

Badania nad aktywnością proteaz liści w czasie wzrostu i rozwoju pszenicy

Investigations on protease activity in leaves during growth and development of wheat

J. MYCZKOWSKI

Proteazy liści roślin zbożowych zalicza się do enzymów typu papainy z powodu pewnych wspólnych właściwości, jak aktywowanie czynnikami redukującymi czy optimum pH w zakresie 5,0 do 7,0 (Brady 1961; Singh 1962; Tracey 1948). Proteazy liści roślin zawierających sok mleczny wykazują jednakże o wiele wyższą aktywność od proteaz liści innych roślin, np. pszenicy czy tytoniu. Tracey (1948), który badał enzymy proteolityczne kilkunastu gatunków roślin stwierdził, że np. aktywność proteaz liści pszenicy była ponad 20 razy mniejsza od aktywności proteaz liści ananasa i stokilkadziesiąt razy mniejsza od aktywności czystej papainy.

Na temat aktywności proteaz w czasie wzrostu i rozwoju pszenicy spotyka się w literaturze naukowej bardzo nieliczne wzmianki. Singh (1962) stwierdził wzrost aktywności proteazy liści podczas przejścia ze stanu wegetatywnego w stan generatywny, a następnie gwałtowny spadek tej aktywności. W pracy Kljaczki (1968) podano pewne właściwości syntezy białka w liściach tytoniu i jęczmienia, polegające na tym, że w miarę starzenia się liści następuje przewaga rozpadu białka nad jego syntezą. W pracy poprzedniej (Myczkowski) stwierdzono, że jaryzacja nasion stymuluje aktywność proteolityczną kielków pszenicy ozimej.

W świetle cytowanych powyżej wyników badań uznano za celowe zanalizowanie aktywności proteaz liści w poszczególnych fazach rozwoju pszenicy ozimej i jarej na określonych etapach organogenezy stożka wzrostu pędu.

MATERIAŁ I METODYKA

Obiektem badań były rośliny pszenicy ozimej 'Ostki Złotokłosej' oraz pszenicy jarej 'Ostki Chłopińskiej', pochodzące z poletek doświadczalnych Wyższej Szkoły Rolniczej w Chełmie k. Krakowa. Nasiona psze-

Tabela 1 — Table 1

Etapy organogenezy pszenicy ozimej (Kuperman 1965)

Stages of organogenesis in winter wheat (Kuperman 1965)

Etap Stage	Charakterystyka — Characteristic
I	Niezróżnicowany stożek wzrostu — Nondifferentiated growth apex
II	Różnicowanie się ząbka łodygi na węzły i międzywęzła (początek tworzenia się pochwy liściowych) — Differentiation of shoot primordium to nodes and internodes (beginning of leaf sheaths formation)
III	Segmentacja dolnej części stożka wzrostu i tworzenie się liści okrywających (bracteae) — Segmentation of lower part of growth apex and formation of bracts
IV	Początek tworzenia się wzgórków — Beginning of prominence formation (primordis of spikelets)
V	Tworzenie się kwiatów w kłoskach — Flower formation in spikelets
VI	Tworzenie się pylników (mikrosporoogeneza) i słupka (megasporogeneza) — Anther formation (microsporogenesis) and pistil formation (megasporogenesis)
VII	Tworzenie się komórek płciowych (gametogeneza), wzrost elongacyjny segmentów osadki kłosa oraz organów okrywowych kłosków i kwiatów — Formation of sex cells (gametogenesis), elongation growth of segment of rachis and organs enclosing spikelets and flowers
VIII	Kłoszenie się — Heading
IX	Kwitnienie, zapłodnienie, tworzenie się zygoty (zygotogeneza) — Flowering, fertilization, zygote formations (zygotogenesis)
X	Tworzenie się ziarniaka — Formation of caryopsis
XI	Dojrzałość mleczna (gromadzenie się składników pokarmowych) — Milk ripeness (accumulation of nutrient components)
XII	Dojrzałość woskowa (przekształcanie się składników pokarmowych w zapasowe) i dojrzewanie — Wax ripeness (transformation of nutrient components to storage material) and ripening of seeds

