Poziom glutationu zredukowanego i utlenionego we wczesnych fazach rozwoju *Pisum sativum* L. i *Lupinus luteus* L.

The content of reduced and oxydized glutathione in the early development stages of Pisum sativum L. and Lupinus luteus L.

B. GORJACZKO-MORAWIECKA

WSTĘP

Glutation spełnia wiele funkcji biologicznych w żywej komórce, między innymi aktywuje hormony i enzymy (W. Grassman i wsp. 1930, F. Binkley i wsp. 1951 r.), pełni rolę specyficznego koenzymu: dehydrogenazy aldehydu 3-P-glicerolowego (J. Krimsky i E. Racker 1952), glioksalazy (C. Neuberg 1913), cis-, trans-izomeryzy kwasu maleiloacetooctowego (Morgan i Friedemann cyt. wg E. Rackera 1954), dehydrogenazy formaldehydowej (D. Strittmatter, E. Ball 1955) i reduktazy nitroglicerolowej (L. A. Heppel, R. J. Hilmoe 1950). Poza tym stymuluje podział i wzrost komórkowy. E. Racker (1954) porównał funkcję biologiczną glutationu z rolą nukleotydów fosfopirydynowych, flawinowych i koenzymu A.

Badania nad występowaniem glutationu w komórkach zwierzęcych, roślinnych i w drobnoustrojach są bardzo wyczerpujące (F. G. Hopkins 1921, 1945, E. Barron 1951, E. Bricas i wsp. 1953). Słabo natomiast są zbadane zmiany poziomu glutationu i ich związek z fazami rozwojowymi żywych organizmów, a w szczególności roślin wyższych. F. G. Hopkins i E. J. Morgan (1943) wyrazili pogląd, że glutation zredukowany powstaje szybko we wczesnym okresie kiełkowania nasion. J. M. Lawrence (1950) podważył to stanowisko swoimi pracami nad formowaniem się substancji redukujących w czasie kiełkowania, gdyż stwierdził, że poziom glutationu w ciągu pierwszych ośmiu dni kiełkowania waha się w granicach od 690 μg do 450 μg . M. J. Proskuriakow i J. M. Mosolowa (1952) badając metabolizm glutationu w grochu stwierdzili, że po-

zium glutationu przez pierwsze osiem dni kiełkowania nie zmienia się wyraźnie, a następnie obniża się. W roślinach pozbawionych liścieni autorzy zaobserwowali dwukrotny przyrost glutationu w początkowym okresie kiełkowania.

Ze względu na wysoką aktywność biologiczną glutationu interesujące było przebadanie zmiany poziomu glutationu w czasie rozwoju całych roślin i ich organów. W tym celu badania przeprowadziłam na dwóch roślinach motylkowych: grochu zwykłym, odmianie cukrowej i łubinie żółtym, białonasiennym. Rośliny te różnią się sposobem kiełkowania i rozwoju. Liścienie grochu w czasie kiełkowania pozostają pod powierzchnią gleby i pełnią funkcję materiałów zapasowych, liścienie łubinu natomiast wydostają się wraz z rozwijającą się rośliną ponad powierzchnię gleby i są nie tylko źródłem materiałów zapasowych, lecz funkcjonują również jako pierwsze asymilujące liście. Różnica ta została wykorzystana do porównania zmian poziomu glutationu w organach morfologicznie jednakowych, a fizjologicznie różnych.

Bliższe dane o budowie i znaczeniu biologicznym glutationu podałam w pracy przeglądowej (Morawiecka 1959).

METODYKA BADAŃ

Metody chemiczne

Glutation zredukowany oznaczano miareczkową modyfikacją metody glioksalazowej wg E. F. Schroeder i G. H. Woodward (1939). Istotą tej metody są dwie zasadnicze reakcje: enzymatyczna i oznaczanie miareczkowe. W reakcji enzymatycznej, pod wpływem glioksalazy i glutationu jako koenzymu, z metyloglioksalu powstaje kwas mlekowy. Ilość przereagowanego metyloglioksalu zależy w pewnych granicach od stężenia glutationu (od 0—100 μg glutationu). Podstawą do oznaczania metyloglioksalu jest reakcja Clifta i Cooka, w której metyloglioksał wiąże się na związek addycyjny (kwas hydroksysulfonowy) z dodanym w nadmiarze kwaśnym siarczynem sodowym. Nadmiar kwaśnego siarczynu odmiareczkowuje się. Następnie, przez dodanie drugorzędowego fosforanu sodowego, zwalnia się związany z metyloglioksałem w stosunku stechiometrycznym kwaśny siarczyn sodowy. Ten ostatni miareczkuje się 0,005 N roztworem jodu.

Postępowanie przy sporządzaniu krzywych standardowych glutationu: do 100 mg proszku acetonowego z drożdży (źródło gliksalazy) zawieszonego w 0,5 ml M/15 moderatora fosforanowego o pH = 7,2 dodawano od 0—1 ml 0,2% standardu glutationu w 4% kwasie sulfosalicylowym. Próbkę zobojętniano i uzupełniano do objętości 2 ml M/15 moderatorem fosforanowym o pH 7,2. Z tego pobierano 1 ml do inkubacji z 0,5 ml roztworu metylogliksalu (przy sporządzaniu pierwszej krzywej standardowej używano metylogliksalu o mianie 5,12 ml 0,005 N jodu na 5 ml próbkę, a przy sporządzaniu następnych krzywych używano drugiego preparatu metylogliksalu, o mianie 4,15 ml 0,005 N jodu na 5 ml próbkę). Po 30 minutach w temp 26° reakcję enzymatyczną przerywano dodając 10 ml 0,002 N kwasu siarkowego. Po odwirowaniu pobierano 5 ml próbki do oznaczenia nadmiaru metylogliksalu przez zmiareczkowanie 0,005 N jodem. Specyficzność metody gliksalazowej podano w tabeli 1.

