Zmienność frakcji azotowych w izolowanych zarodkach *Lupinus mutabilis* Sweet

*The change of organic nitrogen fractions in isolated
Lupinus mutabilis Sweet embryos*

J. ROGOZIŃSKA

Problem metabolizmu azotowego łubinu badany był przez wielu autorów.

Bonnet (1929) badając metabolizm azotowy łubinu żółtego w wczesnych fazach kiełkowania stwierdził znaczny wzrost azotu aminowego i amidowego w drugim dniu kiełkowania.

Późniejsze fazy zmiany składników azotowych zachodzące w łubinie badała McKie (1931). Stwierdziła ona najniższe wartości dla azotu białkowego w 18 dniu i zmniejszenie azotu aminowego i amidowego począwszy od ósmego dnia.

McRary (1940) badając metabolizm azotowy nie izolowanych zarodków łubinu stwierdził, że białko ulega przemieszczeniu z liścieni do rozwijających się właściwych zarodków przez pierwszych dwanaście dni i gromadzi się tam jako aminokwasy i amidy, przy czym minimum azotu białkowego w zarodku przypada w dziewiątym dniu. Ponieważ McRary badał metabolizm azotowy liścieni i całych zarodków, wydawało się ciekawe zbadanie zmian zachodzących w izolowanych zarodkach, a więc pozbawionych źródła odżywczego, jakie stanowią liścienie w pierwszym okresie wzrostu rośliny, analizując oddzielnie pęd i korzeń. Maróti i in. (1957) stwierdził w strefach merystematycznych korzeni młodych roślin fasoli szybszy podział komórek i szybsze ich różnicowanie, szybszy wzrost na długość i zwiększenie masy. Różnice te poparte były intensywniejszą przemianą materii w korzeniu niż w łodydze.

Celem niniejszej pracy jest więc dostarczenie danych odnoszących się do metabolizmu azotowego izolowanych zarodków, jego związku ze wzrostem i rozwojem organów.

MATERIAŁ I METODYKA

Materiał wyjściowy stanowiły nasiona łubinu zmiennego (*Lupinus mutabilis* Sweet), otrzymane od dra Nowackiego z Zakładu Hodowli Roślin PAN.

Zarodki izolowano w sposób podobny, jak w jednej z poprzednich prac (Rogozińska 1958). Po powierzchniowej 10 min. sterylizacji 0,2% sublimatem, nasiona moczo no przez 12 godzin celem spęcznienia, po czym zarodki izolowano i wyszczepiano umieszczając po 3 w probówkach, w pozycji pionowej, zagłębiając radikulę na 1,5—2,0 mm w pożywce. Stosowano pożywkę Hellera, do której dodawano 4% sacharozy i 1% agaru. Ilość azotu w agarze wynosiła 0,26%. W pożywkach bezazotowych azotan sodu zastąpiono dla zrównoważenia ciśnienia osmotycznego pożywki odpowiednią ilością chlorku sodu. Po 2, 7, 9 i 13 dniach inkubacji w temperaturze 25°C w ciemności, odcinano korzenie od hypokotyli, mierzono, ważono i oznaczano azot całkowity i rozpuszczalny metodą mikro-Kjeldahla. Do oznaczeń azotu całkowitego odważano 20 mg suchej masy, dodawano około 60 mg katalizatora selenowego oraz 0,5 ml stężonego kwasu siarkowego i spalano w probówkach w bloku glinowym. Amoniak oddestylowywano do 5 ml 2% kwasu borowego, po czym miareczkowano n/28 HCl, wobec wskaźnika Tashiro. Azot rozpuszczalny ekstrahowano etanolem z jednego grama świeżej masy. Stężenie etanolu w homogenizacie wynosiło 75%. Po odwirowaniu supernatant dopełniano do 10 ml, po czym brano po 3 ml do równoległych analiz na azot rozpuszczalny. Oznaczano go sposobem opisanym wyżej dla azotu całkowitego. Azot białkowy obliczano z różnicy azotu całkowitego i rozpuszczalnego.