nicy ozimej wysiano w dniu 6.X.1967 r., a pszenicy jarej 20.IV.1968 r. Z roślin przeznaczonych do badań preparowano stożki wzrostu i określano etap ich organogenezy (tabela 1 i 2), a następnie z tej samej grupy pobierano rośliny do analiz, przewożono wraz z korzeniami w woreczkach z folii do laboratorium, liście oddzielano, krajano i wyciskano z nich sok za pomocą mikropraski. Sok homogenizowano następnie w ciągu 5 minut. Wszystkie czynności przeprowadzano w obniżonej temperaturze, a w soku bezpośrednio po homogenizacji badano aktywność proteaz dwoma metodami (Singh 1962).

1. Pierwszy sposób polegał na przeprowadzeniu autolizy białka w soku liści. Sok rozcieńczano wodą destylowaną w stosunku objętościowym 1:4 i inkubowano w termostacie w temperaturze 37°C w ciągu 5 godzin, a następnie wytrącano białka 5% TCA w ciągu 15 minut w temperaturze 0°C i wirowano przez 15 minut w temperaturze 4°C przy 1500 g

Tabela 2 — Table 2

Etapy organogenezy pszenicy jarej (Kuperman 1965)
 Stages of organogenesis in spring wheat (Kuperman 1965)

Etap Stage	Charakterystyka — Characteristic	
I	Niezróżnicowany stożek wzrostu	— Nondifferentiated growth apex
II	Początek wydłużania się stożka wzrostu, różnicowanie się zaczątków łodygi na węzły i międzywęzła	— Beginning of elongation of growth apex, differentiation of shoot primordia to nodes and internodes
III	Różnicowanie się dolnej części stożka wzrostu na segmenty — zaczątki członów osadki kłosowej	— Differentiation of lower part of growth apex into segments-primordia of members of rachis
IV	Rozwój wzgórzków — zaczątków kłosków	— Development of prominences (primordia of spikelets)
V	Początek wykształcania się kwiatów w kłoskach	— Beginning of flower formation in spikelets
VI	Tworzenie się pręcików, ziaren pyłku (mikrosporogeneza) i woreczka zalążkowego (makrosporogeneza). Wzmocniony wzrost znamienia słupka	— Formation of stamens, pollen grains (microsporogenesis) and embryo sac (macrosporogenesis) Increased growth of stigma on pistil
VII	Pełny rozwój kłosków i kwiatów	— Full development of spikelets and flowers
VIII	Kłoszenie się	— Heading
IX	Kwitnienie, zapłodnienie, tworzenie się zygoty	— Flowering, fertilization, formation of zygote
X	Tworzenie się ziarniaka	— Caryopsis formation
XI	Wypełnianie się ziarna	— Filling of grain
XII	Dojrzewanie ziarna	— Ripening of grain

celem oddzielenia białka od związków azotowych niebiałkowych. Po oddzieleniu supernatantu osad białkowy przemywano 5% TCA, powtórnie wirowano i oddzielano płyn z resztą zawartości azotu niebiałkowego. W identyczny sposób oddzielano azot białkowy od niebiałkowego w kontrolnych próbkach soku (0 godzin autolizy). Zawartość azotu białkowego w osadzie oraz azotu ogólnego w homogenizowanym soku z liści oznaczano metodą Kjeldahla w 3 powtórzeniach.

Aktywność hydrolityczną proteaz liści pszenicy badano również metodą inkubacji surowego enzymu wobec 1% kazeiny. Sok wyciśnięty z liści wirowano przez 1 godzinę w temperaturze 4°C przy 10 000 g celem uzyskania wyciągu enzymatycznego. Supernatant ściągano z osadu i inkubowano z 1% roztworem kazeiny w buforze (0,103 M fosforanu dwusodowego i 0,0485 M kwasu cytrynowego) w stosunku objętościowym 1 : 4 w temperaturze 27°C przez 24 godziny z dodatkiem chloroformu przy pH 5.0. Jako kontrolę inkubowano w tych samych warunkach wyciąg enzymatyczny z wodą destylowaną w stosunku obję-

Tabela 3 — Table 3
Autoliza białka w soku liści pszenicy ozimej
Protein autolysis in winter wheat leaf sap

