Wpływ gibereliny na zawartość węglowodanów w epikotylach grochu

*The influence of gibberellin on the carbohydrates content in peas
epicotyls*

W. MACIEJEWSKA-POTAPCZYKOWA, T. WILUSZ, H. ŁUKASIAK

WSTĘP

Mechanizm działania giberelin nie jest jeszcze całkowicie wyjaśniony, a dotychczasowe wyniki badań tego zagadnienia prowadzą często do sprzecznych konkluzji, szczególnie jeśli chodzi o kwestię, czy związki te są tylko czynnikami wpływającymi na wydłużanie się komórek, czy również są stymulatorami ich podziałów.

Wyniki dawniejszych prac nad mechanizmem działania giberelin (Yabutta i Hayashi 1939 a, b, Hayashi 1953 i Yamaki 1957 — cytowani przez Greulacha 1958; Brian 1954, Sumiki 1952, Kato 1953, Stowe i Yamaki 1957 — cyt. przez Stowe 1960) wskazywały raczej, że gibereliny wywierają wpływ tylko na wydłużanie się komórek.

Badania jednak innych autorów nad fizjologicznym działaniem tych związków (Sachs i współpr. 1957, 1959, Bradley i Crane 1957, Schroeder i Spector 1957, Gattrige i Thompson 1958, Greulach i Haesloop 1958, Humphries 1960, Nickel 1958) wskazują wyraźnie, że gibereliny działają na wydłużanie się łodyg poprzez stymulację podziałów komórek międzywęzli.

Celem niniejszej pracy było przebadanie wpływu gibereliny na zawartość składników błon komórkowych: pektyn i celulozy. Zmiany bowiem w zawartości tych związków wyjaśniłyby może rolę gibereliny, jaką mogłaby ona odgrywać w procesie zwiększania się długości komórek bądź w przyspieszaniu cytokinezy.

Wpływ gibereliny porównywano z wpływem kwasu β -indolooctowego. Porównanie zmian w zawartości składników błon komórkowych roślin stymulowanych gibereliną i kwasem β -indolooctowym, jako stymulato-

rem przyrostu długości komórek, mogłoby przyczynić się do wyjaśnienia tego zagadnienia. Porównywano również wpływ giberelin i wpływ światła na zawartość pektyn i celuloz.

MATERIAL I METODYKA BADAŃ

Materiał badań nad działaniem omawianych substancji wzrostowych stanowiły etiolowane epikotyle grochu, które w poprzednich naszych doświadczeniach (Maciejewska-Potapczykowa i Łukasiak 1959) silnie reagowały na działanie kinetyny i kwasu β -indolooctowego znacznymi przesunięciami w zawartości węglowodanów poszczególnych grup. Kosztem jedno- i dwucukrowców zwiększała się zawartość wielocukrów: skrobi oraz polisacharydów, wchodzących w skład błon komórkowych przede wszystkim błonnika.

Do frakcjonowania cukrowców w badanym materiale posługiwano się opisaną przez Biełozierskiego (1954) metodą oznaczania 5 grup węglowodanów w jednej odważce. Schemat tej metody, oparty na różnych właściwościach fizycznych i chemicznych węglowodanów, opisaliśmy szczegółowo w cytowanej już wyżej pracy (Maciejewska-Potapczykowa i Łukasiak 1959).

Przy oznaczaniu węglowodanów poszczególnych frakcji posłużono się metodą Hegedorna-Jansena.

OPIS DOŚWIADCZEŃ

Nasiona grochu (*Pisum sativum* L. odm. „Cud Kalwadoru”) moczono w wodzie, a następnie wysadzano dość gęsto na około 2 cm warstwie wilgotnego piasku i umieszczano w ciemności w temperaturze 20—22°C. W tych warunkach nasiona kiełkowały szybko i dość równomiernie, ale w trakcie wzrostu nie wszystkie epikotyle osiągały jednakową długość. Długość ta wahała się w granicach 3—8 cm. Po 4—5 dniach epikotyle ścinano i segregowano według wielkości. Z górnej ich części wycinano odcinki o długości jednego centymetra i umieszczano je (po 4—5 g) w szalkach Petriego, napełnionych pożywką Knopa z dodatkiem roztworu mikroelementów A—Z (według Hoaglanda i Snydersa) oraz glukozy w ilości 2 i 6 g/l i badanych substancji wzrostowych w stężeniach:

 kwas β -indolooctowy 5 μ g/ml,

 giberelina (sól potasowa kwasu giberelinowego pod nazwą „Gibrel” produkcji Merck) 10 μ g/ml.

