destilirane vode in 4 dele ječmenovega endosperma. Vse delo pri biotestu je bilo opravljeno tako, da bi se kar najbolj izognili kontaminaciji testnih petrijevok z mikroorganizmi. Kontrolo s čistim kromatografskim papirjem smo izvedli v 5 ponovitvah, standarde z gibberelini (10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} μg GA3/ml), pa v 3 ponovitvah. Inkubirali smo 24 ur pri $30^{\circ}C$. Količino reducirajočih sladkorjev v testni raztopini smo ugotavljali po metodi, ki jo opisuje Paleg, 1960.

Iz vsake petrijevke smo odpipetirali 1 ml sladkorne raztopine in jo 20 minut segrevali z bakrovim reagentom (1 ml). Ko smo dodali arzen-molibdatni reagent (1 ml), se je raztopina obarvala in po redčenju smo izmerili ekstinkcijo pri 560 nm s spektrofotometrom Beckman, Acta II C. Izračunali

smo količino reducirajočih sladkorjev v vsaki petrijevki s primerjavo z ekstinkcijami raztopin znanih količin glukoze. Količine reducirajočih sladkorjev navajamo v odstotkih od poprečne kontrolne vrednosti.

Rezultate biotestov smo statistično obdelali z analizo variance. Približno polovica biotestov je bila opravljena v treh ponovitvah, polovica pa v dveh.

2.5. Spremembe metodike dela

Spremembe, ki smo jih uvedli pri čiščenju ekstrakta in pri biotestu na gibereline, so se pokazale kot pozitivne.

S PVP smo odstranili fenole (Glenn in sod., 1972), s petrol etrom smo odstranili maščobe. Oegama in Fletcher (1972) ne omenjata, da se ob uparevanju etil acetata izloči voda. Coombe in sod. (1966), opozarjajo, da vode iz etil acetata ne smemo odstraniti z natrijevim sulfatom (ta način navajajo nekatere metodike), kajti neznane snovi povzročijo giberelinsko aktivnost pri kasnejšem biotestu z ječmenovim endospermom. (ta aktivnost na ni aktivnost endogenih hormonov). Vodo smo zato iz etil acetata odpipetirali. Biotest z ječmenovim endospermom smo izvajali s štirimi deli endosperma, ne pa z dvema (Coombe in sod., 1966) zato, da smo dobili večje količine sladkorjev, ki smo jih lažje ugotavljali. Tomaszewska (1976) je pred biotestom kromatograme avtoklavirala. To nismo izvedli zaradi predpostavke, da bi z avtoklaviranjem delno zmanjšali giberelinsko aktivnost snovi iz ekstrakta. Domneve nismo preverjali. Ker nismo avtoklavirali, je možnost okužbe testnih petrijev večja, zato smo test skrajšali od 48 ur (Tomaszewska, 1976) na 24 ur (Coombe in sod., 1966 uporabljajo 24 -48 urno inkubacijo).

2.6.1. Ekstrakcija in čiščenje citokininov

Ekstrakcijo in čiščenje citokininov smo izvedli po spremenjeni metodi, ki jo opisujeta Brown in Van Staden (1973).

Citokinine smo ekstrahirali enako kot gibereline (300 ml 80% metanola za 150 semen, 3x 24 ur pri + 3°C, uparjanje do vodne faze pri + 30°C). Vodno fazo smo centrifugirali 1,5 ure pri 16.000 G in 0°C, s centrifugo Janetzki K 24. Supernatant smo previdno prefiltrirali in filter papir sprali s 5 ml distilirane vode. Filtrat smo umerili na pH 2,5 z 0,1 N HCl in ga stresali 15 minut s trikratnim volumnom etil acetata. Z lijem ločnikom smo ločili etil acetat od vode in etil acetat zavrgli. Vodo smo umerili na pH 7,0 z 0,1 M KOH in jo stresali 15 minut s štirikratnim volumnom z vodo nasičenega n-butanola. Obe fazi smo ločili v liju ločniku (24 ur pri + 3°C). Butanolovo in vodno fazo smo vsako posebej odparili z rotavaporjem pri + 40°C in ekstrakta shranili pri - 15°C.

2.6.2. Papirna kromatografija

Vodni ali n-butanolov ekstrakt smo povzeli s 35 % etanolom (1 ml + 0,2 ml + 0,2 ml) in nanesli ekvivalent 50. semen na 4 cm širok kromatografski papir Whatman 3 MM. Kromatogram smo ekvilibrirali 6 ur nad topilom izopropanol: amoniak (25%): voda (10:1:1) in ga v istem topilu razvili do višine 20 cm. Kromatogram z nanešenim butanolovim ekstraktom se je razvijal 9 - 11 ur, kromatogram z nanešenim vodnim ekstraktom pa 10 - 13 ur.

2.7. Biotest na citokinine

Citokininsko aktivnost smo ugotavljali s spremenjenim biotestom s sojinim kalusom (Miller, 1967). Sojin kalus (*Glycine max.*/L./Murill cy.Acme) je bil pred testiranjem vzorcev gojen na gojišču po Millerju, ki mu je bil dodan kinetin (1 mg/l), v temi pri + 25°C. Za biotest smo uporabljali 3 - 6 tednov stare kalusne kulture.

Dele kromatograma, ki so ustrezali določenim Rf vrednostim kromatograma, smo namestili v epruvete (premer 2,5 cm, dolžina 16 cm) in nanje nalili 10 ml podlage brez kinetina. Ob vsakem biotestu kromatograma smo za kvantitativno primerjavo opravili tudi biotest različnih koncentracij kinetina (1, 3, 10, 30, 100 $\mu\text{g Kin/l}$) in biotest kontrol brez kinetina. V epruvete s kinetinom in brez njega smo dodali enak košček čistega kromatografskega papirja, kot so ga vsebovale epruvete z jelovim ekstraktom.

Epruvete z gojiščem smo zamašili z vato in jih prekrili z aluminijevo folijo. Avtoklavirali smo jih 12 minut pri 14,7 N in 120 °C .

V vsako sterilizirano epruveto smo v sterilni komori cepili pribl. 100 mg sojinega kalusa. Kalusne kulture so rasle 28 dni v temi pri + 25°C , nato smo sveže kaluse stehtali z natančnostjo 10⁻⁴ g.

Vsak biotest smo izvedli z ekvivalentom 50. semen in smo ga opravili v 3. ponovitvah . Kontrole brez kinetina smo opravili v 5. ponovitvah, s kinetinom pa v 4. ponovitvah.

Rezultate navajamo v odstotkih prirastka soje, ki smo jo gojili brez kinetina.

Podatke smo statistično obdelali z analizo variance.

3. REZULTATI

3.1. Kalitev

Slika 2 prikazuje kalitev jelovih semen v začetnem in končnem obdobju dela. Kalivost stratificiranih semen se je v tem času znižala za pribl. 20%, kalivost nestratificiranih semen je ostala enaka. Dinamika kalitve se je le malo spremenila.

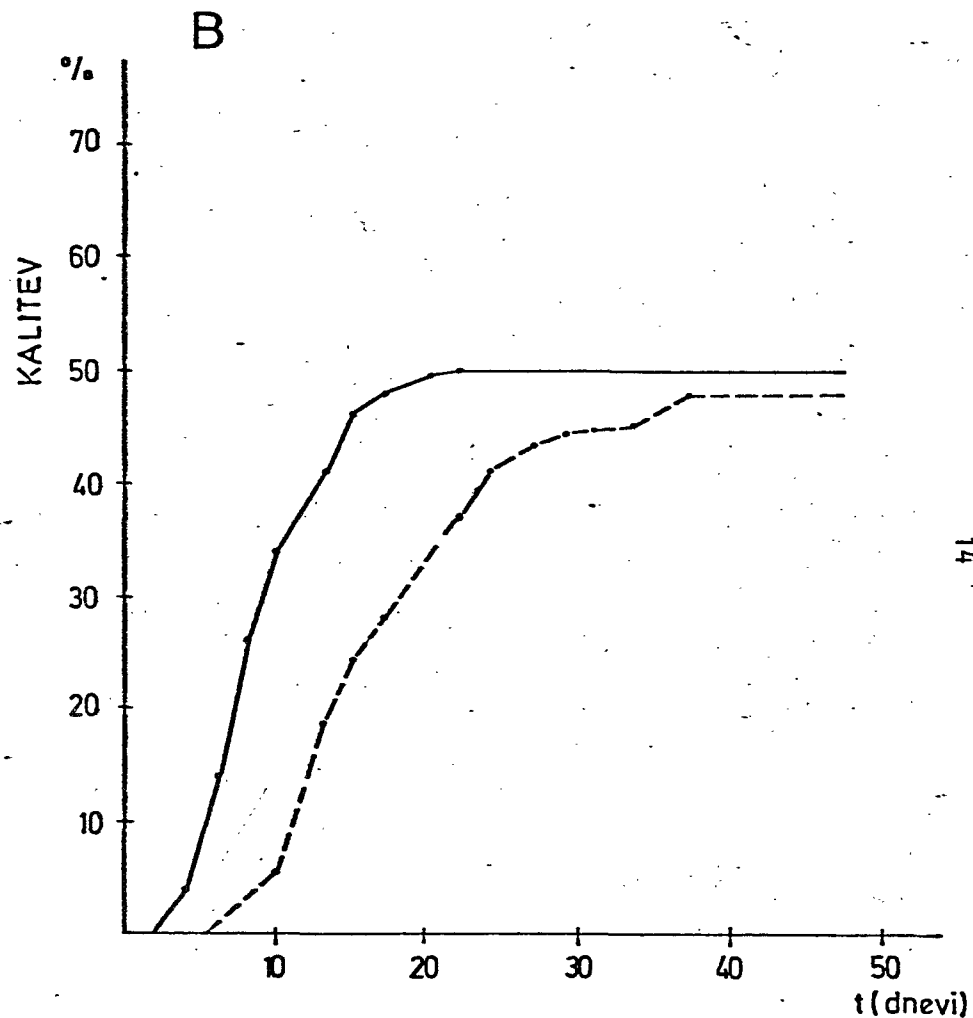
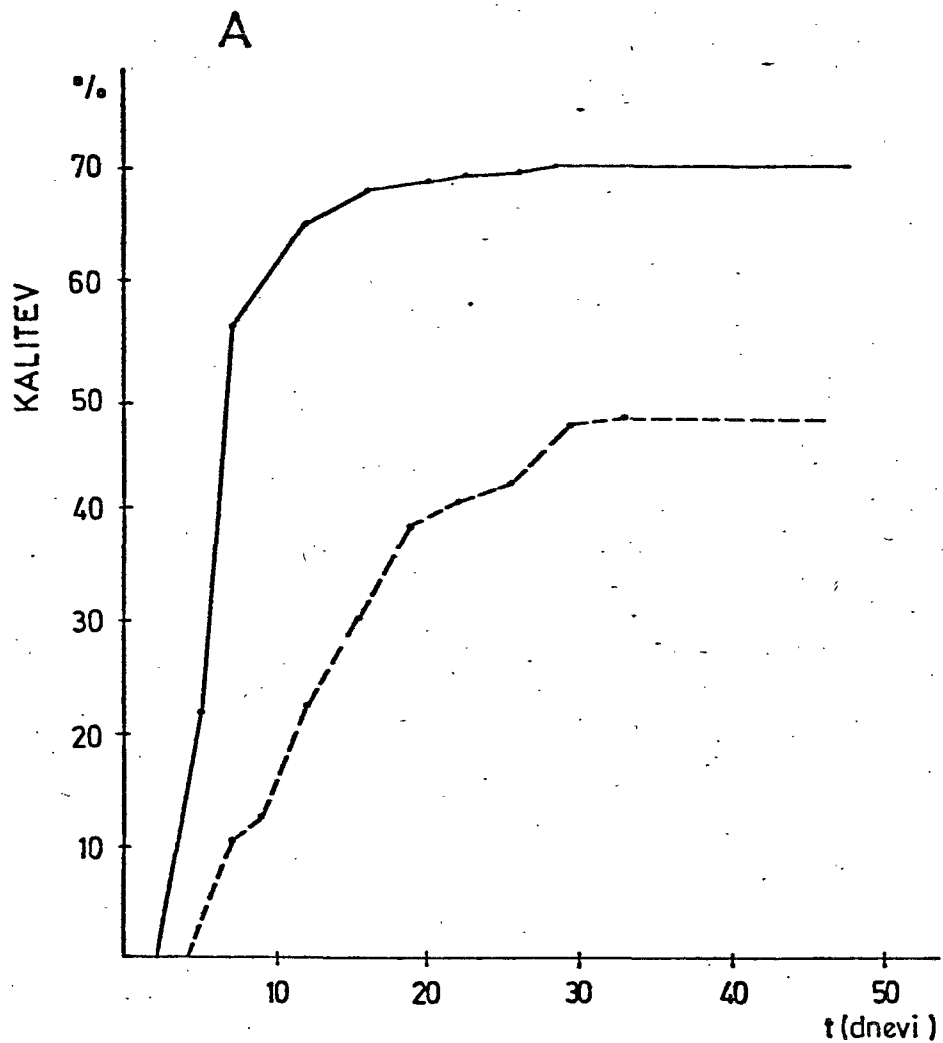
3.2. Giberelinska aktivnost

Slike 3, 4 in 5 prikazujejo giberelinsko aktivnost v različnih obdobjih kalitve. Snovi z giberelinsko aktivnostjo so na treh odsekih kromatograma in to na Rf 0,4; Rf 0,7 - 0,8 in Rf 1,0. Aktivnost na Rf 0,7 - 0,8 ni ostro omejena na ta odsek, ampak jo lahko ugotovimo tudi na Rf 0,6 in 0,9. Pri analizi rezultatov smo upoštevali le odsek Rf 0,7 - 0,8, zato, ker je na tem mestu aktivnost največja in bi poprečna vrednost vseh štirih Rf odsekov z giberelinsko aktivnostjo prikazala manjšo aktivnost, kot je resnična.