Obiekty — Objects			Azot w 1 ml soku w mg Nitrogen in 1 ml of sap, mg			Stosunek N białkowego do N niebiałkowego Ratio of protein N to non-protein N		Ubytek N białkowego po autolizie Decrease in protein N after autolysis	
Odmiana Variety	Faza rozwoju Stage of develop- ment	Etap orga- nogeny Stage of organo- genesis	Przed autolizą Before autolysis		Po autolizie After autolysis	Przed autolizą Before autolysis	Po autolizie After autolysis	mg	%
			N ogólny Total N	N białkowy Protein N	N białkowy Protein N				
Pszenica ozima Ostka Złotokłosa Winter wheat Ostka Złotokłosa	3-ci liść 3-rd leaf	II*	5,240	3,978	2,710	3,15	1,07	1,268	32
	Krzewienie Tillering	III	5,320	4,368	3,206	4,59	1,52	1,162	27
	Krzewienie Tillering	IV	4,662	3,635	3,122	3,54	2,03	0,513	14
	Strzelanie w źdźbło Shooting	V	3,206	2,904	1,720	9,62	1,16	1,184	41
	Początek kłoszenia Beginning of heading	VIII	4,907	3,868	2,345	3,72	0,92	1,523	39
Różnica istotna Significant difference				0,1737	0,1175				8,0

* patrz Tabela 1
see Table 1

tościowym 1 : 4. Do oddzielenia frakcji białkowej od niebiałkowej w inkubowanych próbkach zastosowano sposób podany powyżej przy autolizatach. W wyciągu enzymatycznym oznaczono następujące frakcje azotowe metodą Kjeldahla: azot ogólny, niebiałkowy i białkowy przed inkubacją oraz azot niebiałkowy w próbkach kontrolnych inkubowanych bez kazeiny. Zawartość azotu niebiałkowego w próbkach wyciągu enzymatycznego inkubowanego z kazeiną oznaczono również metodą Kjeldahla w 3 oddzielnych powtórzeniach materiału roślinnego. Aktywność proteazy wobec kazeiny określono ilością azotu niebiałkowego uwolnionego wyłącznie z kazeiny, uwzględniając w tym celu zawartość azotu niebiałkowego w próbkach kontrolnych.

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Rośliny obu odmian pszenicy pobierano do badań nad aktywnością proteaz liści w tych samych etapach organogenezy stożków wzrostu i odpowiadających im fazach rozwoju wegetatywnego i generatywnego. Prócz tego u pszenicy ozimej przeprowadzono badania również w fazie 3-go liścia, na II etapie organogenezy stożka wzrostu, a więc przed jaryzacją w warunkach naturalnych (tabele 3, 4, 5 i 6). Daty pobrania próbek liści pszenicy do analiz uwidoczniono na rycinach 1, 2 i 3.

Jako miarę aktywności proteolitycznej soku liści pszenicy przyjęto intensywność przebiegu autolizy białka rodzimego, określoną ubytkiem zawartości azotu białkowego po autolizie w przeliczeniu na mg oraz w procentach w porównaniu z próbkami niepoddanymi autolizie.

Jak wynika z tabeli 3, przebieg autolizy białka u pszenicy ozimej charakteryzował się gwałtownym spadkiem aktywności proteolitycznej soku liści w fazie krzewienia roślin (IV etap organogenezy stożka wzrostu), po czym następował skokowy wzrost aktywności, który utrzymywał się aż do początku kłoszenia. Zmiany te były ujemnie skorelowane ze stężeniem białka soku, to jest przy największym nasileniu aktywności proteolitycznej zawartość białka była najniższa.

W tabeli 4 podano wyniki badań nad przebiegiem autolizy białka soku liści pszenicy jarej. U tej odmiany pszenicy nie stwierdzono większych wahań w aktywności proteolitycznej soku w poszczególnych etapach organogenezy stożka wzrostu roślin, przy czym najniższej aktywności oznaczonej w V etapie organogenezy odpowiadała najniższa zawartość azotu białkowego przed autolizą, a najwyższa aktywność nie osiągnęła tak wysokiego poziomu, jak u pszenicy ozimej.