Tabela 1

Specyficzność metod, służących do oznaczania glutationu wg D. Glicka (1955)

Metody	Czułość na glutation μg	GSH (glutation)	Cysteina	Cysteinyl- glicyna	Glutamyl- cysteina	Ergotio- neina	Kwas askorbi- nowy
Jodometryczna	100	+	+	+	+	+	+
Fosforowol- framowa	100	+	+	+	+	+	+
Żelazicyjankowa	1	+	+	+	+	+	+
Amperometrycz- na	10	+	+	+	+	+	—
Nitroprusydko- wa	10	+	+	+	+	+	—
Mikrobiologiczna	1	?	?	?	?	—	—
Chromatografi- czna	50	+	—	—	—	—	—
Naftochinono- sulfonowa	100	+	+	+	—	—	—
Alloksanowa	1	+	—	—	—	—	—
„305”	1	+	—	—	—	—	—
Gliksalazowa	3	+	—	—	—	—	—

Źródłem gliksalazy był proszek acetonowy z drożdży piekarskich, który nie tracił aktywności enzymatycznej przy przechowywaniu przez kilka miesięcy w suchych naczyniach w temperaturze +4°. W czasie pracy uży-

wano czterech różnych preparatów glioksalazy, dla których odpowiednie wartości zostały podane w tabeli 2.

Metyloglioksal otrzymano wg metody C. Neuberga i wsp. (1917). Stężenie otrzymanego preparatu oznaczano wagowo i miareczkowo wg T. E. Friedemanna (1927). Miano otrzymanego metyloglioksalu zostało podane powyżej.

Ryc. 1. Chromatogram standardu glutationu i wyciągów sulfosalicylowych z *Lupinus luteus* L.: 1 — standard glutationu zredukowanego; 2 — wyciąg z całych roślin *Lupinus luteus* L. w II fazie rozwoju; 3 — wyciąg z całych roślin *Lupinus luteus* L. w II fazie rozwoju z dodanym glutationem zredukowanym

Ryc. 2. Chromatogram standardu glutationu zredukowanego i wyciągów sulfosalicylowych z *Pisum sativum* L.: 1 — standard glutationu; 2 — wyciąg z całych roślin w II fazie rozwoju; 3 — wyciąg z całych roślin w II fazie rozwoju z dodanym glutationem; 4 — wyciąg z całych roślin w II fazie rozwoju po elektroredukcji

Glutation wyizolowano z drożdży piekarskich wg A. W. Grassmanna (1936). Otrzymany preparat był krystaliczny i chromatograficznie jednorodny (ryc. 1 i 2). Roztwory standardowe glutationu zredukowanego przygotowywano codziennie. Sporządzono krzywe standardowe dla czterech preparatów glioksalazy (tabela 2).

Glutation całkowity oznaczano poddając uprzednio wyciągi z nasion i siewek elektroredukcji wg metody J. S. Dohan i G. E. Woodward (1939) w naczyniu katodowym o średnicy 2,8 cm, przy gęstości prądowej 2,6—3,0 mA/cm², w ciągu 12—15 minut. Skuteczność tej reakcji badano na standardowym roztworze glutationu utlenionego wykazując chromatograficznie glutation utleniony przed elektroredukcją i jego brak po elektroredukcji. Zaobserwowałam, że w czasie elektroredukcji istnieje niebezpieczeństwo utlenienia się glutationu zredukowanego, o ile oddziaływanie roztworu przekroczy wartość pH 3 (G. E. Woodward 1932). W tym celu sporządzałam wyciągi z badanego materiału kwasem sulfo-salicylowym o końcowym stężeniu około 3%. W czasie elektroredukcji stężenie jonów wodorowych wahało się w granicach od pH 1,5 do pH 2,4. Podobną modyfikację dla wyciągów z tkanek zwierzęcych podaje S. K. Battacharya i wsp. (1955).

Tabela 2

Krzywe standardowe glutationu, uzyskane dla czterech preparatów glioksalazy

Preparat glioksalazy	GSH µg	0	25	50	75	100
	ml 0,005 N jodu					
1		4,26*	3,52	3,0	2,45	1,82
2		3,66	2,49	1,50	0,80	0,66
3		3,58	1,75	0,60	—	0,46
4		3,80	2,83	2,0	1,42	0,95

* Wszystkie podane wartości są średnią arytmetyczną z czterech pomiarów.

Do jakościowego wykrywania glutationu zredukowanego i utlenionego stosowano metodę zstępującej chromatografii bibułowej przez 8—10 godzin, na bibule Whatman No 4 w mieszaninie fenolu nasyconego wodą w atmosferze 1% kwasu solnego w temp. pokojowej (I. Krymsky, E. Racker 1952). Chromatogramy po wysuszeniu w temp. około 40° wywoływano 0,1% roztworem alkoholowym ninhydryny przez 10 minut w 80°.

Metody biologiczne

Do doświadczeń użyłam nasion łubinu żółtego o ziarnie białym (*Lupinus luteus*) o sile kiełkowania $96 \pm 2\%$ i nasion grochu zwykłego odmiany cukrowej (*Pisum sativum* L.) o sile kiełkowania $95 \pm 3\%$. Nasiona uzyskano z Wojewódzkiej Stacji Oceny Nasion we Wrocławiu. Doświadczenia z kulturami wodnymi i wazonowymi przeprowadzano w pomieszczeniu ze szklanym dachem. Przeznaczone do hodowli nasiona sterylizowano $0,1\%$ wodnym roztworem chlorku rtęciowego, następnie przemywano sterylizowaną wodą destylowaną. Rośliny hodowano na świetle: w kulturach wodnych, wazonowych i polowych; w ciemności — w kulturach wodnych (etiolowane).