V stratificiranih semenih je giberelinska aktivnost vseh treh aktivnih snovi v nekaterih obdobjih kalitve signifikantno višja od kontrol brez GA₃. Pri nestratificiranih semenih sta signifikantno višji aktivnosti na Rf 0,7 - 0,8 in Rf 1,0, na Rf 0,4 pa razlika ni signifikantna.

Največjo giberelinsko aktivnost kaže snov na Rf 0,6 - 0,9, manjšo tista na Rf 1,0, najmanjšo pa snov na Rf 0,4.

Sliki 6 in 7 prikazujeta spreminjanje giberelinske aktivnosti snovi na posameznih odsekih kromatograma v različnih obdobjih kalitve stratificiranih in nestratificiranih semen. Največjo giberelinsko aktivnost v stratificiranih semenih smo ugotovili v semenih, ki so bila po 3 tedenski stratifikaciji 2 dni gojena pri sobni temperaturi. (Slika 6, Rf 0,7 - 0,8 in Rf 1,0), to je tik pred kalitvijo.



Slika 2 : Rektificirana kalitev stratificiranih (————) in nestratificiranih (-----) jelovih semen (Papuk 1980).

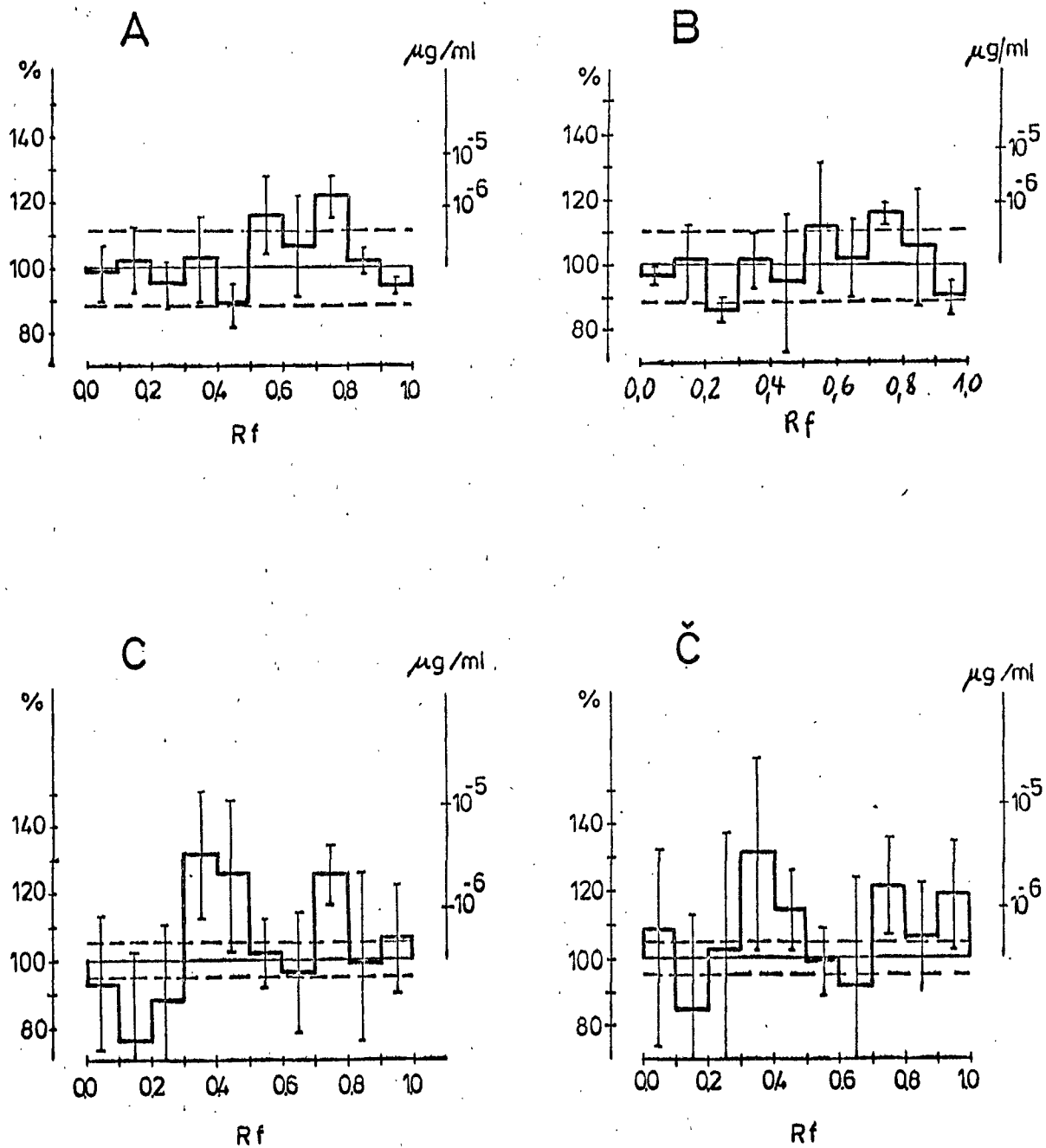
A - test na kalivost smo pričeli 28.1.1981 (začetno obdobje dela)

B - test na kalivost smo pričeli 2.3.1982 (končno obdobje dela)

Slike 3,4,5

Endogena giberelinska aktivnost v jelovih semenih.

Vsak histogram predstavlja ekvivalent 50. semen. Ekstrakt je bil očiščen po spremenjeni metodi Oegama in Fletcher (1972), razvit je bil na kromatografskem papirju Whatman št.1 s topilom izopropanol : voda (4 : 1). Gibberelinska aktivnost je bila ugotovljena s spremenjenim biotestom na ječmenov endosperm (Nicholls in Paleg, 1963). Vrednosti 10^{-6} , 10^{-5} in 10^{-4} $\mu\text{g/ml}$ so standardi z GA3. Vrednosti na ordinati so količine reducirajočih sladkorjev, izražene v odstotkih kontrole. Vodoravni prekinjeni črti pod in nad 100% prikazujeta interval zaupanja s 5% stopnjo tveganja (4 ali 5 ponovitev). Navpična črta pri vsaki Rf prikazuje interval zaupanja s 5% stopnjo tveganja (2 ali 3 ponovitve).



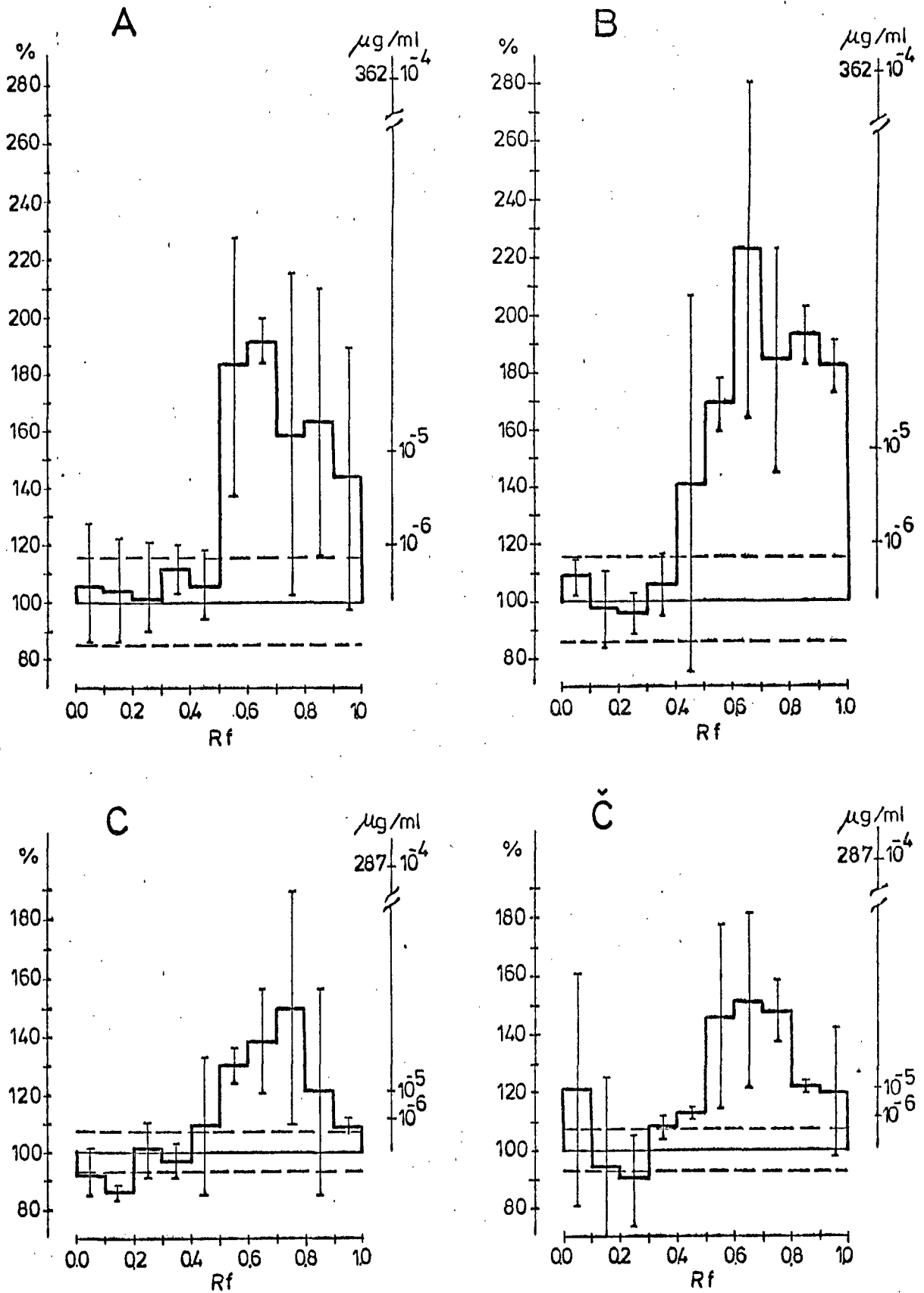
Slika 31 : Histogrami giberelinske aktivnosti v jelovih semenih, ki so bila:

A - suha

B - 1 dan namočena pri + 3°C

C - 7 dni stratificirana pri + 3°C

Č - 14 dni " " "