Aktywność proteazy liści wobec kazeiny była u pszenicy ozimej (tabela 5) znacznie niższa w stanie wegetatywnym stożka wzrostu w II etapie organogenezy w porównaniu z pozostałymi obiektami. Wśród obiektów badanych na wiosnę (ryc. 2 i 3) najniższą aktywność proteazy

Tabela 4 — Table 4
Autoliza białka w soku liści pszenicy jarej
Protein autolysis in spring wheat leaf sap

Obiekty — Objects			Azot w 1 ml soku w mg Nitrogen in 1 ml of sap, mg			Stosunek N białkowego do N niebiałkowego Ratio of protein N to non-protein N		Ubytek N białkowego po autolizie Decrease in protein N after autolysis	
Odmiana Variety	Faza rozwoju Stage of develop- ment	Etap orga- nogenezy Stage of organo- genesis	Przed autolizą Before autolysis		Po autolizie After autolysis	Przed autolizą Before autolysis	Po autolizie After autolysis	mg	%
			N ogólny Total N	N białkowy Protein N	N białkowy Protein N				
Pszenica jara Ostka Chłopicka Spring wheat Ostka Chłopicka	Krzewienie Tillering	III*	5,369	4,733	3,414	8,22	1,80	1,319	28
	Strzelanie w źdźbło Shooting	IV	5,964	5,577	3,789	14,41	1,74	1,788	32
	Strzelanie w źdźbło Shooting	V	2,457	1,881	1,370	3,27	1,26	0,511	27
	Początek kłoszenia Beginning of heading	VIII	4,634	3,659	2,445	3,75	1,12	1,214	33
Różnica istotna Significant difference			0,0841		0,0871	3,7			

* patrz Tabela 2
see Table 2

Tabela 5 — Table 5

Aktywność surowej proteazy liści pszenicy ozimej
Activity of crude winter wheat leaf protease

Obiekty — Materiał		Azot w 1 ml wyciągu enzymatycznego w mg Nitrogen in ml of enzyme extract in mg					Jednostki aktywności proteazy** Protease activity units**		
Odmiana Variety	Faza rozwoju Stage of development	Etap organogenezy Stage of organogenesis	Przed inkubacją — Before incubation				N niebiał- kowy po inkubacji bez kazeiny Non-pro- tein incuba- tion with- out casein	na 1 l wy- ciągu enzy- matycznego per 1 l of enzyme extract	na 1 g N białkowego protein N
			N ogólny Total N	N niebiał- kowy Non-protein N	N białkowy Protein N	N kazeiny Casein N			
Pszennica ozima Ostka Złotokłosa Winter wheat Ostka Złotokłosa	3-ci liść 3-rd leaf	II*	4,599	0,856	3,743	5,862	1,317	2177	227
	Krzewienie Tillering	III	1,902	0,500	1,402	5,862	1,054	4975	685
	Krzewienie Tillering	IV	1,444	9,526	0,918	5,862	0,700	3934	589
	Strzelanie w źdźbło Shooting	V	0,659	0,254	0,405	5,862	0,381	4230	675
	Początek kłoszenia Beginning of heading	VIII	3,072	0,900	2,163	5,862	1,745	5890	734
Różnica istotna Significant difference								235,5	31,4

* patrz Tabela 1 see Table 1

** Jako jednostkę aktywności proteazy przyjęto ilość potrzebną do przyrostu zawartości azotu niebiałkowego o 1 mg przy inkubacji enzymu z 1% kazeiną w buforze (0,103 M fosforanu dwusodowego i 0,0485 M kwasu cytrynowego) przez 24 godziny w 27°C pH 5.0.

The unit of protease activity is defined as the amount required to give an increase of 1 mg in non-protein N when the enzyme was incubated with 1% casein in buffer (0,103 M disodium monohydrogen phosphate and 0,0485 M citric acid) for 24 hrs at 27°C at pH 5.0.