Kultury wodne

Kiełkowanie i wzrost roślin przeprowadzano w inkubatorach o pojemności 30 l i średnicy 36 cm w temp. $26^\circ \pm 3$. Z uwagi na to, że hodowla kultur wodnych odbywała się w miesiącu styczniu i lutym, rośliny dodatkowo oświetlano przez 5—6 godzin dziennie. Źródłem światła była 250 W żarówka, umieszczona prostopadle do powierzchni inkubatora w odległości 50 cm od roślin. Rośliny kiełkowały na wodzie destylowanej, a po trzech dniach (pierwsza lub druga faza rozwoju) część roślin przeznaczono do rozwoju w ciemności, a część na świetle. Jednakowo rozwinięte rośliny przenoszono do inkubatora z pięciokrotnie rozcieńczoną pożywką Knopa. Poszczególne rośliny umieszczano w otworach wyparafinowanej gazy, pokrywającej inkubator. Rośliny pozostawały zanurzone w pożywce po szyjkę korzeniową. W inkubatorze hodowano 20 roślin. Zależnie od stopnia rozwoju w 5 lub 6 dniu pożywkę rozcieńczoną zastępowano pełną, z dodatkiem mikroelementów wg Haasa i Reeda cyt. przez Hoaglanda (1948). pH pożywki wahało się od 6,5—6,8. Wietrzenia roślin dokonywano raz na dobę przez 10—15 minut przy pomocy wodnej pompy tłoczącej i systemu szklanych rurek z otwórkami, umieszczanych każdorazowo w pożywce.

Kultury wazonowe

Prowadzono hodowlę roślin w kulturach wazonowych w miesiącach lipcu i sierpniu na glebie ogrodowej o oddziaływaniu słabo kwaśnym (pH około 6,3) i wilgotności względnej 60% . Siewu dokonywano bezpośrednio do wazonów z glebą. Po kiełkowaniu rośliny przerywano, pozostawiając w każdym wazonie po 4 okazy. Pojemność wazonów wahała się od 1—4 l. Rośliny przeznaczone do analizy we wcześniejszej fazie (I lub II faza

rozwoju) rosły w wazonach o pojemności 1—2 l, a rośliny starsze w odpowiednio większych naczyniach. W celu wietrzenia kultur wazonowych wkładano na dno naczynia żwir i zaopatrywano je w sposób stereotypowy w rury wentylacyjne, po 3 na wazon. Optymalną wilgotność podłoża uzyskiwano przez codzienne podlewanie roślin do stałej wagi.

Kultury polowe

Rośliny hodowano w kulturach polowych w czerwcu i lipcu. Nasiona wysiewano na poletkach o wymiarach $1 \times 1,5$ m na glebie ogrodowej o pH 6,5. Rozstawa roślin w rzędach wynosiła około 5 cm, a rozstawa rzędów około 20 cm. Wegetacja trwała 3 tygodnie.

Sporządzanie wyciągów

Wyciągi sporządzano z nasion, siewek i z liści. W tym celu nasiona pozbawiano okrywy nasiennej, mielono w młynku nożowym, a następnie kulowym na jednorodny proszek. Siewki przepłukiwano wodą destylowaną i osuszano strumieniem powietrza. Tak przygotowany materiał w ilości od 0,5—1 g proszku z nasion lub 4—6 sztuk siewek lub liści ucierano przez około 7 minut w moździerzu porcelanowym z 5 ml 40% roztworu kwasu sulfosalicylowego. Wyciągi odwirowywano przy 3000 obrotów/min. Pozostałość przemywano dwukrotnie 5 ml 4—6% kwasu sulfosalicylowego. Postępowanie to było wystarczające dla całkowitego wymycia glutationu. Płyny po odwirowaniu łączono i oznaczano w nich natychmiast glutation zredukowany i całkowity. Próbowano również sporządzać wyciągi przy użyciu 6, 10, 15% kwasu metafosforowego lub sulfosalicylowego przez uprzednie zamrożenie materiału stałym dwutlenkiem węgla. Postępowanie to nie dało lepszych rezultatów.

Fazy rozwoju badanych roślin

Zaobserwowane zmiany poziomu glutationu w czasie rozwoju siewek *Pisum sativum* i *Lupinus luteus* odniosłam nie do dnia, lecz do określonej fazy rozwojowej. W okresie wegetacyjnym wyróżniono następujące fazy rozwojowe (patrz tab. 3).

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Odpowiednio ułożone kontrole przy oznaczaniu glutationu zredukowanego metodą glioksalazową w badanych wyciągach pozwoliły wykluczyć możliwość rozkładania dodanego metyloglioksalu lub glutationu, jak również hamowania reakcji glioksalazowej. Skład prób kontrolnych podano w tabeli 4. W pierwszym przypadku, oznaczając miano metyloglioksalu wobec wyciągów z nasion i siewek bez enzymu otrzymano rezultaty zgodne

z mianem czystego metyloglioksalu. Również fakt odzyskania glutationu dodanego do wyciągów z nasion i siewek pozwala przypuszczać, że wyciągi sulfosalicylowe nie miały zdolności rozkładania glutationu ani hamowania reakcji glioksalazowej. Wyniki próby kontrolnej, zawierającej znaną ilość dodanego glutationu leżą w granicach błędu metody i zostały podane w tabeli 5.