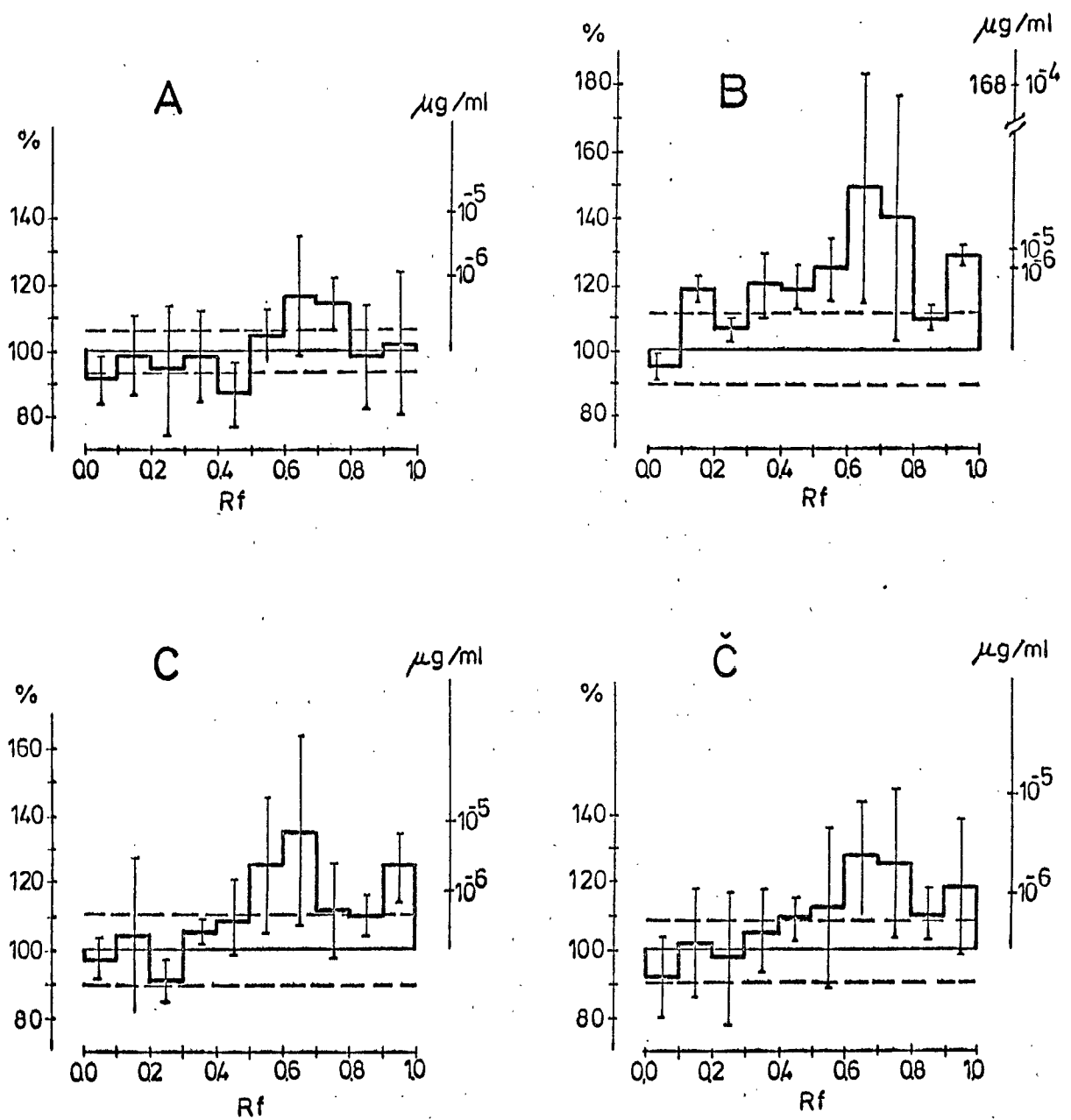
Slika 4 : Histogrami giberelinske aktivnosti v jelovih semenih, ki so bila:

A - 21 dni stratificirana pri + 3°C

B - 21 dni " " " , nato 2 dni gojena pri +25°C

C - 21 dni " " " , nato 4 dni " " "

Č - 21 dni " " " , nato 6 dni " " "



Slika 5 : Histogrami giberelinske aktivnosti v jelovih semenih, ki so bila :

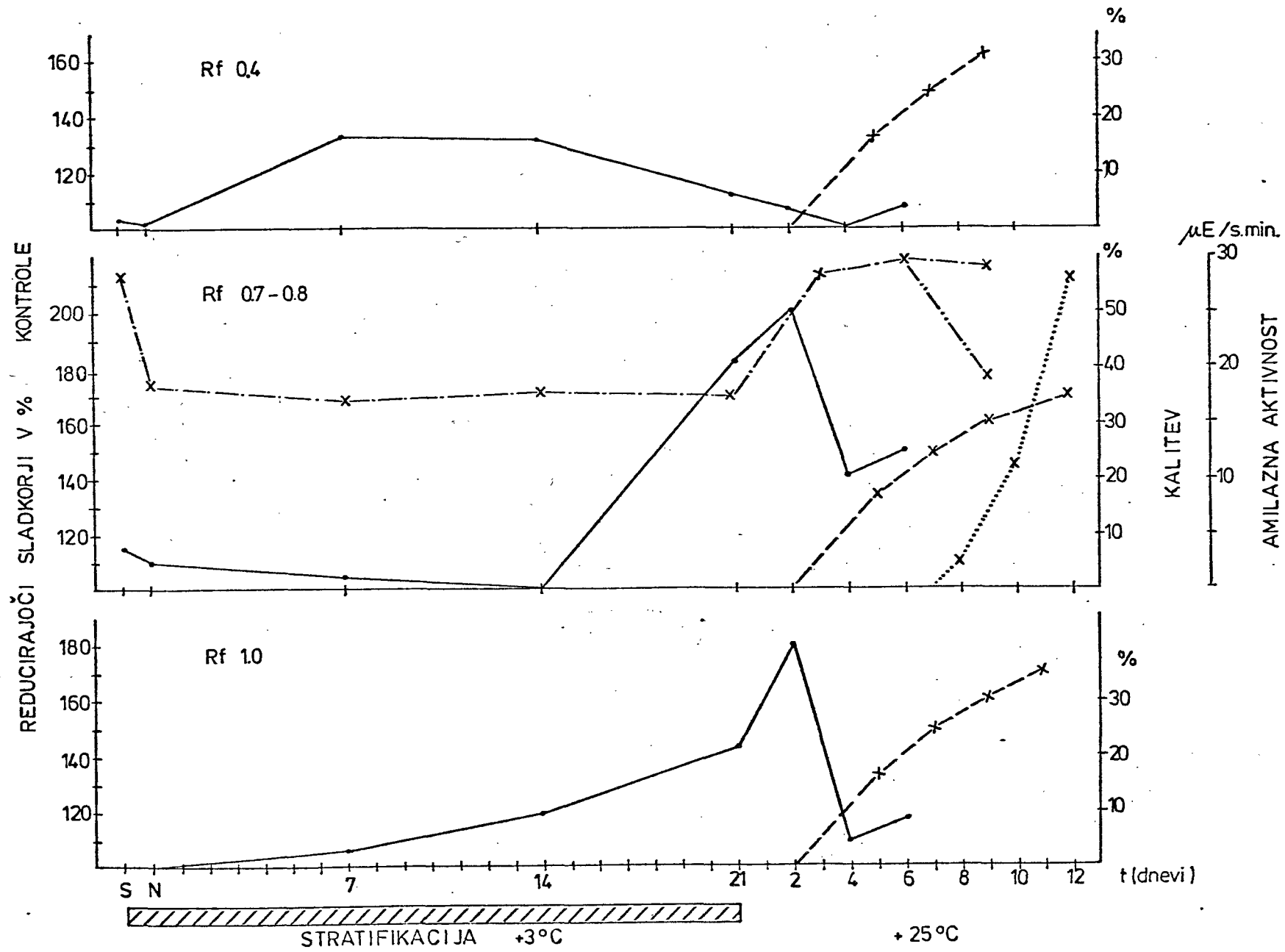
- A - 1 dan namočena pri $+ 25^{\circ}\text{C}$
- B - 3 dni gojena pri $+ 25^{\circ}\text{C}$
- C - 6 dni " " "
- Č - 9 dni " " "

Slika 6 :

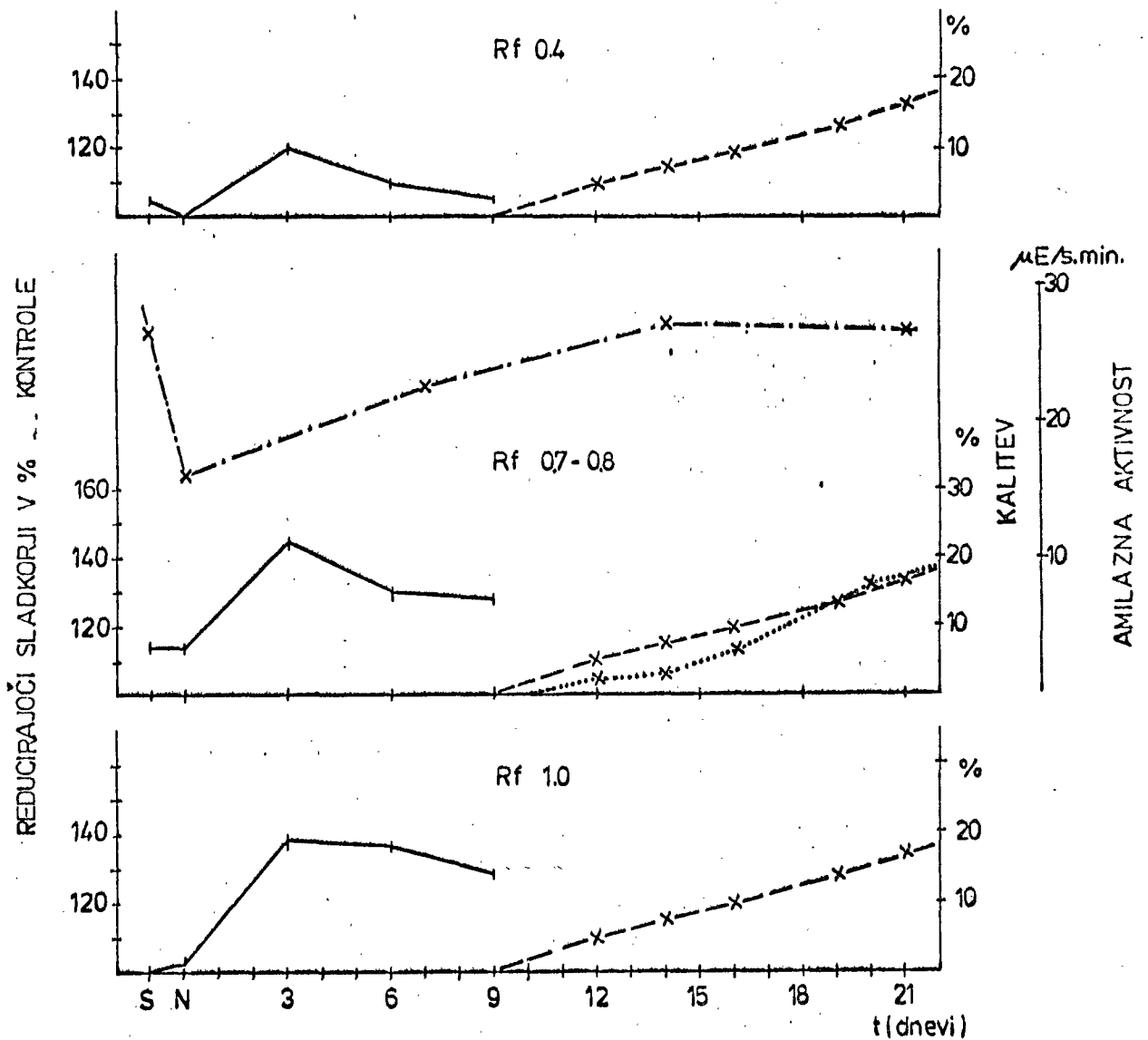
Združeni podatki giberelinske aktivnosti snovi na določeni Rf vrednosti in aktivnost α -amilaz v različnih obdobjih kalitve stratificiranih semen.