Redukcji azotanów nie przeprowadzano i azot rozpuszczalny azotanów nie obejmuje.

Wszystkie dane stanowią średnią z dwóch powtórzeń obejmujących po 40 zarodków.

Błąd średni średniej arytmetycznej, wynikający z różnic indywidualnych zarodków, wynosił 1,8—2,3%, a poszczególnych oznaczeń azotu 2,1%.

I. Charakterystyka izolowanych zarodków

Charakterystykę zarodków w momencie izolowania, tzn. po 12-godzinnym spęcznieniu nasion przedstawia poniższa tabela:

świeża masa mg/zarodek
fresh weight mg/embryo

30,3

sucha masa mg/zarodek	10,0
dry weight mg/embryo	
% suchej masy	32,9
% dry weight	
N całkowity μg /zarodek	800
N total μg /embryo	
N rozpuszczalny μg /zarodek	12
N soluble μg /embryo	
N nie rozpuszczalny μg /zarodek	788
N nonsoluble μg /embryo	
N całkowity w % suchej masy	8,0
N total % dry weight	
N rozpuszczalny w % N całkowitego	15,2
N soluble % N total	

II. Wzrost zarodków na pożywce pełnej z NaNO_3 (A) i bez NaNO_3 (B)

1. Wzrost na długość

Po dwóch dniach hodowli hypokotyle i korzenie bezliścieniowych roślinek osiągają w przybliżeniu tę samą długość. W miarę upływu cza-

Ryc. 1. Wzrost wyizolowanych zarodków łubinu w mm na organ, hodowanych na pożywce z NaNO_3 (a) i bez NaNO_3 (b), po 2, 7, 9 i 13 dniach hodowli
Growth of isolated embryos in mm/organ on medium with NaNO_3 (a), and without NaNO_3 (b), after 2, 7, 9 and 13 days of cultivation

Ryc. 2. Bezliścieniowe siewki *Lupinus mutabilis* hodowane na pożywce z NaNO_3 (a) i bez NaNO_3 (b) po 2, 7, 9 i 13 dniach hodowli

Cotyledon-less seedlings of *Lupinus mutabilis* grown on medium with NaNO_3 (a) and without NaNO_3 (b), after 2, 7, 9 and 13 days of cultivation

su, na pożywkach z niedoborem azotu objawia się zahamowanie wzrostu zarówno hypokotyli, jak i korzeni. Korzenie nie reagują więc w charakterystyczny sposób wydłużeniem na brak azotu. Tempo wzrostu siewek szczegółowiej ilustrują ryc. 1 i 2.

Począwszy od 9 dnia hodowli na korzeniach zarodków rosnących na pożywce z NaNO_3 rozwijały się korzenie boczne w 56%, natomiast nie pojawiały się na korzeniach zarodków hodowanych bez NaNO_3 . Po upływie 13 dni korzenie boczne obecne były również na korzeniach zarodków pochodzących z pożywek pozbawionych NaNO_3 , jednak stanowiły one tu tylko 14%, podczas gdy na pożywkach z NaNO_3 92%.

2. Przyrost świeżej i suchej masy

W miarę rozwoju zarodków hodowanych na pożywce z NaNO_3 następuje normalny i proporcjonalny wzrost ich świeżej i suchej masy. Za-

Ryc. 3. Świeża i sucha masa hypokotyli i korzeni zarodków w mg/organ, na pożywce z NaNO_3 (A) i bez NaNO_3 (B), po 2, 7, 9 i 13 dniach hodowli

Fresh and dry hypocotyl and root weights in mg/organ on medium with NaNO_3 (A) and without NaNO_3 (B) after 2, 7, 9 and 13 days of cultivation

rodki pozbawione NaNO_3 wykazują mniejszy przyrost. Zahamowanie przyrostu świeżej, jak i suchej masy zwiększa się w miarę upływu czasu. Przedstawia to dokładniej wykres na ryc. 3.