Tabela 3

Faza	<i>Lupinus luteus</i>	<i>Pisum sativum</i> L.
0	Suche, nie wykiełkowane nasiona lub zarodki.	Suche, nie wykiełkowane nasiona lub zarodki.
I	Częściowe zazielenienie się liścieni, pęknięcie okrywy nasiennej. 4 lub 5 dzień kiełkowania w kulturach wazonowych i połowych; 3 dzień w kulturach wodnych.	Pojawienie się pierwszych stulonych, zielonych liści. Liścienie twarde i żółte 2 lub 3 dzień kiełkowania we wszystkich kulturach.
II	Całkowite zazielenienie się liścieni, uformowanie się dwóch pierwszych stulonych liści. 7 dzień kiełkowania w kulturach połowych i wazonowych; 5 w kulturach wodnych.	Rozchylone zielone liście; liścienie twarde. 4 lub 5 dzień kiełkowania.
III	Liścienie zielone asymilujące, utworzenie się trzeciego liścia. 9 lub 10 dzień kiełkowania w kulturach wazonowych i połowych, 6 lub 7 w kulturach wodnych.	Cztery odgałęzienia w części nadziemnej. 6 lub 7 dzień kiełkowania.
IV	Formowanie się piątego liścia. 12 lub 13 dzień kiełkowania w kulturach wazonowych i połowych; 9 w kulturach wodnych.	Tworzenie się zawiązków wąsów. 10 lub 12 dzień kiełkowania.
V	Pojawienie się pierwszych brodawek korzeniowych. Liścienie miękną. 18 lub 19 dzień kiełkowania w kulturach połowych i wazonowych.	Liścienie miękną. 12 lub 13 dzień kiełkowania.
VI		Liścienie miękną i kurczą się. Roślina dobrze wykształcona. 18 lub 19 dzień kiełkowania.

Obecność glutationu w wyciągach z siewek wykazałam metodą chromatografii bibułowej. Ryc. 1 i 2 przedstawiają dwa przykłady chromatogramów z wyciągów 7-dniowych siewek *Lupinus luteus* i 6-dniowych siewek *Pisum sativum* L. Na chromatogramach stwierdzono obecność glutationu w samych wyciągach i w wyciągach z dodanym glutationem zredukowanym zgodnie z położeniem plam glutationu standardowego.

Tabela 4

Skład prób kontrolnych przy oznaczaniu glutationu całkowitego i zredukowanego

Składniki	Skład próby kontrolnej na:			
	1 metyloglio- ksal	2 proszek acetonowy z drożdży	3 wyciągi z roślin	4 wyciągi z roślin z dodanym glutaniem
0,5 ml metyloglioksalu	+	+	+	+
0,5 ml proszku acetonowego (glioksa- laza) w M/15 moderatorze fosforano- wym o pH 7,2	—	+	—	+
0,5 ml M/15 moderatora fosforano- wego o pH 7,2	+	—	+	—
1 ml zobojętnionego wyciągu sulfosa- licylowego z roślin	—	—	+	—
1 ml zobojętnionego 40/0 kwasu sulfo- salicylowego	+	+	—	—
0,75 ml zobojętnionego wyciągu sulfo- salicylowego z roślin	—	—	—	+
0,25 ml 0,20/0 standardu glutationu	—	—	—	+

Oznaczenie zmian w poziomie glutationu całkowitego i zredukowanego wykonano na dwóch roślinach motylkowych — *Lupinus luteus* i *Pisum sativum* L. Różnica w składzie ilościowym materiałów zapasowych liścieni tych dwóch roślin polega na tym, że w liścieniach łubinu materiałem zapasowym jest głównie białko, a w grochu — węglowodany. Istotną różnicą wczesnej fazy rozwojowej tych roślin jest funkcja fizjologiczna liścieni.

Tabela 5

Odzyskiwanie dodanego glutationu do wyciągów z badanych roślin

Wyciągi	Glutation całkowity w $\mu\text{g}/0,75$ ml wyciągu		0/0 glutationu odzyskanego
	bez dodanego GSH	z dodanym GSH—25 μg	
<i>Lupinus luteus</i> — całe nasiona—faza 0	27,0	53,8	105
<i>Lupinus luteus</i> —całe rośliny—faza IV	24,0	47,5	94
<i>Lupinus luteus</i> —całe rośliny—faza V	11,3	36,0	99
<i>Lupinus lateus</i> —same liścienie—faza V	20,0	43,8	95
<i>Pisum sativum</i> L —całe rośliny—faza V	33,8	60,0	105
<i>Pisum sativum</i> L —całe rośliny—faza VI	27,8	47,5	94,8

Liścienie łubinu we wczesnym okresie rozwoju pełnią rolę pierwszych asymilujących liści i są równocześnie źródłem materiału zapasowego; liścienie grochu pełnią tylko tę ostatnią funkcję.