Legenda:

—————	giberelinska aktivnost
-----	kalitev semen, v katerih je bila merjena giberelinska aktivnost
-----	aktivnost α -amilaz v nekalečih, a kalitve sposobnih semenih
-----	aktivnost α -amilaz v kalečih semenih
.....	kalitev semen, v katerih je bila merjena amilazna aktivnost
S	suha semena
N	1 dan namočena semena (+ 3°C)



Slika 6



Slika 7: Združeni podatki giberelinske aktivnosti snovi na določeni Rf vrednosti in aktivnost \mathcal{L} - amilaz v različnih obdobjih kalitve nestratificiranih semen

(Legenda je enaka kot pri sliki 4, razen oznake N - 1 dan namočena semena /+25°C/)

Zanimivo je variiranje aktivnosti na Rf 0,4, saj krivulja kaže obraten potek - ko je aktivnost snovi na Rf 0,7 - 0,8 in Rf 1,0 majhna, je aktivnost snovi na Rf 0,4 največja, nato pa upada z naraščanjem aktivnosti drugih dveh snovi.

Ali ugotovljeno spreminjanje aktivnosti snovi na Rf 0,4 v suhih in 1. dan namočenih semen prikazuje resnično aktivnost teh snovi v semenu je vprašljivo, kajti v bližini tega območja na kromatogramu je opazna najmočnejša inhibicija. Znano je, da abscizinska kislina zavira sintezo α -amilaz (Walton, 1980), na amilazni aktivnosti pa temelji ugotavljanje giberelinske aktivnosti v biotestu z ječmenovim endospermom. Inhibitorji med stratifikacijo jelovih semen od visokih vrednosti v začetku počasi izginjajo (Vardjan, 1978) in morda v začetnih obdobjih kalitve preprečujejo detekcijo giberelinske aktivnosti snovi na Rf 0,4. Morda seme med stratifikacijo ne sintetizira giberelinov, ampak jih sprošča iz manj aktivnih vezanih kompleksov.

V nestratificiranih semenih (slika 7) dosežejo giberelinske aktivnosti vrh 3. dan po namakanju semen, kar je približno 1 teden pred kalitvijo. Aktivnost posameznih snovi dosega pribl. polovico aktivnosti istih snovi v stratificiranih semenih.

Na sliki 6 in 7 so vrisane tudi spremembe aktivnosti α -amilaz med kalitvijo stratificiranih in nestratificiranih semen (Jurc, 1977).

3.3. Citokininska aktivnost

Slika 8 prikazuje citokininsko aktivnost v butanolovi in vodni fazi ekstrakta stratificiranih jelovih semen. V obdobjih, v katerih smo ugotavljali citokininsko aktivnost le-ta ne doseže vrha. Najvišja aktivnost je v butanolovi fazi na Rf 0,5, manjša, nesignifikantno višja od kontrol, pa na Rf 0,1; Rf 0,2; Rf 0,8 in Rf 1,0. V vodni fazi ni snovi z izrazito citokininsko aktivnostjo. Aktivnost na Rf 0,5

Sliki 8, 9:

Endogena citokininska aktivnost v jelovih semenih.

Vsak histogram predstavlja ekvivalent 50. semen. Ekstrakt je bil očiščen po spremenjeni metodi Brown in Van Staden (1973), razvit je bil na kromatografskem papirju Whatman 3MM, s topilom izopropanol : amoniak (25%) : voda (10:1:1). Cito-kininska aktivnost je bila ugotovljena s spremenjenim biotestom s sojinim kalusom (Miller, 1967). Vrednosti 1, 3, 10 $\mu\text{g/l}$ so standardi s kinetinom. Vrednosti na ordinati so prirastki sojinega kalusa v odstotkih kontrole. Vodoravni prekinjeni črti pod in nad 100% prikazujeta interval zaupanja s 5% stopnjo tveganja (5 ponovitev). Navpična črta pri vsaki Rf vrednosti prikazuje interval zaupanja s 5% stopnjo tveganja (3 ponovitve).

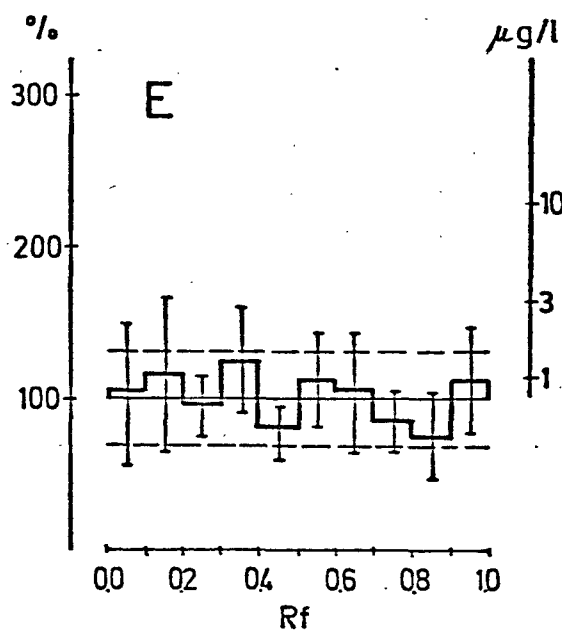
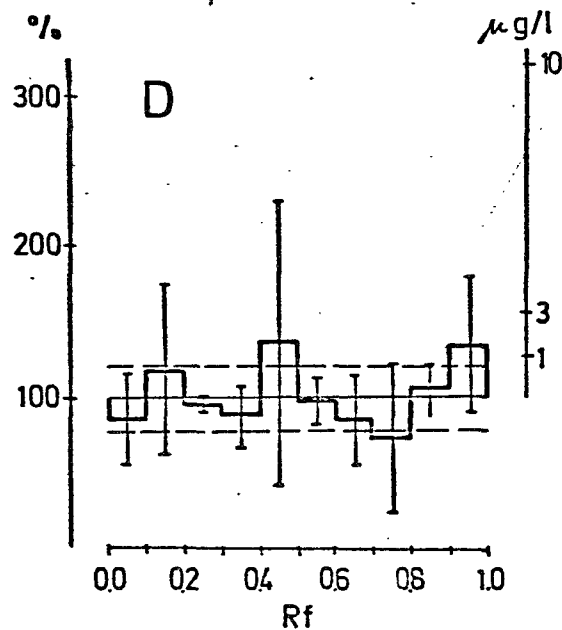
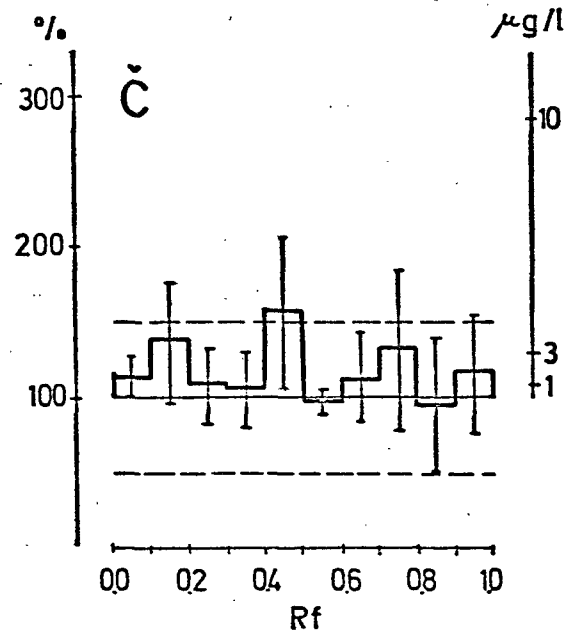
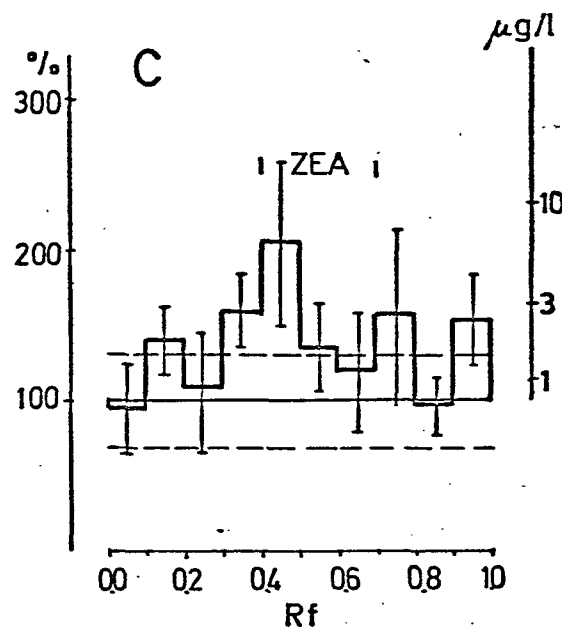
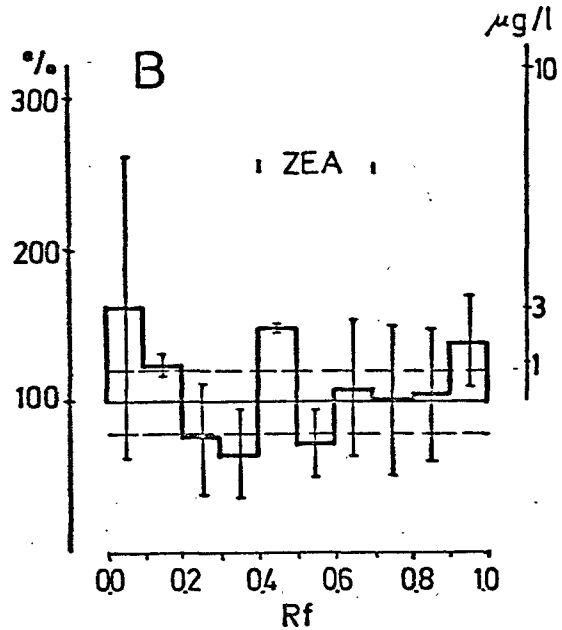
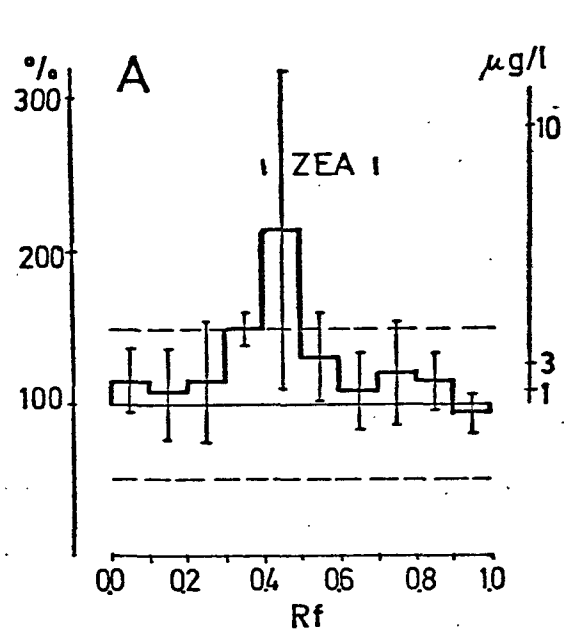
Slika 8 :

Histogrami citokininske aktivnosti v n-butanolovi fazi ekstrakta jelovih semen , ki so bila:

A - 1 teden stratificirana pri + 3 ^o C		
B - 2 tedna	"	"
C - 3 tedne	"	"

Histogrami citokininske aktivnosti v vodni fazi ekstrakta jelovih semen, ki so bila:

Č - 1 teden stratificirana pri + 3 ^o C		
D - 2 tedna	"	"
E - 3 tedne	"	"



je nizka in ni signifikantno višja od aktivnosti kontrol brez kinetina.

Citokininska aktivnost butanolovega ekstrakta nestratificiranih semen (slika 9) doseže najvišje vrednosti v semenih, ki so bila 9 dni gojena pri $+ 25^{\circ}\text{C}$, to je 6 dni po vrhu giberelinske aktivnosti in sočasno s pričetkom kalitve. V teh semenih je aktivnost signifikantno višja od aktivnosti kontrol. V nestratificiranih semenih je citokininska aktivnost višja kot v stratificiranih. *

Razvit kromatogram zeatina je pokazal najvišjo citokininsko aktivnost na Rf 0,6 (slika 10).