III. Metabolizm azotowy

1. Zarodki hodowane na pożywce z NaNO_3

Dane odnoszące się do azotu całkowitego, wyrażone w $\mu\text{g}/\text{organ}$ suchej masy, wykazują zwiększenie jego ilości zarówno w hypokotylu, jak i w korzeniu od momentu wyszczepienia do końca badanego okresu. W 9 dniu hodowli krzywa dla azotu rozpuszczalnego wykazuje maksimum dla hypokotylu i minimum dla korzenia. Ilość azotu białkowego zmniejsza się do 9 dnia w hypokotylu, po czym wzrasta, natomiast w korzeniu wzrasta przez cały okres.

Ryc. 4. Zmienność frakcji azotowych po 2, 7, 9 i 13 dniach hodowli w $\mu\text{g}/\text{organ}$ suchej masy

The change in nitrogenous fractions after 2, 7, 9 and 13 days of cultivation in $\mu\text{g}/\text{organ}$ dry weight

2. Zarodki hodowane na pożywce pozbawionej NaNO_3

Ilość azotu całkowitego w hypokotylu zwiększa się tylko do 9 dnia hodowli, po czym spada poniżej wartości odpowiadającej drugiemu dniu. Odwrotnie w korzeniu, do 9 dnia obserwujemy zmniejszenie ilości azotu całkowitego, a następnie dopiero zwiększenie. Zwiększenie ilości azotu w zarodkach hodowanych na pożywce pozbawionej NaNO_3 nastąpiło na skutek pobrania azotu z agaru, w którym — jak wykazały analizy wstępne — jest 2,6 mg azotu na 1 g agaru, co w przeliczeniu na pożywkę znajdującą się w jednej probówce odpowiadałoby 0,325 mg azotu, a więc na jeden zarodek przypadałoby 0,108 mg azotu. Zwiększenie ilości azotu całkowitego w zarodkach hodowanych na pożywkach pozbawionych NaNO_3 świadczy o wykorzystaniu tego źródła azotu w metabolizmie zarodków. Jednak w 13 dniu ilość azotu spada do wartości wyjściowej zarodka, co wytłumaczone być może wydzielaniem azotu do pożywki. Fries i Kandler stwierdzili również w sterylnej hodowli organów wydzie-

Tabela 1

Zmienność azotu całkowitego w % suchej masy i rozpuszczalnego w % azotu całkowitego
The change in total nitrogen in % dry weight and soluble in % total nitrogen

Czas w dniach Time in days	Organ	N całkowity w % suchej masy Total N in % dry weight		N rozpuszczalny w % N całkowitego Soluble N in % total N	
		+ NaNO_3	— NaNO_3	+ NaNO_3	— NaNO_3
2	hypokotyl	8,2	8,1	19,4	18,3
	hypocotyl				
	korzeń root	4,7	4,3	28,1	31,1
7	hypokotyl	6,4	6,2	30,2	27,9
	hypocotyl				
	korzeń root	2,3	1,4	24,8	16,6
9	hypokotyl	5,9	5,7	38,7	37,9
	hypocotyl				
	korzeń root	1,8	1,2	17,2	14,6
13	hypokotyl	5,5	5,0	30,6	29,3
	hypocotyl				
	korzeń root	1,3	1,0	17,1	14,2

lanie zarówno aminokwasów, jak i kwasów nukleinowych do pożywki. Ilość azotu białkowego w hypokotylach i korzeniach zmniejszała się do dziewiątego dnia hodowli, po czym wzrastała.

DYSKUSJA

McR a r y (1940) wykazał w pracy nad metamolizmem azotowym nie izolowanych zarodków, że azot przemieszczany jest z liścieni do zarodków przez około pierwszych 12 dni, przy czym przyrost azotu całkowitego zarodków idzie w parze ze zmniejszeniem ilości azotu białkowego liścieni. Azot białkowy zarodków i azot aminowy, jak i amidowy azot liścieni, wykazywał stosunkowo małe zmiany w 15-dniowym okresie hodowli. Stężenie azotu aminowego było dość stałe w zarodkach obniżając się nieco w 15 dniu. Również stężenie amidów, z wyjątkiem drugiego dnia hodowli, było w zarodkach stałe do 12 dnia, po czym obniżyło się. Natomiast stężenie amidów w liścieniach stopniowo się zmniejszało. McR a r y badał zmiany zachodzące w całych zarodkach, nie oddzielał pędu od korzenia. R o b i n s o n i in. (1952) stwierdzili w aktywnej fazie wzrostu w komórkach korzenia grochu 2—3-krotne zwiększenie zawartości białka w stosunku do ilości początkowej. Zwiększenie to jest zgodne z maksimum wzrostu na długość korzenia. P e t s c h e n i z i n a (1951) wskazuje na związek między przyrostem suchej masy i syntezą białka, jednak synteza białka jest wolniejsza. Istnieje więc korelacja między wzrostem komórki, organu i frakcjami azotu, a mianowicie białka.