Hodowle umieszczano w ciemności w temperaturze 20—22°C.

Przy rozmieszczaniu odcinków epikotyli w szalkach zwracano uwagę na to, aby każda hodowla zawierała jednakową ilość wycinków epikotyli z poszczególnych wysegregowanych grup. Wychodzono bowiem z założe-

nia, że epikotyle o różnej wielkości mogą z jednej strony charakteryzować się różną wrażliwością na badane substancje wzrostowe, z drugiej zaś mogą zawierać niejednakową ilość węglowodanów. Do podobnego wniosku upoważnia fakt, że pierwsze doświadczenia niniejszej pracy wykazały różną zawartość węglowodanów w epikotylach o różnej długości.

W celu wyeliminowania zakażeń epikotyle przemywano codziennie strumieniem bieżącej wody i przenoszono do świeżo przygotowanych pożywek. Ponieważ wycinki pływały po powierzchni roztworów, dostęp tlenu był zapewniony.

Ten sposób hodowli umożliwiał przetrzymywanie epikotyli w ciągu 4—5 dni. Po upływie tego czasu następowało wiotczenie wycinków. Lepsze wyniki dawały hodowle epikotyli między warstwami bibuły filtracyjnej, nasyczonej pożywką z dodatkiem substancji wzrostowych, gdyż umożliwiały kontynuowanie hodowli w ciągu 9—10 dni.

W celu zbadania wpływu światła na zawartość składników błon komórkowych w epikotylach w dalszych doświadczeniach poddawano je codziennie pięciominutowemu działaniu światła. Ponieważ doświadczenia wykonywano w laboratorium w okresie zimowym, przeto działanie światła dziennego, dochodzącego przez szyby, wzmacniano działaniem promieni UV (Lampa Famed I, 220 V, 2,6 A, 50 c/s w odległości ok. 70 cm). Po pięciu lub po dziesięciu dniach hodowli epikotyle przemywano wodą i osuszano bibułą filtracyjną. Następnie przygotowywano jedno- i dwugramowe odważki epikotyli. Odważki jednogramowe przeznaczano do oznaczeń suchej masy, a w pozostałych oznaczano zawartość węglowodanów. Wyniki doświadczeń zestawiono w tabelach.

Doświadczenie I. W epikotylach stymulowanych gibereliną nastąpił spadek zawartości węglowodanów frakcji I i II przy jednoczesnym wzroście zawartości frakcji IV i V (tab. 1).

Doświadczenie II. We frakcji I epikotyli stymulowanych kwasem β -indoloocetowym (IAA) nastąpił nieznaczny wzrost zawartości węglowodanów; większy przyrost ich zawartości nastąpił w epikotylach stymulowanych mieszaniną gibereliny i IAA (tab. 2). Epikotyle stymulowane IAA zawierają we frakcji IV średnio o 23% więcej węglowodanów niż epikotyle kontrolne. Podobnie we frakcji V wzrost zawartości węglowodanów nastąpił w epikotylach stymulowanych IAA (47%), a w doświadczeniach z gibereliną i IAA wynosił on 37%.

Doświadczenie III. W tabeli 3 obserwujemy spadek zawartości węglowodanów frakcji II w epikotylach stymulowanych gibereliną o 20%, w epikotylach poddanych działaniu światła i promieni UV o 12%, a w epikotylach stymulowanych gibereliną i poddanych działaniu światła i promieni UV o 9%. We frakcji IV największy przyrost

Tabela 1 — Table 1

Zawartość węglowodanów 4 grup w epikotylach grochu „Cud Kalwadoru”

(w % w stosunku do suchej masy)

Content of carbohydrates of 4 groups in peas „Cud Kalwadoru“ epicotyls (% of dry weight)