Tabela 6 — Table 6

Aktywność surowej proteazy liści pszenicy jarej
Activity of crude spring wheat leaf protease

Obiekty — Objects			Azot w ml wyciągu enzymatycznego w mg Nitrogen in 1 ml of enzyme extract in mg					Jednostki aktywności proteazy** Protease activity units**	
Odmiana Variety	Faza rozwoju Stage of development	Etap organogenezy Stage of organogenesis	N ogólny Total N	N niebiałkowy Non-protein N	N białkowy Protein N	N kazeiny Casein N	N niebiałkowy po inkubacji bez kazeiny Non-protein N after incubation without casein	na 1 l wyciągu enzymatycznego per 1 l of enzyme extract	na 1 g N białkowego per 1 g of protein N
Pszenica jara Ostka Chłopicka Spring wheat Ostka Chłopicka	Krzewienie Tillering	III*	2,121	0,630	1,491	5,862	0,967	4423	602
	Strzelanie w źdźbło Shooting	IV	2,616	0,476	2,140	5,862	1,491	4254	532
	Strzelanie w źdźbło Shooting	V	3,100	0,979	2,121	5,862	1,628	3935	493
	Początek kłoszenia Beginning of heading	VIII	3,955	1,370	2,585	5,862	2,218	3979	471
Różnica istotna Significant difference								308,0	37,7

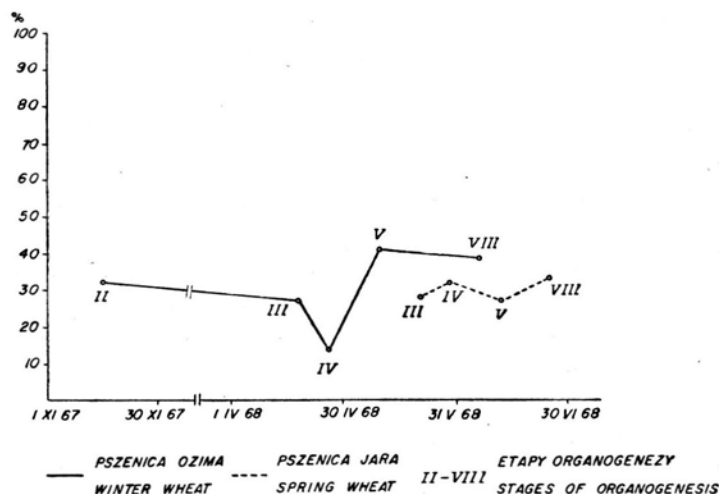
* patrz Tabela 2
see Table 2

** Jako jednostkę aktywności proteazy przyjęto ilość potrzebną do przyrostu zawartości azotu niebiałkowego o 1 mg przy inkubacji enzymu z 1% kazeiną w buforze (0,103 M fosforanu dwusodowego i 0,0485 M kwasu cytrynowego) przez 24 godziny w 27° przy pH 5.0.

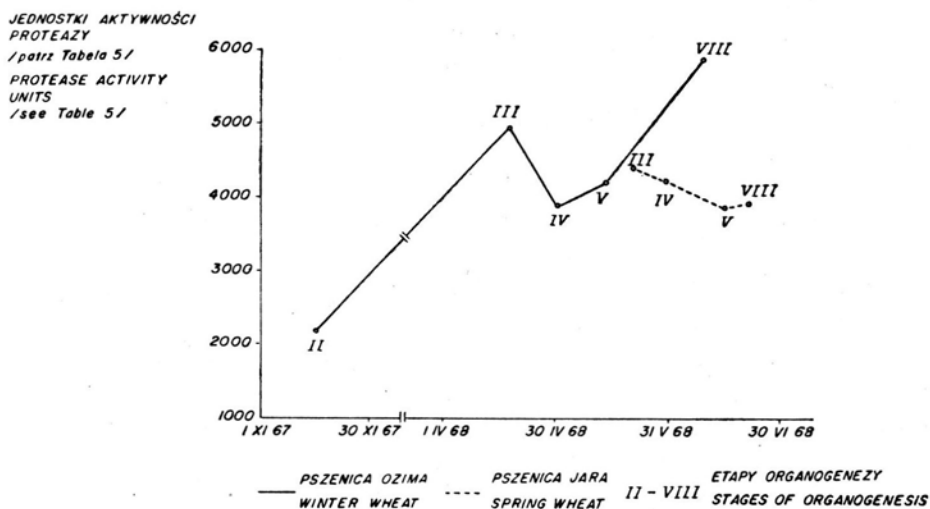
The unit of protease activity is defined as the amount required to give an increase of 1 mg in non-protein N when the enzyme was incubated with 1% casein in buffer (0,103 M disodium monohydrogen phosphate and 0,0485 M citric acid) for 24 hrs at 27°C at pH 5.0.

wobec kazeiny stwierdzono w liściach pszenicy ozimej w IV etapie organogenezy stożka wzrostu, podobnie jak to miało miejsce w badaniach nad przebiegiem autolizy białka w soku liści (ryc. 1).