Spśród niewielu prac o przewyższającej syntezie korzenia w stosunku do pędu na większą uwagę zasługuje praca M a r ó t i e g o (1957), przeprowadzona na 6-dniowych siewkach fasoli, a następnie izolowanych pędach i korzeniach. Autor stwierdził, że korzeń rozporządza lepszym zaopatrzeniem w azot niż pęd zarówno w stosunku do wartości absolutnych organu, jak i w przeliczeniu na jedną komórkę. Jednakże azot wyrażony w % suchej masy nie wykazuje w korzeniu wyższych wartości. Wartości przeliczone na jedną komórkę, szczególnie w hodowlach izolowanych, wykazują, że każda komórka korzenia zawierała o 100% więcej azotu niż komórka pędu. Azot białkowy stanowił 50—70% azotu całkowitego. Zreasumowane wyniki M a r ó t i e g o wykazują więc, że ilość azotu białkowego oraz azotu całkowitego, tak na cały organ, jak i na komórkę, większa jest w korzeniu niż w pędzie zarówno w 6-dniowych siewkach, jak i w następnie izolowanych organach.

Wyniki M a r ó t i e g o są w zgodzie z pracami B o n n e r a i F r i e s a (M a r ó t i 1957), stwierdzającymi, że korzenie zawierają więcej azotu białkowego niż pędy.

Z danych przedstawionych w niniejszej pracy wynika, że w hypokotylach i korzeniach izolowanych zarodków łubinu, hodowanych na pożywkach bez azotanu sodu, zmniejsza się ilość azotu białkowego do 9 dnia hodowli. Po 9 dniach hodowli następuje zwiększenie syntezy białka zarówno w korzeniach, jak i hypokotylach. Podobne wyniki otrzymał McRary w badaniach przeprowadzonych na całych zarodkach łubinu nie izolowanych, hodowanych w wodzie. W hypokotylach zarodków hodowanych na pożywce z azotanem sodu, podobnie jak w hodowanych na pożywce pozbawionej tego związku ilość azotu białkowego do 9 dnia również opada. Inaczej natomiast zachowuje się korzeń. Tu ilość azotu białkowego wzrasta w całym okresie hodowli. W końcu badanego okresu, tzn. w 13 dniu hodowli, sumaryczna ilość białka korzenia i hypokotyli zarodków, hodowanych na pożywce z NaNO_3 i bez niego, nie osiąga jeszcze wartości wyjściowej. W przeliczeniu na suchą masę organu ilość azotu całkowitego, jak i białkowego, jest w całym okresie hodowli wielokrotnie wyższa w hypokotylu niż w korzeniu, czyli wprost przeciwnie aniżeli stwierdził Maróti w 6-dniowych siewkach fasoli.

Zależność, jaką stwierdziła Petschenizina (1951), między ilością azotu białkowego a przyrostem suchej masy, a Robinson (1952) między wzrostem na długość a ilością azotu białkowego, jak wynika również z przedstawionej pracy, istnieje, chociaż nie zawsze jest wprost proporcjonalna. Przyrost suchej masy, jak i wzrost na długość, zwiększał się proporcjonalnie w miarę upływu czasu, natomiast krzywa dla azotu białkowego w początkowym okresie obniżała się, po czym od 9 dnia hodowli następował jej wzrost.