Zeatin reagira v biotestu s sojinim kalusom v nizkih koncentracijah bolje kot kinetin, v visokih pa le malo slabše (slika 10).

Z biotestom razvitega kromatograma, na katerega nismo nanegli ekstrakta semen, smo ugotovili rahel inhibicijski vpliv kromatografskega papirja ali mobilne faze (diagram 10).

*

Zaradi pomanjkanja časa nismo uspeli izvesti toliko biotestov, kot pri ugotavljanju giberelinske aktivnosti. Ne glede na zaključek naloge pa bomo, zaradi pomembnosti manjkajočih rezultatov, izvedli še 3 bioteste aktivnosti citokininov.

Slika 9 :

Histogrami citokininske aktivnosti v n-butanolovi fazi ekstrakta
jelovih semen, ki so bila:

A - 6 dni gojena pri + 25°C

B - 9 dni " "

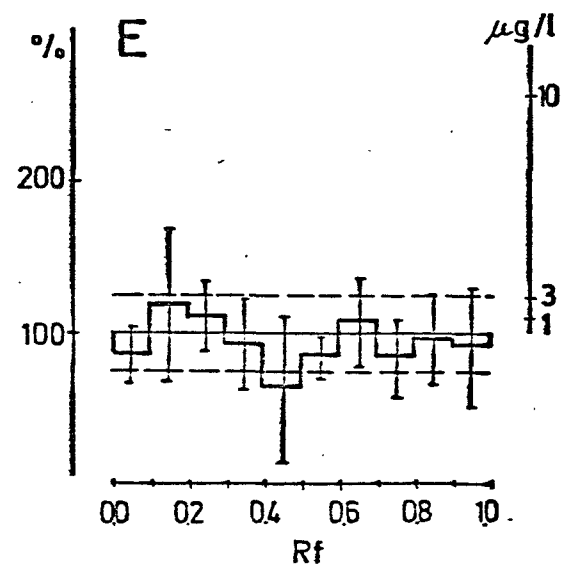
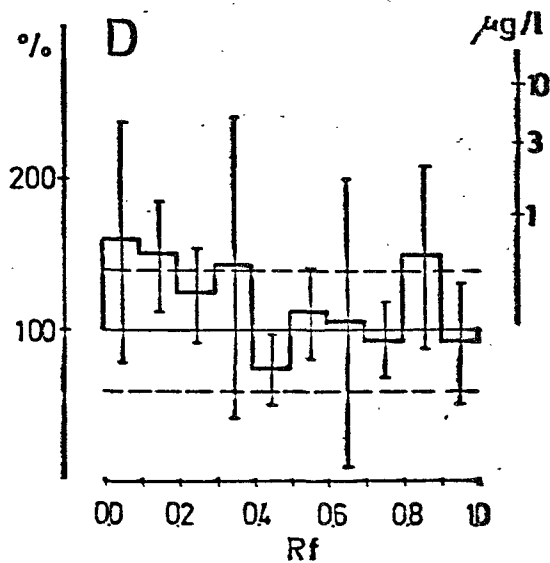
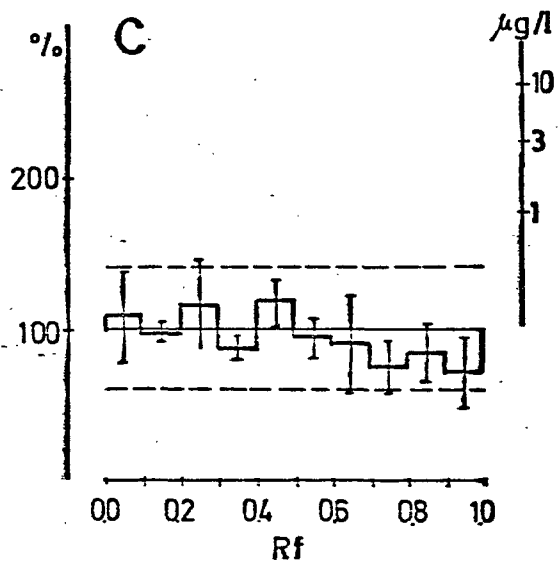
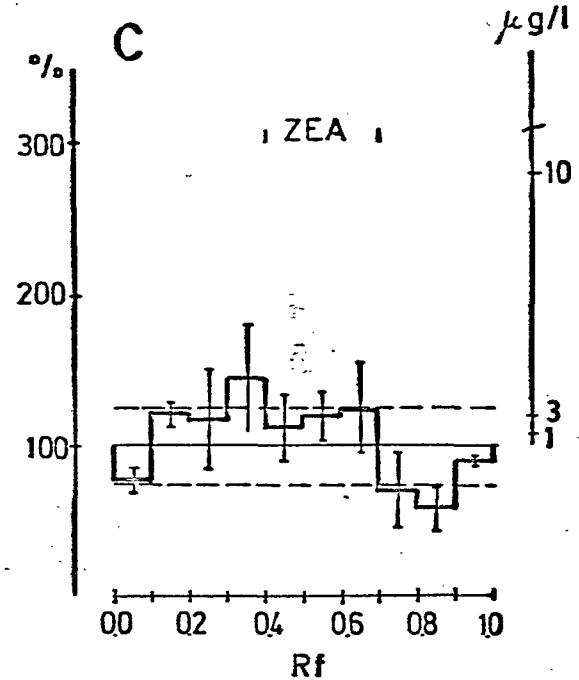
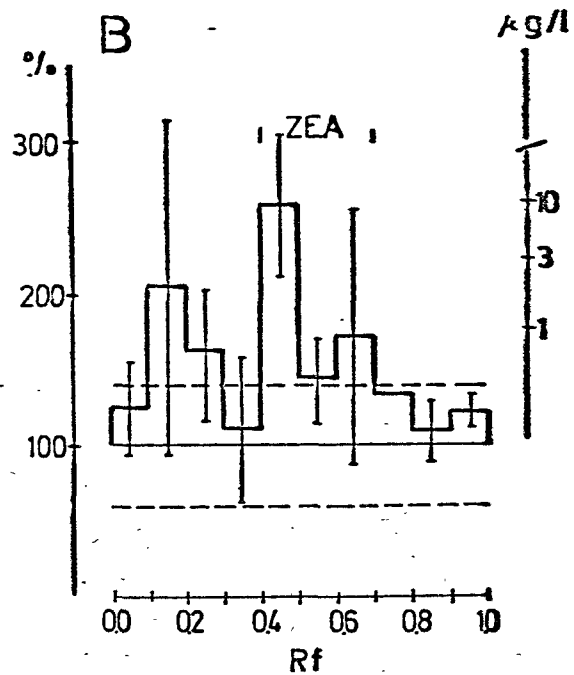
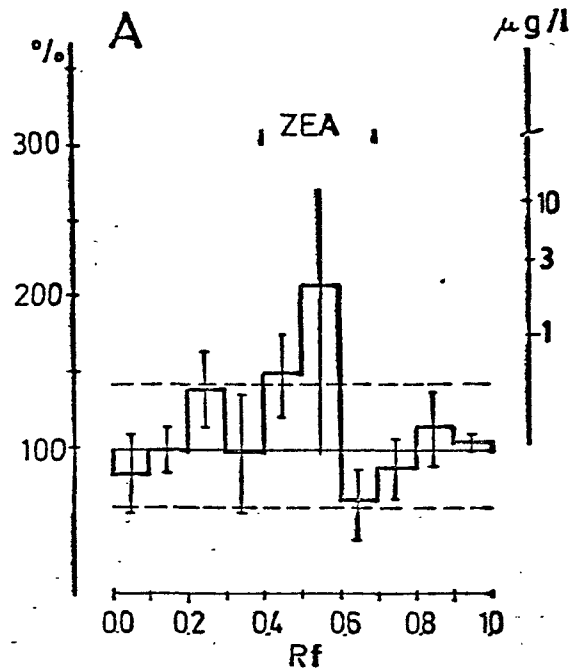
C - 12 dni " "

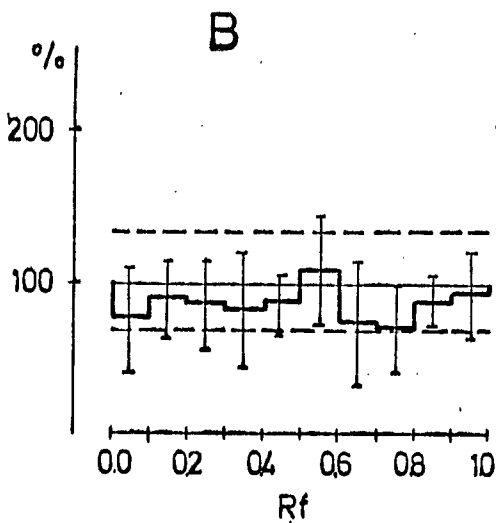
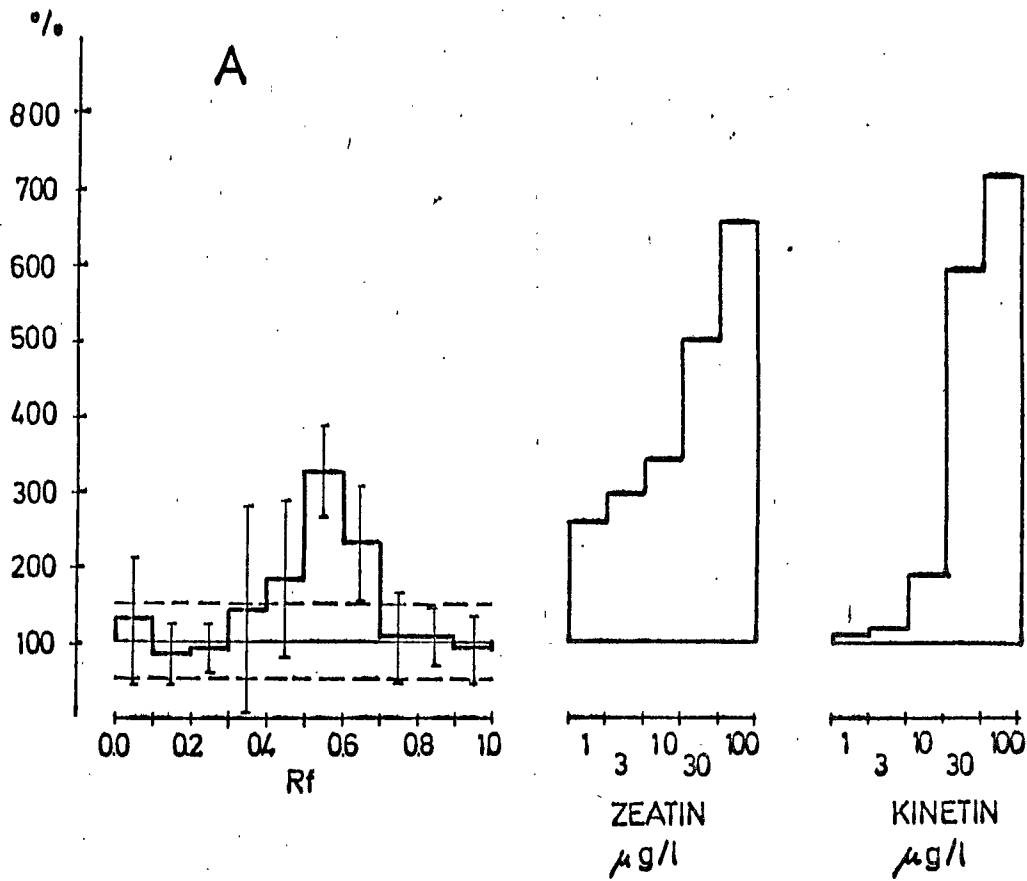
Histogrami citokininske aktivnosti v vodni fazi ekstrakta
jelovih semen , ki so bila:

Č - 6 dni gojena pri + 25°C

D - 9 dni " "

E - 12 dni " "





Slika 10 : A - Kromatografija 0,125 µg zeatina in histograma kontrol z zeatinom in kinetinom
 B - Kromatografija čistega kromatografskega papirja

4. DISKUSIJA

Različne provenience jelovih semen imajo različno stopnjo dormantnosti, isto lahko opazimo tudi pri semenih različnih semenskih let iste provenience (Vardjan, 1978, Horvat-Marolt, 1979). V primerjavi z rezultati kalitve jelovih semen pri drugih avtorjih (Mučalo in Regent, 1966, Vardjan, 1978 in Horvat-Marolt, 1979) imajo semena iz Papuka kratek latentni čas, razlika v dinamiki kalitve med stratificiranimi in nestratificiranimi semeni pa je majhna. Efekt stratifikacije se pri semenih, s katerimi smo delali, kaže po 1,5 letnem shranjevanju le v boljši dinamiki kalitve, ne pa tudi v boljši končni kapaciteti.