Tabela 6

Poziom glutationu zredukowanego i całkowitego
Analiza całych roślin z kultur polowych i wazonowych

Faza rozwoju	<i>Lupinus luteus</i>			<i>Pisum sativum</i> L.		
	Dzień hodowli	Glutation całkowity $\mu\text{g/g}$ suchej masy	Glutation zredukowany $\mu\text{g/g}$ suchej masy	Dzień hodowli	Glutation całkowity $\mu\text{g/g}$ suchej masy	Glutation zredukowany $\mu\text{g/g}$ suchej masy
0	0	700 $\pm$ 52,0	700 $\pm$ 52,0	0	1585 $\pm$ 23,4	1585 $\pm$ 23,4
I	5	822 $\pm$ 41,6	822 $\pm$ 41,6	3	1180 $\pm$ 10,4	1180 $\pm$ 10,4
II	7	1428 $\pm$ 62,4	1075 $\pm$ 122,2	5	1119 $\pm$ 24,7	1119 $\pm$ 24,7
III	10	1095 $\pm$ 85,8	813 $\pm$ 96,2	7	870 $\pm$ 24,7	791 $\pm$ 41,6
IV	13	699 $\pm$ 44,2	429 $\pm$ 46,8	10	945 $\pm$ 35,1	945 $\pm$ 35,1
V	18	183 $\pm$ 23,4	183 $\pm$ 23,4	13	929 $\pm$ 23,4	730 $\pm$ 27,3
VI	—	—	—	18	813 $\pm$ 33,8	813 $\pm$ 33,8

Wartości glutationu całkowitego i zredukowanego wyznaczono, podając przedział ufności wg metody statystycznej (A. Rokosz 1955) przy prawdopodobieństwie $P_1=0,95$; $n=3$.

W celu uchwycenia morfologicznej lokalizacji przypuszczalnych zmian w poziomie glutationu, spowodowanych odmienną funkcją fizjologiczną liścieni, przeprowadzono oddzielnie analizę całych roślin, samych liścieni i siewek pozbawionych liścieni. Wyniki analiz całych roślin hodowanych w kulturach polowych i wazonowych zebrano w tabeli 6. Poziomem wyjściowym jest ilość glutationu zredukowanego znajdująca się w suchych nasionach (faza 0). W suchym nasieniu grochu jest około 2 razy wyższy poziom glutationu zredukowanego niż w nasionach łubinu. Glutation w suchych nasionach występuje tylko w formie zredukowanej, natomiast

Tabela 7

Poziom glutationu zredukowanego i całkowitego
Analiza liścieni z roślin kultur wazonowych

Faza rozwoju	<i>Lupinus luteus</i>			<i>Pisum sativum</i> L.		
	Dzień hodowli	Glutation całkowity $\mu\text{g/g}$ suchej masy	Glutation zredukowany $\mu\text{g/g}$ suchej masy	Dzień hodowli	Glutation całkowity $\mu\text{g/g}$ suchej masy	Glutation zredukowany $\mu\text{g/g}$ suchej masy
0	0	700 $\pm$ 52,0	700 $\pm$ 52,0	0	1585 $\pm$ 23,4	1585 $\pm$ 23,4
I	5	801 $\pm$ 24,3	751 $\pm$ 22,1		—	—
II	7	1263 $\pm$ 42,9	1091 $\pm$ 22,1		—	—
III	10	855 $\pm$ 7,8	794 $\pm$ 14,3	6	480 $\pm$ 0,0	480 $\pm$ 0,0
IV		—	—	10	740 $\pm$ 24,7	622 $\pm$ 28,6
V	18	250 $\pm$ 26,0	250 $\pm$ 26,0	13	613 $\pm$ 35,1	465 $\pm$ 27,3
VI		—	—	18	659 $\pm$ 28,6	659 $\pm$ 28,6

Wartości glutationu całkowitego, i zredukowanego wyznaczono, podając przedział ufności wg metody statystycznej (A. Rokosz 1955) przy prawdopodobieństwie $P_1=0,95$; $n=3$.

Tabela 8

Poziom glutationu zredukowanego i całkowitego

Analiza roślin bez liści z kultur wazonowych

Faza rozwoju	<i>Pisum sativum</i> L.			<i>Lupinus luteus</i>		
	Dzień hodowli	Glutation zredukowany $\mu\text{g/g}$ suchej masy	Glutation całkowity $\mu\text{g/g}$ suchej masy	Dzień hodowli	Glutation całkowity $\mu\text{g/g}$ suchej masy	Glutation zredukowany $\mu\text{g/g}$ suchej masy
0	0	$556 \pm 17,25$	$556 \pm 17,25$	—	—	—
I	—	—	—	5	1058	1058
II	—	—	—	7	1368	1217
III	6	$1417 \pm 37,7$	$1101 \pm 27,3$	—	—	—
IV	—	—	—	13	835	835
V	13	$1013 \pm 33,8$	$823 \pm 45,5$	18	453	453
VI	18	$923 \pm 33,8$	$808 \pm 27,3$	—	—	—

Wartości glutationu całkowitego i zredukowanego dla *Pisum sativum* L. wyznaczono na podstawie 3 pomiarów ($n=3$) przy prawdopodobieństwie $P_1=0,95$, podając przedział ufności wg metody statystycznej (A. Rokosz 1955).

Wartości glutationu całkowitego i zredukowanego dla *Lupinus luteus* pochodzą z jednego doświadczenia.

w przechowywanym suchym proszku z nasion można wykryć zmienne ilości glutationu utlenionego, dochodzące do 60% glutationu zredukowanego. W łubinie żółtym poziom glutationu całkowitego gwałtownie wzrasta i osiąga dwukrotnie wyższy poziom w II fazie rozwojowej. W IV fazie poziom glutationu spada do ilości wyjściowej, a w V stanowi już tylko 26% glutationu suchego nasienia. Glutation utleniony pojawia się w II fazie