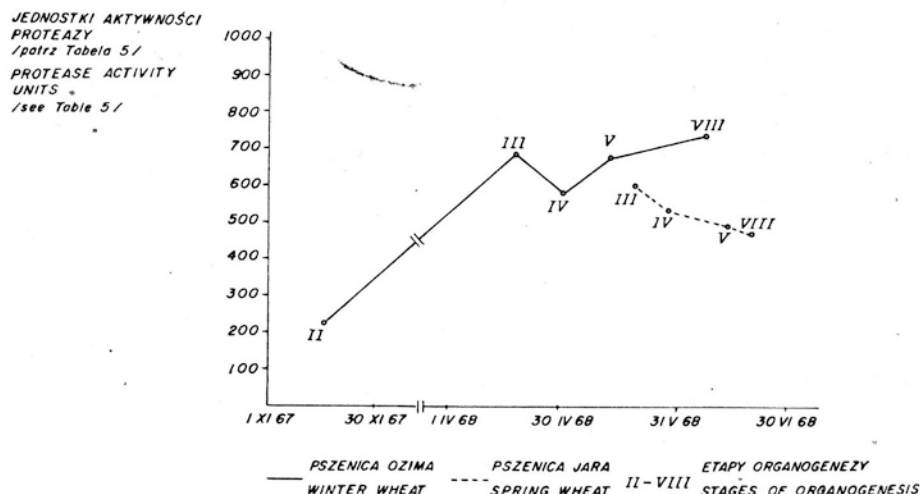
Jak wynika z tabeli 5, procentowy udział azotu niebiałkowego w azocie ogólnym wyciągu enzymatycznego przed inkubacją był dość zróżnicowany w poszczególnych fazach rozwoju roślin i był najniższy w II fazie organogenezy stożka wzrostu. Wartość ta może stanowić pewien wskaźnik przebiegu procesów hydrolizy i syntezy białka *in vivo*, a więc tym samym kierunku działalności enzymów proteolitycznych. Gdyby



Ryc. 1. Ubytek azotu białkowego po autolizie białka w soku liści pszenicy
Fig. 1. Decrease in protein nitrogen content after protein autolysis of wheat leaf sap



Ryc. 2. Przyrost (na 1 l wyciągu enzymatycznego) azotu niebiałkowego po inkubacji proteazy liści pszenicy z kazeiną
Fig. 2. Increase in non-protein nitrogen content after incubation of wheat leaf protease with casein (per 1 l of enzyme extract)



Ryc. 3. Przyrost (na 1 g azotu białkowego) azotu niebiałkowego po inkubacji proteazy liści pszenicy z kazeiną

Fig. 3. Increase in non-protein nitrogen content after incubation of wheat leaf protease with casein (per 1 g of protein nitrogen)

przyjąć takie założenie, można by wnioskować, że w roślinach pszenicy w II etapie organogenezy stożka wzrostu kierunek działania proteaz prowadził do przewagi syntezy białka nad jego hydrolizą i zgodnie z tym enzym wyosobniony z roślin hydrolizował mniej intensywnie sztuczny substrat. Przypuszczenie to zdaje się potwierdzać fakt, że przyrost azotu niebiałkowego po inkubacji bez kazeiny był również słabszy w próbkach wyciągu enzymatycznego z roślin wegetatywnych w porównaniu z roślinami w fazie kłoszenia.

Pszenica jara (tabela 6) wykazała stopniowy spadek aktywności proteaz liści wobec kazeiny w poszczególnych kolejnych etapach organogenezy stożka wzrostu roślin. Spadek ten nie był skorelowany ani z procentowym udziałem azotu niebiałkowego w azocie ogólnym, ani z przyrostem zawartości azotu niebiałkowego po inkubacji proteazy bez kazeiny.