V nestratificiranih semenih je aktivnost inhibitorjev največja takoj po namakanju (Vardjan, 1978), giberelinska aktivnost doseže vrh po 3. dneh, citokininska pa po 9. dneh, ko prične kalitev.

V stratificiranih semenih inhibitorji od visokih aktivnosti takoj po namakanju postopoma izginjajo (Vardjan, 1978), narašča pa giberelinska aktivnost. Po prenosu semena na sobno temperaturo doseže giberelinska aktivnost vrh in kalitev semen sledi najvišji giberelinski aktivnosti snovi na Rf 0,7 - 0,8 in Rf 1,0. Po analogiji z nestratificiranimi semeni lahko pričakujemo sočasno s kalitvijo tudi vrh aktivnosti citokininov (analiza citokininske aktivnosti v tem obdobju na žalost še ni izvršena).

Naraščanje giberelinske aktivnosti med stratifikacijo so zasledili številni avtorji. V semenih *Tilia platyphyllos* narašča giberelinska aktivnost od 6. tedna in doseže vrh 12 teden stratifikacije (Nagy, 1980), v stratificiranih semenih *Pinus taeda* narašča od 4. do 8. tedna (Paul in sod., 1973), v semenih *Pinus lambertiana* narašča prav tako od 4. do 8. tedna (Taylor in Wareing, 1978 a), v semenih *Acer platanoides* doseže giberelinska aktivnost vrh po 80. dneh stratifikacije (Tomaszewska, 1976). Naši rezultati giberelinske aktivnosti se vključujejo v navedene.

Tudi citokininska aktivnost med stratifikacijo navadno narašča. V semenih *Acer pseudoplatanus* je najvišja 20. dan stratifikacije (Julin-Tegelman in Pinfield, 1982), v semenih *Protea compacta* 30. dan (Brown in Van Staden, 1973), v semenih *Leucadendron daphnoides* 60. dan (Brown in Van Staden, 1973). Med tritedensko stratifikacijo v jelovih semenih nismo ugotovili vrha citokininske aktivnosti, ugotovili pa smo ga sočasno z začetkom kalitve nestratificiranih semen. V semenih *Acer pseudoplatanus* je bil poleg vrha aktivnosti med stratifikacijo ugotovljen tudi vrh citokininske aktivnosti ob kalitvi (Julin-Tegelman in Pinfield, 1982). Avtorja domnevata, da je ta citokininska aktivnost povezana z rastjo korenice.

Doslej je bilo opravljenih le malo raziskav, ki bi zasledovale aktivnost različnih hormonov v semenih istih vrst. Tomaszewska (1976) je proučila spremembe aktivnosti štirih skupin hormonov v semenih *Acer platanoides*. ABA izgine med stratifikacijo v 30. dneh, citokinini dosežejo vrh 30. dan, giberelini 80. dan, auksini pa 117. dan, ko prične kalitev. Enako zaporedje aktivnosti ABA, citokininov in giberelinov so ugotovili Wareing in sod. (1973) tudi v semenih *Acer saccharum*. V obeh primerih se citokininska aktivnost pojavi prej kot giberelinska, kar je obratno kot smo ugotovili v jelovem semenu.

V semenih jablane (Sinska in Lewak, 1970; Borkovska in Rudnicki, 1975, po Taylor in Wareing, 1979 a) je vrh giberelinske in citokininske aktivnosti sočasen - v 5. tednu stratifikacije.

Giberelinska aktivnost pa doseže vrh pred citokininsko v semenih *Picea sitchensis* (Taylor in Wareing, 1979 b), *Pinus lambertiana*, *Pseudotsuga menziesii* (Taylor in Wareing, 1979 a) in v jelovih semenih (vrh smo ugotovili le v nestratificiranih semenih). Kljub majhnemu številu raziskanih primerov pa različen potek aktivnosti aktivacijskih hormonov v primerjavi z listavci dopušča domnevo, da imajo iglavci drugačen mehanizem kontrole kalitve kot listavci.

Posamezna semena iste vrste lahko vsebujejo različne količine rastlinskih hormonov, zato nimajo enako globoke dormance (Khan, 1977). Aktivnost giberelinov je v stratificiranih semenih višja kot v nestratificiranih. Zunanji efekt stratifikacije je enotna in hitra kalitev semen, kajti semena postanejo med stratifikacijo fiziološko enotnejša. Rezultati giberelinske aktivnosti v stratificiranih semenih dopuščajo domnevo (omenjata jo Taylor in Wareing, 1979 a), da posamezna semena med stratifikacijo akumulirajo gibereline. Tako je v večjem številu semen, ob prenosu na temperaturo, ugodno za kalitev, visoka aktivnost giberelinov, kar vodi v hitro sinhronizirano kalitev.

Khanova teorija (Khan, 1971) o prekinitvi dormance je predvidela tudi kombinacijo hormonov, ki smo jo ugotovili v jelovih semenih in ki povzroči kalitev.

Mehanizma kontrole kalitve jelovih semen pa seveda ne smemo zožiti le na aktivnost hormonov. Številni so podatki, ki dokazujejo, da zavira kalitev jelovih semen testa (kemijska in mehanska ovira) in eterična olja v vseh delih semena. (Vardjan, 1978, Horvat-Marolt, 1979). Mehanizem s katerim vsi odločujoči dejavniki vplivajo na kalitev, je kompleksen in ga je zato težko v celoti pojasniti.

5. DODATEK

Analizo rastlinskih hormonov med kalitvijo jelovih semen smo ob pričetku dela nameravali izvesti drugače, kot navajamo v prvem delu poročila. Čiščenje in detekcija rastlinskih hormonov naj bi potekala po metodi, ki jo je za ugotavljanje hormonalne aktivnosti pri bukovih semenih uporabil El-Antably (1976). Prednosti te metode so predvsem v tem, da bi vse hormone pridobili iz istega ekstrakta in da bi ^z indol očetno kislino (IAA) in ^s abscizinsko kislino (ABA) določili s plinsko kromatografijo. Plinska kromatografija zagotavlja detekcijo točno določene kemične spojine, zazna manjše količine te snovi kot biotest in rezultati manj variirajo kot rezultati biotesta (Brenner, 1981). Isti avtor pa je tudi zapisal, da je uporaba biotestov, kljub njihovim pomanjkljivostim, vseeno primernejša kot uporaba nedodelanih fizikalno-kemijskih metod (npr. plinske kromatografije). Biotest pokaže biološko aktivnost snovi v vzorcu, ki je "podobna" aktivnosti snovi, ki jo želimo ugotoviti, medtem ko nedodelana fizikalno-kemijska metoda lahko zasledi neznane nečistoče v vzorcu.

Za preizkušanje te metode smo porabili približno polovico časa, ki smo ga načrtovali za izvedbo celotnega dela. Razlogi, ki so pripeljali do opustitve preizkusov s to metodo, so predvsem naslednji:

1. S plinsko kromatografijo nismo uspeli zaslediti tako majhnih količin ABA, kot smo jih predvideli v vzorcu in kakršne zasledijo v drugih laboratorijih.
2. V času, ki nam je preostal za končanje naloge, ne bi mogli izvesti vseh načrtovanih analiz, tudi, če bi z izboljšavami uspeli zaslediti ABA in IAA v vzorcu.
3. V laboratoriju, kjer smo delo izvajali, nimamo nekaterih aparatov (UV luč 254 nm, plinski kromatograf) in kemikalij (npr. za metiliranje vzorcev). Probleme smo imeli posebno takrat, ko so se pokvarile nekatere za delo nujno potrebne aparature (npr. spektrofotometer).

Popravilo aparatur in uvoz nekaterih kemikalij, ki bi jih hitro potrebovali zaradi izboljšav metodike, pa je trajalo nerazumljivo dolgo.

Kljub temu, da metoda ni dala pozitivnih končnih rezultatov, pa lahko preizkušene vmesne stopnje čiščenja uporabimo pri nadaljnjem delu z rastlinskimi hormoni. To je tudi razlog, da metodiko navajamo.

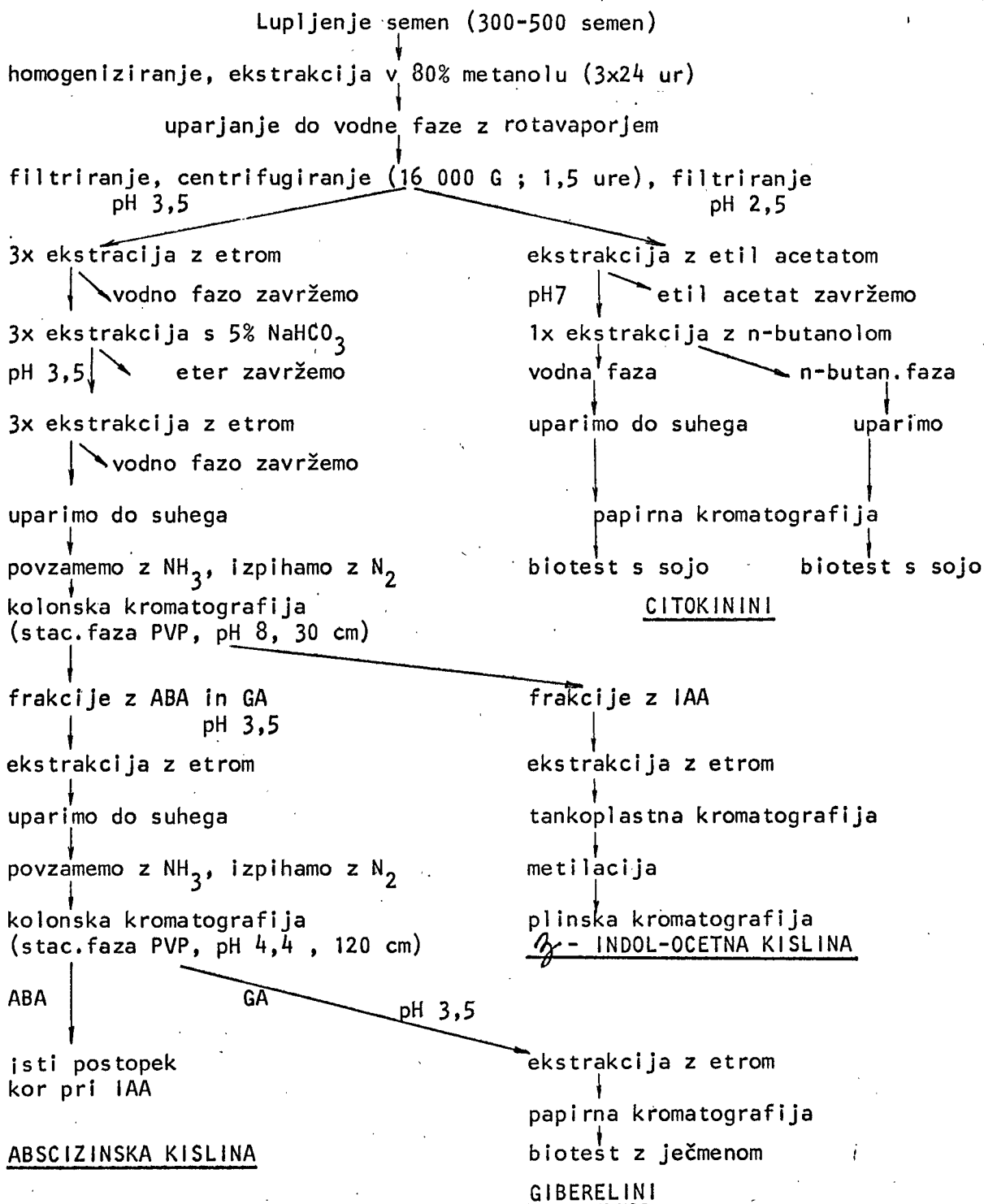
Celoten postopek ekstrakcije in čiščenja prikazuje Shema na strani 34, v tekstu navajamo le podatke, ki v shemi niso navedeni.