Tabela 9

Poziom glutationu zredukowanego i całkowitego

Analiza całych roślin z kultur wodnych, hodowanych na świetle i w ciemności

Faza rozwoju	<i>Lupinus luteus</i>				<i>Pisum sativum</i>	
	Dzień hodowli	Na świetle	W ciemności		Dzień hodowli	W ciemności
		Glutation zredukowany* $\mu\text{g/g}$ suchej masy	Glutation całkowity $\mu\text{g/g}$ suchej masy	Glutation zredukowany $\mu\text{g/g}$ suchej masy		Glutation zredukowany* $\mu\text{g/g}$ suchej masy
0	0	$700 \pm 52,0$	$700 \pm 52,0$	$700 \pm 52,0$	0	$1585 \pm 23,4$
I	2	$1340 \pm 52,0$	—	—	—	—
II	5	$1515 \pm 65,0$	$1420 \pm 52,0$	$1420 \pm 52,0$	3	$1012 \pm 31,2$
III	6—7	$825 \pm 39,0$	$990 \pm 26,0$	$990 \pm 26,0$	6	$827 \pm 26,0$
IV	9	$765 \pm 39,0$	$705 \pm 39,0$	$512 \pm 20,8$	10	$768 \pm 19,5$

* Glutation całkowity w podanych doświadczeniach odpowiadał poziomowi glutationu zredukowanego. Wartości glutationu całkowitego i zredukowanego wyznaczono na podstawie 3 pomiarów ($n=3$) przy prawdopodobieństwie $P_1=0,95$ podając przedział ufności wg metody statystycznej (A. Rokosz 1955).

rozwoju i znika w V fazie. Jego poziom średnio wynosi 20% glutationu całkowitego. W grochu zwykłym, odmianie cukrowej glutation całkowity spada znacznie w I fazie rozwojowej, a w następnych od II—V utrzymuje się na poziomie, stanowiącym około 60% poziomu wyjściowego. Obecność glutationu utlenionego stwierdzono w III i V fazie rozwojowej.

Jak widać z tabeli 6 w miarę rozwoju zaobserwowano odmienne zachowanie się glutationu w dwóch badanych roślinach motylkowych.

Zmiany poziomu glutationu w samych liściach roślin przedstawia tabela 7. Glutation całkowity i zredukowany tak w liściach łubinu, jak i grochu zachowuje się podobnie, jak w odpowiadających liściom całych roślinach. Niewielkie różnice nie są związane z charakterem zmian, lecz raczej z bezwzględną ilością glutationu przeliczanego na gram suchej masy.

W tabeli 8 zebrano wyniki analiz przeprowadzonych na roślinach pozabawionych liści. Poziomem wyjściowym było stężenie glutationu zawartego w suchym zarodku. W obu roślinach w II i III fazie rozwojowej zaobserwowano wzrost zawartości glutationu całkowitego i zredukowanego w stosunku do ilości glutationu w suchym zarodku. W III fazie rozwojowej grochu obserwuje się 2-krotny spadek ilości glutationu, który jest wyraźniej widoczny w samych liściach (tabela 7). Różnica ta w całej roślinie jest kompensowana przez znaczny przyrost glutationu w samym kielku (tabela 8). Ponieważ w tym okresie suchą masę rośliny stanowi głównie materiał zapasowy liści, więc charakter zmian glutationu w całej roślinie po przeliczeniu na gram suchej masy jest wyrazem zmian odbywających się w liściach.

Zachowanie się glutationu całkowitego i zredukowanego w kolejnych fazach rozwojowych siewek grochu bez liści jest diametralnie różne od zmian przebiegających w tym samym czasie w całej roślinie (tabela 6), natomiast charakterem swym jest zbliżone do zmian, przebiegających w całej roślinie łubinu.

Dla zaobserwowania, w jakim stopniu zmiany w poziomie glutationu całkowitego i zredukowanego zależą od rodzaju hodowli (czynniki zewnętrzne), przeprowadzono hodowlę roślin w kulturach wodnych, kierując się tym, że warunki fizjologiczne rozwoju zostają zachowane dzięki materiałom zapasowym liści i pożywce, którą dodawano w późniejszych fazach rozwojowych.

Rozwój roślin hodowanych w kulturach wodnych na świetle i w ciemności jest intensywniejszy, szczególnie w I i II fazie i trwa krócej, niż w kulturach polowych i wazonowych. Obserwowane zmiany w zachowaniu się glutationu są w swym charakterze podobne do zmian, przebiegających w roślinach hodowanych w kulturach polowych i wazonowych. W II fazie

rozwojowej *Lupinus luteus* glutation całkowity wzrasta dwukrotnie, a w następnych maleje. U grochu natomiast w III fazie rozwojowej poziom glutationu obniża się dwukrotnie i pozostaje bez zmian w badanym okresie wegetacyjnym. Glutation utleniony stwierdzono tylko w roślinach etilowanych łubinu żółtego.

DYSKUSJA

Jak wspomniano na wstępie, badania dotyczące związku pomiędzy poziomem glutationu a wczesnym rozwojem roślin wyższych są dość skąpe i trudne do interpretacji. Cytowani autorzy nie precyzowali dokładnie, co oznacza „wczesny okres kiełkowania“, podając najczęściej dzień kiełkowania. Znany jest fakt, że dzień kiełkowania nie pokrywa się ze stopniem rozwoju siewek. Łatwiej jest uzyskać warunki standardowe, jeżeli analizuje się roślinę w określonej fazie rozwojowej, uchwytnej wizualnie dzięki zmianom morfologicznym, niż w kolejnym dniu kiełkowania, zależnym od warunków zewnętrznych, takich jak temperatura, wilgotność, nasłonecznienie itp. Dlatego wydawało mi się bardziej słuszne analizowanie rośliny w określonych fazach rozwojowych.