Z zawartością białka były też związane różnice morfologiczne. Zarodki hodowane bez azotanu sodu, gdzie ilość azotu białkowego była przez cały czas hodowli niższa niż w zarodkach hodowanych na pożywce z azotanem sodu, osiągały po 13 dniach hodowli długość 82 mm, podczas gdy hodowane na pożywce z azotanem sodu 127 mm. Zarodki hodowane bez azotanu sodu wykazywały również zahamowanie tworzenia korzeni bocznych.

Reasumując osiągnięte wyniki, stwierdzamy w ciągu całego 13-dniowego okresu hodowli wielokrotnie wyższą zawartość azotu zarówno białkowego, jak i całkowitego w hypokotylu siewek niż w korzeniu. Związane jest to z większą masą i większym wzrostem na długość hypokotyli niż korzeni w całym okresie hodowli.

STRESZCZENIE

1. Przedstawione są dane o wartościach i rozprzestrzenieniu głównych składników azotowych zarodków łubinu zmiennego w kolejnych fazach wzrostu w 13-dniowym okresie hodowli.

2. Krzywa wzrostu zarodków na długość, jak i przyrost świeżej i suchej masy, zwiększają się proporcjonalnie do upływu czasu, podczas gdy ilość azotu białkowego, podobnie jak stwierdził McR a r y w nie izolowanych zarodkach łubinu, do dziewiątego dnia hodowli opada, po czym następuje jej wzrost.

3. Zarodki hodowane na pożywce bez azotanu sodu wykazują duże różnice morfologiczne, jak i biochemiczne w porównaniu z zarodkami hodowanymi na pożywce pełnej z azotanem sodu.

*Zakład Fizjologii Roślin
Uniwersytetu w Poznaniu*

(Wpłynęło dn. 3.6. 1960 r.)

SUMMARY

1. The data show the values and the distribution of chief nitrogenous constituents of lupinus embryos in different periods of a thirteen days cultivation.

2. The longitudinal embryo growth, as well as the increase of fresh and dry weight, are proportional to time, while the protein nitrogen, similar to the data in non isolated lupinus embryos given by McR a r y, decreases up to the ninth day of cultivation, increasing, however after that period.

3. Embryos cultivated on medium without NaNO_3 differ morphologically and biochemically from those cultivated on medium with NaNO_3 .

LITERATURA

- Barbacki S., 1952, Łubin, PWRIL Warszawa.
Bonnet R., 1929, L'évolution de l'azote au cours de la germination, Bull. Soc. Chim. Biol. 2: 1025—1060.
Duhamet L., 1946, Recherches sur l'action de l'hétéroauxine et de la colchicine sur la croissance de racines isolées de *Lupinus albus*, Revue de Cytologie et de Cytophysologie Végétales 8: 35—75.
Maróti M., 1957, Der Nitrogenstoffwechsel in der jungen Wurzel und im Spross I. Acta Bot. Acad. Scien. Hung. 3: 275—291.

- McKie P., 1931, The nitrogen metabolism of the lupin seedling, *Biochem. Jour.* 25: 2182—2188.
- McRary W., 1940, Nitrogen metabolism of the plant embryo, *Bot. Gaz.* 102: 89—96.
- Nowacki E., 1958, Łubin zmienny — *Lupinus mutabilis* Sweet — morfologia i fizjologia gatunku, *Roczn. Nauk Roln.* 79: 173—185.
- Pětschenizina A., 1951, K woprosu o roli uglikerodow w sintiezie bielkow rastienij, *Inst. Fizjol. Rast.* 212—241.
- Robinson E., Brown R., 1952, The development of the enzyme complement in the growing root cells, *J. Exp. Bot.* 3: 556.
- Rogozińska J., 1958, Hamujący wpływ o-aminoazotoluenu na wzrost bezliściennych zarodków rzodkiewki hodowanych *in vitro*, *Acta Soc. Bot. Pol.* 27: 103—113.
- Steward F. C., Wetmore R. H., Thompson J. F., Nitsch U. P., 1954 A quantitative paper chromatographic study of nitrogenous components of shoot tips, *Amer. J. Bot.* 41: 123—134.