Porównując wyniki badań nad aktywnością proteolityczną liści obu badanych odmian pszenicy przy zastosowaniu dwóch metod, można stwierdzić, że cechą charakterystyczną proteaz liści pszenicy ozimej jest większa ich zmienność pod wpływem czynników zewnętrznych warunkujących rozwój generatywny w porównaniu z proteazami liści pszenicy jarej. Stwierdzony wzrost aktywności proteolitycznej soku liści pszenicy ozimej przy przejściu roślin w stan generatywny, mimo niższego stężenia białka soku, znajduje swoją analogię w wynikach badań nad proteazami kielków pszenicy (Myczkowski 1970), na podstawie których stwierdzono intensywniejszą autolizę białka (przy jego niższym stężeniu)

soku kielków jaryzowanych w porównaniu z kielkami nie jaryzowanymi u odmiany ozimej, podczas gdy u odmiany jarej intensywność autolizy białka soku była niższa w warunkach niskiej temperatury kiełkowania nasion i wprost proporcjonalna do stężenia substratu. Metodą inkubacji proteaz liści pszenicy ozimej z kazeiną stwierdzono znaczny wzrost aktywności enzymatycznej u roślin zjaryzowanych w warunkach naturalnych. Obserwacja ta znajduje również potwierdzenie w pracy poprzedniej (Myczkowski 1970), której wyniki wykazały wyraźny, dodatni wpływ temperatury jaryzacyjnej na aktywność proteolityczną kielków wobec kazeiny u pszenicy ozimej oraz mniej wyraźny u pszenicy jarej.

Na podstawie omówionych powyżej wyników pracy można przypuszczać, że wzrost aktywności proteaz liści pszenicy ozimej jest charakterystyczny dla etapów generatywnego rozwoju stożka wzrostu roślin.

*Zakład Fizjologii Roślin PAN
Kraków*

(Wpłynęło dn. 12.2.1969 r.)

SUMMARY

The hydrolytic activity of leaf proteases was investigated in winter and spring wheat at various phases of development of the plants and at a definite stage of organogenesis of the shoot growth apex.

Protease activity was determined by the method of protein autolysis in the leaf sap at 37°C for 5 hrs, and by the method of incubation of the enzyme at 27°C for 24 hrs with 1% casein in citrate buffer of pH 5.0. The proteolytic activity of the sap was measured in terms of the decrease in protein nitrogen after autolysis and increase of nonprotein nitrogen content released from casein after incubation of the enzyme.

Results

1. Protein autolysis in the sap of winter wheat leaves was most intensive at the stage of shooting, in spite of the lowest protein concentration. The lowest hydrolytic activity of the leaf proteases towards casein was observed in winter wheat in autumn when the growth apex was in a vegetative state, and the highest at the beginning of earing.

2. In spring wheat the intensity of protein autolysis in leaf sap did not show major variations and remained as a rule in direct proportion to protein concentration. Neither were major differences noted in the protease activity towards casein in the particular stages of plant development.

3. It would seem that the increased protease activity in the leaves of winter wheat is characteristic for the stages of generative development of the growth apex of the plants.

*Department of Plant Physiology,
Polish Academy of Sciences,
Cracow*

LITERATURA

- Brady C. J., 1961, The leaf protease of *Trifolium repens*. Biochem. Journ. 78: 631.
- Kljaczko N. L., 1968, Wzrastnyje osobennosti synteza bielka w listjach, Fizjol Rast., 15 (4): 696.
- Kuperman F. i inni, 1965, Biologiczne obserwacje kontrolne w rolnictwie. PWRiL, Warszawa.
- Myczkowski J., 1970, Aktywność proteolityczna wyciągów z jaryzowanych i niejaryzowanych kielków pszenicy, Acta Agrobotanica 23: 161—168.
- Singh S., 1962, Proteolytic activity of leaf extracts, Journ. Sci. Food Agric. 13 (6): 325.
- Tracey M. V., 1948, Leaf protease of tobacco and other plants, Biochem. Journ., 42: 281.