W interpretacji wyników należy wziąć pod uwagę fakt, że poziom glutationu oznaczony w całej siewce może maskować zmianę zachodzącą w samym kielku. Wartości glutationu są przeliczane na gram suchej masy. Suchą masę nasienia w I i II fazie rozwoju rośliny stanowi głównie materiał zapasowy liścienia, ponieważ zarodek jest 1/100 całości nasienia. Jeżeli więc odbywające się zmiany w zawartości glutationu w liścieniach i samych zarodkach posiadałyby ten sam charakter, to analizując oddzielnie poszczególne części rośliny, różnice te w przypadku zarodka wpływałyby tylko na bezwzględną ilość glutationu. Natomiast w wypadku, gdy zmiany te są diametralnie różne, a ilość glutationu w samym kielku mała, to zmiana odbywająca się w rosnącym kielku byłaby zamaskowana przez zmianę, przebiegającą w liścieniach. Przypuszczenia te potwierdziłam badaniami nad całą rośliną grochu, łubinu żółtego i samymi liścieniami tych roślin. Fakty te również zaobserwowane zostały przez M. J. Prioskuriakowa i J. M. Mosołową (1952) na roślinach grochu cukrowego.

Innym zagadnieniem jest obecność glutationu utlenionego w suchych nasionach. S. P. Spragg i E. W. Yemm (1954) wykazali obecność utlenionej formy glutationu w nasionach grochu. Ja natomiast stwierdziłam, że jeżeli glutation był oznaczany w sproszkowanych nasionach obu roślin natychmiast po zmieleniu, to w wyciągach nie wykazywano obecności glutationu utlenionego. Jeżeli natomiast proszek z suchych nasion był przechowywany przez kilkanaście dni lub dłużej w temperaturze po-

kojowej lub w 4°, to można było w nim zawsze wykryć zmienne ilości glutationu utlenionego. Poza tym wykazałam pojawianie się formy utlenionej glutationu już w II fazie rozwojowej łubinu żółtego. Poziom utlenionego glutationu stanowi średnio 20% glutationu zredukowanego. Obecność glutationu utlenionego można było wykazać i w następnych fazach zarówno w całej roślinie, jak i w samych liścieniach. W grochu glutation utleniony był obecny w III i V fazie rozwojowej. Nieobecność utlenionego glutationu we wczesnym okresie rozwoju rośliny można wytłumaczyć działaniem reduktazy glutationowej. Równowaga reakcji chemicznej, którą prowadzi ten enzym, jest znacznie przesunięta na stronę powstawania glutationu zredukowanego, szczególnie w warunkach anaerobowych (Kohmann cyt. wg L. Mapson i wsp. 1951). Przypuszcza się, że warunki anaerobowe panują w czasie kiełkowania nasion do momentu pęknięcia okrywy nasiennej (S. P. Spragg i E. W. Yemm 1954). Występowanie glutationu w następnych fazach rozwojowych może być spowodowane przede wszystkim zmianą warunków anaerobowych na aerobowe. Być może w miarę rozwoju roślin zaczynają działać inne układy oksydo-redukcyjne, w których forma utleniona i zredukowana glutationu stanowią jedno z ogniw końcowego systemu utleniania tkankowego. Autorzy, zajmujący się dynamiką glutationu w czasie rozwoju grochu i ziemniaka, nie tłumaczyli mechanizmu powstawania glutationu w roślinach. Mechanizm ten został wyjaśniony przez G. C. Webstera (G. C. Webster 1953, G. C. Webster i wsp. 1954, 1955).

Należałoby się jeszcze zastanowić, czy oznaczane wartości glutationu nie pochodzą od innych substancji zastępujących glutation zredukowany w stosowanej przez mnie reakcji glioksalazowej. Wiadomo jest, że izoglutation i aspartion mogą zastępować glutation w reakcji glioksalazowej. Związki te zostały otrzymane syntetycznie przez G. L. Millera i wsp. (1941) i ich wpływ na reakcję glioksalazową stwierdzono tylko *in vitro* (O. K. Behrens 1941, T. H. Wieland i wsp. 1956). Związków tych nie stwierdzono w materiale biologicznym.

STRESZCZENIE

Oznaczano glutation całkowity i zredukowany w suchych nasionach, w całych roślinach i w samych liścieniach we wczesnych fazach rozwoju *Lupinus luteus* L. i *Pisum sativum* L.

1. Zawartość glutationu zredukowanego po przeliczeniu na gram suchej masy nasion dla *Lupinus luteus* L. wynosi $700 \mu\text{g} \pm 52$, a dla *Pisum sativum* L. $1585 \mu\text{g} \pm 23$.

2. W proszku ze zmielonych nasion obu roślin nie wykazano glutationu utlenionego.

3. W I fazie rozwojowej grochu hodowanego w kulturach wodnych, polowych i wazonowych poziom glutationu spada do wartości stanowiącej 54% ilości glutationu zawartego w suchym nasieniu. W następnych fazach rozwojowych od II—VI ilość glutationu całkowitego waha się od 813—945 μg na gram suchej masy, co stanowi średnio 55% ilości wyjściowej.

4. Zawartość glutationu całkowitego w I fazie rozwoju łubinu żółtego zarówno w całych roślinach, jak i kielkach oraz liścieniach wzrasta stopniowo, a w II fazie osiąga maksimum, które jest około dwukrotnie wyższe od poziomu glutationu w nasionach. W następnych fazach rozwojowych od III—V ilość glutationu maleje do wartości 26% poziomu wyjściowego.

5. Zawartość glutationu w siewkach grochu pozbawionych liścieni wzrasta trzykrotnie w III fazie rozwojowej w stosunku do wartości znajdującej się w suchym zarodku. W następnych fazach poziom glutationu spada poniżej wartości wyjściowej.