Za čiščenje in detekcijo citokininov smo uporabili enako metodo, kot jo opisujemo v prvem delu poročila. Vodni ekstrakt smo umerili na pH 3,5 z 0,1 N in 1 N HCl . Vsakokratna količina etra, 5% NaHCO₃ in nato zopet etra, je bila enaka količini vodnega ekstrakta. Eter smo uparili do suhega z rotavaporjem pri + 30°C . Suh ekstrakt smo povzeli s 5 ml 25% NH₃ in amoniak izpihali z dušikom. V raztopino smo dušik uvajali s stekleno cevko 10 - 15 minut (še nekaj minut po tem, ko nismo več zaznali vonja po amoniaku). Tako raztopljen ekstrakt smo nanесли na stekleno kolono, višine 30 cm in širine 1,9 cm (stacionarna faza netopni PVP , mobilna faza 0,1 M fosfatni pufer, pH 8), kot opisujejo Glenn in sod. (1972).

Polivinilpirolidon (Polyclar AT, insoluble, GAF) smo pred polnjenjem kolon 6 x sprali z večjo količino destilirane vode in vodo vsakič odlili, preden se je ves PVP nabral na dnu (s tem smo delno odstranili manjše delce PVP, ki zavirajo pretok skozi kolono. Kljub temu je bil pretok počasnejši, kot opisujejo Glenn in sod., ki so PVP presejali. S tem so odstranili delce, ki so bili manjši od 60 mesh. Hitrost pretoka ne vpliva na kvaliteto ločitve hormonov).

Pred nanosom vzorcev smo kolono ekvilibrirali z nekajkratnim volumnom mobilne faze. Na vrhu kolone smo namestili disk filtrirnega papirja, da se PVP ni mešal s pufrom.

HEMA EKSTRAKCIJE IN ČIŠČENJA JELOVEGA EKSTRAKTA



Kolono smo izpirali 6 ur in zbrali 30 frakcij po 10 ml.

Preden smo pričeli s čiščenjem jelovega ekstrakta, smo preizkusili kvaliteto ločitve hormonov na PVP koloni s tovarniško pripravljenimi hormoni (GA_3 , IAA, ABA). Na kolono smo nanegli raztopine 500 μ g vsakega hormona. Detekcijo hormonov v dobljenih 10 ml frakcijah smo izvedli s spektrofotometričnim merjenjem. ABA ima vrh absorpcije pri 245 nm, IAA pri 280 nm, za detekcijo GA_3 pa smo vsaki frakciji dodali 3 ml H_2SO_4 in merili pri 225 nm. GA_3 in ABA sta v frakcijah 7 - 11, IAA pa v frakcijah 15 - 28 (Slika 11).

Pred vsakim ponovnim kromatografiranjem ekstrakta smo iz kolone odstranili zgornjih 5 cm PVP in ga nadomestili s svežim. V zgornjem delu kolone se namreč vežejo fenoli.

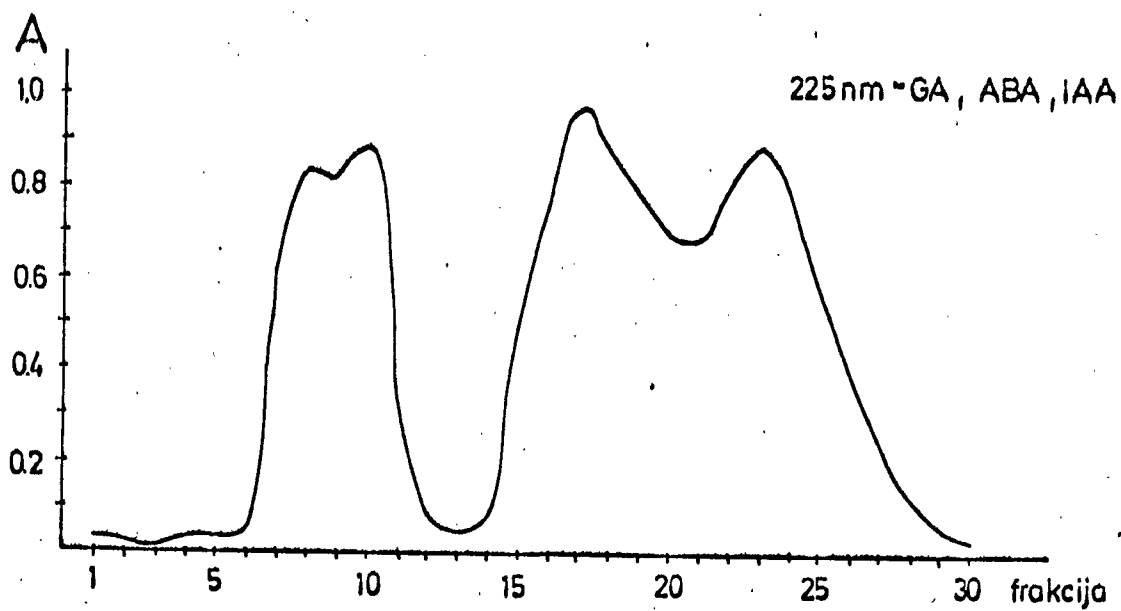
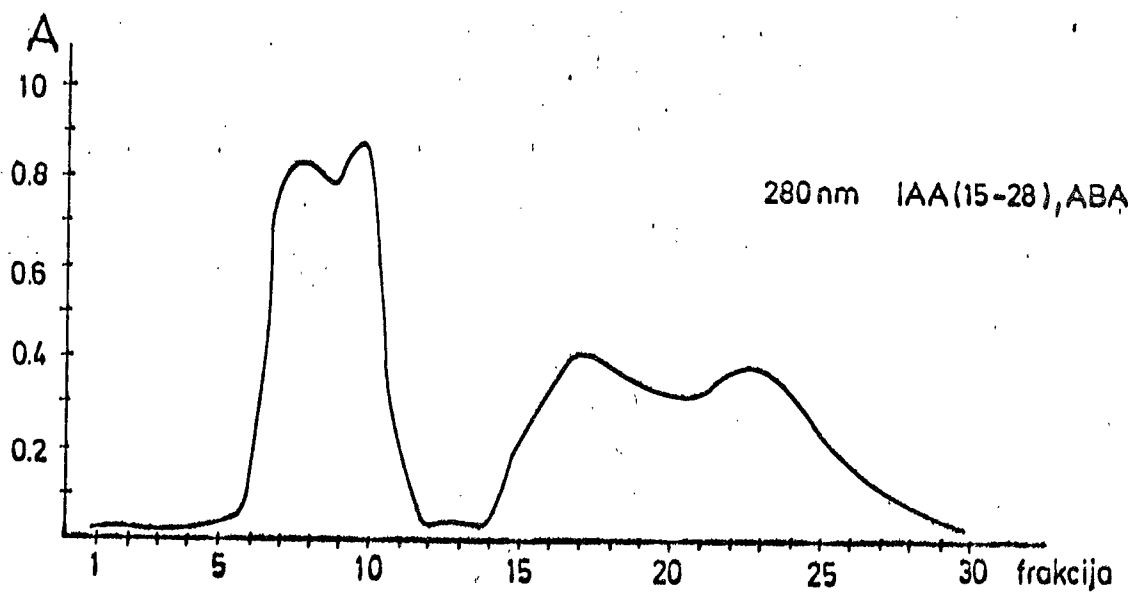
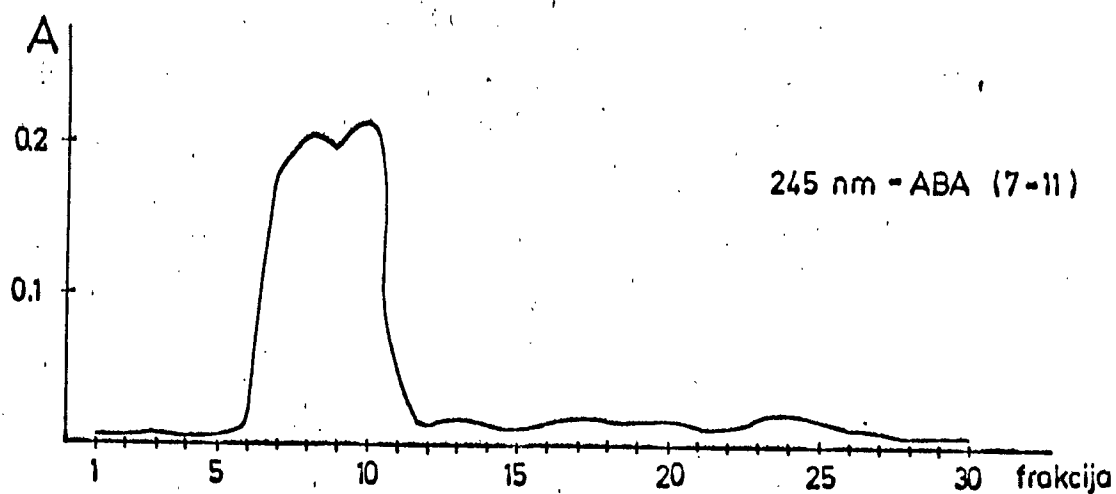
Frakcije z IAA smo nato čistili s tankoplastno kromatografijo, frakcije z ABA in gibberelini pa smo združili in jih umerili na pH 3,5 z 0,1 N HCl. Ekstrahirali smo jih z etrom in tega posušili z rotavaporjem pri + 30°C. Ekstrakt smo povzeli s 5 ml 25% NH_3 , izpihali amoniak z dušikom in nanegli na stekleno kolono dolžine 110 cm in širine 1,1 cm (stacionarna faza netopni PVP, mobilna faza 0,1 M pufer KH_2PO_4 - HCl, pH 4,4).

Kolono smo izpirali 15 ur in dobili 25 frakcij po 10 ml. Pred nanosom jelovega ekstrakta smo kromatografirali tovarniško pripravljeno ABA in GA_3 . Detekcijo ABA in GA_3 smo opravili enako kot pri prejšnji PVP koloni. ABA je bila v frakcijah 16 - 19, GA_3 je bila v frakcijah 12 - 14 (Slika 12).