6. Poziom glutationu w liścieniach łubinu żółtego, pełniących we wczesnym okresie rozwoju funkcję pierwszych liści asymilujących wzrasta gwałtownie w II fazie rozwoju, a następnie spada poniżej wartości wyjściowej; natomiast ilość glutationu w samych liścieniach grochu obniża się sukcesywnie w miarę rozwoju roślin.

7. Zmiany w poziomie glutationu w obydwu roślinach mają charakter podobny do zmian odbywających się w ich liścieniach.

Panu profesorowi dr T. Baranowskiemu dziękuję za cenne rady i życzliwe zainteresowania w czasie wykonywania tej pracy.

Pani docent dr W. Mejbbaum-Katzenellenbogen dziękuję za krytyczne uwagi w czasie pisania pracy.

Zakład Chemii Fizjologicznej
Akademii Medycznej we Wrocławiu

(Wpłynęło dn. 26.4.1959 r.)

SUMMARY

The total and reduced glutathione of *Lupinus luteus* and *Pisum sativum* L. in dry seeds, whole plants and in the primary leaves at the early stages of development, have been determined.

1. The reduced glutathione content per gram of the dry mass of seeds was found to be $700 \mu\text{g} \pm 52$ for *Lupinus luteus* and $1585 \mu\text{g} \pm 23$ for *Pisum sativum* L.

2. No oxidized glutathione was found in the powder of grounded seeds of both plants.

3. In the 1-st development stage of pea in water, field and pot cultures, the glutathione level decreased to 54% of that in the dry seeds.

In the next development stages (II—VI) the total glutathione level varied from 813 to 945 μg per gram of dry mass and it was about 55% of the initial value.

4. The total glutathione content of the yellow lupine in the whole plant, germs and primary leaves in the I-st stage of development was increasing gradually and reached in the II-nd stage its maximum, being about twice higher then the glutathione content of the seeds. In the next stages (III—V) the glutathione content was found to be only 26% of the initial value.

5. The glutathione content in the pea seedlings, deprived of its primary leaves in comparison with that of the dry germ (embryo) increased three times in the III-rd development stage. In the next stages, the content decreased below its initial value.

6. In the primary leaves of yellow lupine acting as the first assimilating leaves in the early development stages, the glutathione level increased rapidly in the II developmental stage and subsequently decreased below the initial value; the glutathione value however in the primary leaves alone, was found to be decreased simultaneously with the plant development.

7. In the both plants the changes in the glutathione level are similar in character to the changes, taking place in their primary leaves.

*Dept of Physiological Chemistry
Medical Academy, Wrocław*

LITERATURA

- Barron E. S. G., 1951, *Advances in Enzymology* 11: 248—260.
Behrens O. K. 1941, *J. Biol. Chem.* 141: 503—508.
Bertho A., Grassmann A. W., 1936, *Biochemisches Praktikum*, Berlin und Leipzig.
Bhattacharya S. K., Robson J. S., Stewart C. P., 1955, *Biochem. J.* 60: 696—702.
Binkley F., Olson C., 1951, *J. Biol. Chem.* 188: 451.
Bricas E., Fromageot Cl., 1953, *Advances in Protein Chemistry* 8: 20—23.
Dohan J. S., Woodward G. E., 1939, *J. Biol. Chem.* 129: 393—401.
Friedemann T. E., 1927, *J. Biol. Chem.* 73: 331—334.
Glick D., 1955, *Methods of Biochemical Analysis*, Interscience Publishers New York, II: 259—278.
Grassmann W., Heyde W., 1932, *Z. Physiol. Chem.* 189: 69—90.
Heppel L. A., Hilmo R. J., 1950, *J. Biol. Chem.* 183: 129—138.
Hopkins F. G., 1921, *Biochem. J.* 15: 286.
Hopkins F. G., Morgan E. J., 1943, *Nature*, 152, 288.
Hopkins F. G., Morgan E. J., 1945, *Biochem. J.* 39: 320—324.
Krimsky I., Racker E., 1952, *J. Biol. Chem.* 198: 721.
Kohmann cyt. wg Mapson L. W., Goddard D. R., 1951, *Biochem. J.* 49: 592.
Lawrance J. M., 1950, *Arch. Biochem.* 27: 1—5.

- Miller G. L., Behrens O. K. du Vigneaud V., 1941, J. Biol. Chem. 140: 411—416.
- Neuberg C., 1913, Biochem. Z. 49: 502—506.
- Neuberg C., Faerber E., Levite A., Schwenk E., 1917, Biochem. Z. 83: 244—268.
- Proskuriakow N. I., Mosołowa I. M., 1952, Dokł. AN ZSRR 87: 465—468.
- Racker E., 1954, Glutathione as a Coenzyme in Intermediary Metabolism, New York.
- Rokosz A., 1955, Wiad. Chem. 12: 635—641.
- Schroeder E. F., Woodward G. E., 1939, J. Biol. Chem. 129: 283—296.
- Spragg S. P., Yemm E. W., 1954, Biochem. J. 58: xi—xii.
- Strittmatter Ph., Ball E. G., 1955, J. Biol. Chem. 213: 445—461.
- Webster G. C., 1953, Plant Physiol. 28: 729.
- Webster G. C., Varner J. E., 1954 Arch. Biochem. Bioph. 52: 22—32.
- Webster G. C., Varner J. E., 1955, Arch. Biochem. Bioph. 55: 95—103.
- Wieland Th., Pfeleiderer G., Lau H. H., 1956, Biochem. Z. 327: 393—406.
- Woodward G. E., Fry E. G., 1932, J. Biol. Chem. 97: 465—482.