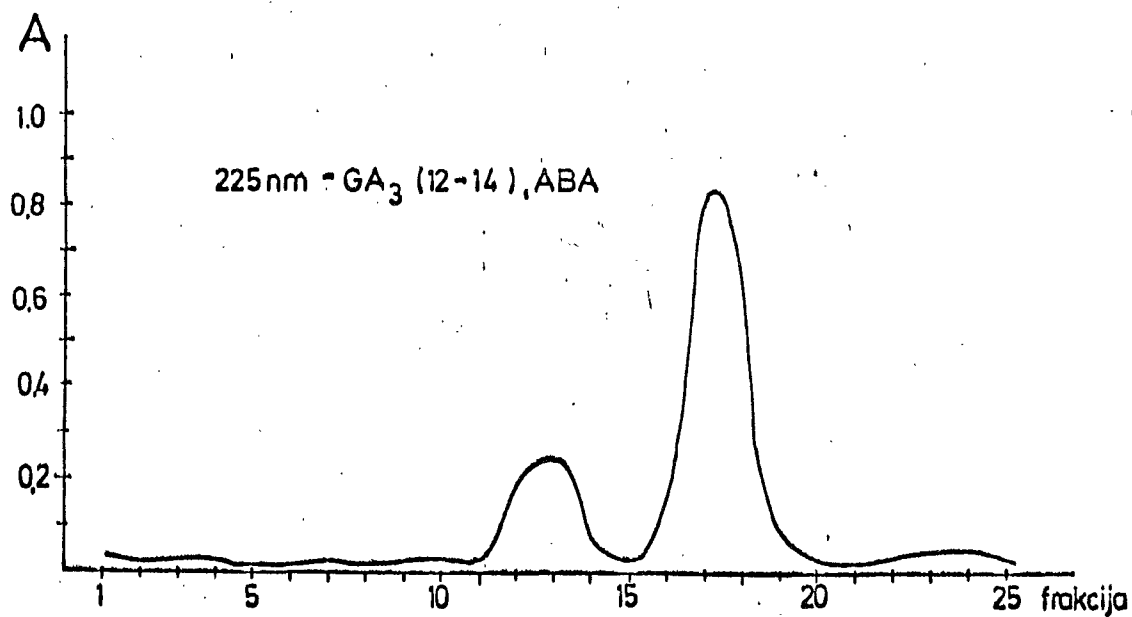
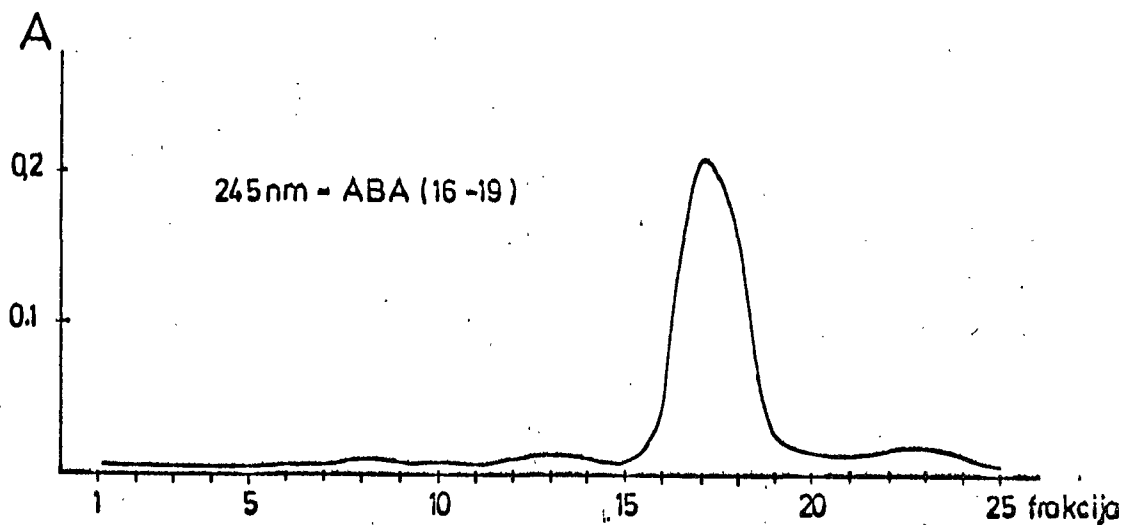
Frakcije iz prve PVP kolone, ki vsebujejo IAA in frakcije iz druge PVP kolone, ki vsebujejo ABA smo vsake posebej združili, umerili na pH 3,5 in ekstrahirali z etrom. Etrova ekstrakta smo z rotavaporjem

Slika 11 :

Ločitev hormonov na PVP koloni, dolžine 30 cm, mobilna faza fosfatni pufer, pH 8. Na ordinati je označena absorbcija pri določeni valovni dolžini, za merjenje pri 225 nm smo vsaki frakciji dodali 3 ml H_2SO_4 .



Slika 11



Slika 12 : Ločitev hormonov na PVP koloni, dolžine 110 cm, mobilna faza pufer $\text{KH}_2\text{PO}_4 - \text{HCl}$, pH 4,4. Na ordinati je označena absorbcija pri določeni valovni dolžini, za merjenje pri 225 nm smo vsaki frakciji dodali 3 ml H_2SO_4 .

osušili pri + 30°C . Povzeli smo ju z etanolom (0,5 ml + 0,2 ml + 0,2 ml) in nanegli na kromatografske plošče, prekrile s silikagelom GF 254 - Merck (25 x 25 cm, debelina silikagela 0,25 mm). Plošče smo pred tem 1 uro aktivirali pri 105°C . Na vsakem robu plošče smo nanegli standard z 2 - 3 µg IAA ali ABA v etanolu. Plošče smo razvili v topilu etil acetat : kloroform : očetna kislina (15:5:1). Lise s standardi ABA in IAA smo locirali pod UV lučjo z valovno dolžino 254 nm in označili ustrezna mesta kromatografiranega ekstrakta (na istem mestu kot 2-3 µg IAA je bila na kromatogramu ekstrakta lisa, ki je bila temnejša kot standard IAA, na mestu, kjer je bila lisa 2-3 µg ABA, pa je bila na kromatogramu ekstrakta lisa, ki je bila svetlejša kot standard ABA). Silikagel smo s teh mest ostrgali in ga 3 x eluirali z etanolom. Etanol smo odparili z rotavaporjem in posušen ekstrakt shranili pri - 15°C .

Fracije, ki smo jih dobili iz druge kolone in vsebujejo gibereline, smo združili, umerili na pH 3,5 , jih ekstrahirali z etrom ter eter odparili z rotavaporjem. Povzeli smo jih z etanolom in nanegli na papirni kromatogram. Papirno kromatografijo giberelinov in ječmenov biotest smo izvedli kot je opisano v prvem delu tega poročila.

Očiščene ekstrakte jelovega semena in tovarniško pripravljene ABA in IAA smo metilirali z diazometanom . Diazometan v etru je pripravil prof.dr.Miha Tišler, Fakulteta za naravoslovje in tehnologijo, za kar se mu zahvaljujemo.Po 16 urah pri sobni temperaturi smo eter odparili in vzorce analizirali s plinsko kromatografijo. Delo je izvedla dr. Leskovškova na Inštitutu Jožef Stefan. Tudi njej se najlepše zahvaljujemo za opravljen delo. Detekcija z diazometanom metilirane ABA in IAA ni uspela. Uspela pa je detekcija ABA s spremenjenim načinom metiliranja, vendar je občutljivost metode ostala premajhna (pribl. 100 µg ABA). Metode zato nismo mogli uporabiti za detekcijo teh hormonov v ekstraktu jelovih semen.

Celoten postopek ekstrakcije in čiščenja smo izvedli s suhimi semeni, semeni, ki so bila 10 dni gojena pri + 25°C in z 1 teden stratificiranimi semeni, nato pa smo po neuspeli detekciji hormonov s plinsko kromatografijo delo opustili. Čiščenje giberelinov v nadaljnjem delu

nismo opravili po opisani metodi zaradi dolgotrajnega postopka.

Naši rezultati potrjujejo literaturne podatke o uporabi PVP kolone: s to metodo odstranimo nečistoče v ekstraktu in dobro ločimo glavne skupine hormonov - gibereline, ABA in IAA .

6. L I T E R A T U R A:

1. BRENNER M.L. 1981: Modern methods for plant growth substance analysis. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 32, 511-538.
2. BROWN N.A.C., Van STADEN J. 1973: The effect of stratification on the endogenous cytokinin levels of seed of *Protea compacta* and *Leucaedendron daphnoides*. *Physiol. Plant.*, 28, 388-392.
3. COOMBE B.G., COHEN D., PALEG L.G., 1967 a: Barley endosperm bioassay for gibberellins. I. Parameters of the response system. *Plant Physiol.*, 42, 105-112.
4. COOMBE B.G., COHEN D., PALEG L.G., 1967 b: Barley endosperm bioassay for gibberellins. II. Application of the method. *Plant Physiol.* 42, 113-119.
5. EL-ANTABLY H.M.M., 1976: Changes in auxin, germination inhibitors, gibberellins and cytokinins during the breaking of seed dormancy in *Fagus sylvatica*. *Biochem. Physiol. Pflanzen*, 170, 51-58.
6. GLENN J.L., KUO C.C., DURLEY R.C., PHARIS R.P., 1972: Use of insoluble polyvinylpyrrolidone for purification of plant extracts and chromatography of plant hormones. *Phytochemistry*, 11, 345-351.
7. HORVAT-MAROLT S., 1979: Biologija semenitve v pragozdu in gospodarskem gozdu. Jelka - *Abies alba* Mill., Inštitut za gozdno in lesno gospodarstvo pri Biotehniški fakulteti v Ljubljani, Ljubljana, 43 str. (tipkopis)
8. JANN R.C., AMEN R.D., 1977: What is germination? v Khan A.A. (ed.) *The physiology and biochemistry of seed dormancy and germination*, North-Holland publishing company, Amsterdam, New York, Oxford, 7-25.
9. JULIN-TEGELMAN Å., PINFIELD N., 1982: Changes in the level of endogenous cytokinin - like substances in *Acer pseudo-platanus* embryos during stratification and germination. *Physiol. Plant.*, 54, 318-322.

10. JURC D., 1977: Amilaze v stratificiranih in nestratificiranih semenih jelke (*Abies alba* Mill.)
Diplomsko delo, Ljubljana, 22 str.(tipkopis)
11. KHAN A.A., 1971: Cytokinins: Permissive role in seed germination. *Science*, 171, 853-859.
12. KHAN A.A., 1977: Seed dormancy: changing concepts and theories, v *The physiology and biochemistry of seed dormancy and germination*. North-Holland publishing company, Amsterdam, New York, Oxford, 29-45.
13. MILLER C.O., 1967: Zeatin and zeatin riboside from a mycorrhizal fungus. *Science*, 157, 1055-1057.
14. MUČALO V., REGENT B., 1966: Stimuliranje klijavosti i energije klijanja semena obične jele i zelene duglazije pret-hodnim tretiranjem. Dokumentacija za tehnologiju i tehniku u šumarstvu. 54, 48 str.
15. NAGY M., 1980: Dormancy in fruits of *Tilia platyphyllos* scop. IV.Changes in the endogenous gibberellin content during stratification. *Acta Agron.Acad. Sci. Hungaricae*, 29, 1-11.
16. NICHOLLS P.B., PALEG L.G., 1963: Barley endosperm bioassay for gibberellins. *Nature*, 199, 823-824.
17. NIKOLAJEVA M.G., 1977: Factors controlling the seed dormancy pattern, v *The physiology and biochemistry of seed dormancy and germination*, North-Holland publishing company, Amsterdam, New York, Oxford, 51-71.
18. OEGAMA T., FLETCHER R.A., 1972: Factors that influence dormancy in milkweed seeds, *Canadian Journal of Botany*, 50, 712-718.
19. PALEG L.G., 1960: Physiological effects of gibberellic acid. I. On carbohydrate metabolism and amylase activity of barley endosperm. *Plant Physiology*, 35, 293-299.
20. PAUL K.B., PATEL C.S., BISWAS P.K., 1973: Changes in endogenous growth regulators in loblolly pine seeds during the process of stratification and germination. *Physiol.Plant.* 28, 530-534.

21. TAYLOR J.S., WAREING P.F., 1979 a: The effect of stratification on the endogenous levels of gibberellins and cytokinins in seeds of douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii* /Mirb./ Franco) and sugar pine (*Pinus lambertiana* Dougl.). *Plant, Cell and Environment*, 2, 165-171.
22. TAYLOR J.S., WAREING P.F., 1979 b: The effect of light on the endogenous levels of cytokinins and gibberellins in seeds of sitka spruce (*Picea sitchensis* Carriere). *Plant, Cell and Environment*, 2, 173-179.
23. THIMANN K.V., 1977: Prefatory chapter. v Khan A.A.(ed.) *The physiology and biochemistry of seed dormancy and germination*. North-Holland publishing company, Amsterdam, New York, Oxford, 1-4.
24. THOMAS T.H., 1977: Cytokinins, cytokinin-active compounds and seed germination, v *The physiology and biochemistry of seed dormancy and germination*. North-Holland publishing company, Amsterdam, New York, Oxford, 111-137.
25. TOMASZEWSKA E., 1976: Growth regulators in norway maple (*Acer platanoides* L.) seeds. *Arboretum Kornickie*, 21, 297-312.
26. VARDJAN M., 1978: Low viability and deterioration in storage of seeds of *Abies alba*. Final technical report. Ljubljana, 136 str. (tipkopis).
27. VARDJAN M., 1980: Kalitev in počitek semen. 2. "Spanje" semen., *Proteus*, 43, 129-160.
28. WALTON D.C., 1980: Biochemistry and physiology of abscisic acid, *Ann.Rew. Plant Physiol.*, 31, 453-489.
29. WAREING P.F., Van STADEN J., WEBB D.P., 1973: Endogenous hormones in the control of seed dormancy, v *Seed ecology*, Heydecker W.(ed.), Butterworths. London, 145-155.