Rodzaj doświadczenia Kind of experiment	Zawartość węglowodanów 4 grup Content of carbohydrates of 4 groups			
	I	II	IV	V
Kontrola } A Control }	5,55	3,89	12,37	19,42
Giberelina } Gibberellin }	4,40	2,00	13,47	22,00
Kontrola } B Control }				
Giberelina } Gibberellin }	9,61	3,98	13,53	20,42
Kontrola } C Control }				
Giberelina } Gibberellin }	6,00	4,80	15,60	25,15
Kontrola } D Control }				
Giberelina } Gibberellin }	10,21	2,01	14,56	28,43
Kontrola } Control }				
Giberelina } Gibberellin }	8,64	1,46	17,22	32,14
Kontrola } Control }				
Giberelina } Gibberellin }	8,40	0,95	13,03	24,54
Kontrola } Control }				
Giberelina } Gibberellin }	8,10	1,02	14,30	27,81
Kontrola } Control }				

Długość epikotyli (Length of epicotyls): A — 6-8 cm, B — 4-6 cm, C — 2-4 cm, D — 2-4 cm, epikotyle z liśćmi (epicotyls with leaves);

Zawartość glukozy w pożywce: 0,2/.

Content of glucose in nutrient solution: 0,2/.

Tabela 2 — Table 2

Zawartość węglowodanów 4 grup w epikotylach grochu „Cud Kalwadoru”

(w % w stosunku do suchej masy)

Content of carbohydrates of 4 groups in peas „Cud Kalwadoru“ epicotyls (% of dry weight)

Rodzaj doświadczenia Kind of experiment	Zawartość węglowodanów 4 grup Content of carbohydrates of 4 groups			
	I	II	IV	V
Control	13,70	1,63	10,95	14,90
IAA	14,30	1,35	13,50	22,1
IAA+giberelina	16,00	1,60	13,70	20,00
IAA+gibberelin				

Zawartość glukozy w pożywce: 0,6/.

Content of glucose in nutrient solution: 0,6/.

Tabela 3—Table 3

Zawartość węglowodanów 4 grup w epikotylach grochu „Cud Kalwadoru”

(w % w stosunku do suchej masy)

Content of carbohydrates of 4 groups in peas „Cud Kalwadoru” epicotyls (% of dry weight)

Rodzaj doświadczenia Kind of experiment	Zawartość węglowodanów 4 grup Content of carbohydrates of 4 groups			
	I	II	IV	V
Kontrola				
Control	11,20	3,85	7,39	10,71
Giberelina				
Gibberellin	8,97	4,26	7,80	14,95
Światło+ultrafiolet				
Light+UV	9,28	4,00	8,30	13,70
Giberelina+światło+UV				
GA+Light+UV	8,15	4,20	8,55	12,70

węglowodanów stwierdzamy w epikotylach stymulowanych gibereliną, światłem i promieniami UV (15%). We frakcji V największy przyrost węglowodanów nastąpił w epikotylach stymulowanych gibereliną (37%).

Wszystkie doświadczenia opisane w niniejszej pracy wykonywane były co najmniej w dwu powtórzeniach. Otrzymane wyniki były zupełnie zgodne, przeto dla uniknięcia przytaczania w tekście bardzo zbliżonych rezultatów poszczególnych powtórzeń w opisie doświadczeń umieszczono tylko po jednej tabeli ilustrującej wyniki każdego eksperymentu.

DYSKUSJA

Gibereliny stymulują wiele procesów fizjologicznych: fotosyntezę (Brian 1959), syntezę związków azotu, celulozy i hemiceluloz (Sumiki 1955). Ergle (1958) stwierdził, że pod wpływem giberelin wzrasta zawartość węglowodanów w łodygach i ogonkach liściowych bawełny. Badania Sayeda (1959) wskazują również na wzrost ogólnej zawartości węglowodanów w tkankach roślinnych, stymulowanych giberelinami. Gibereliny, wpływając na zwiększenie zawartości węglowodanów u roślin, przyczyniają się prawdopodobnie i do wzrostu zawartości cukrowców, wchodzących w skład błon komórkowych zarówno u komórek starszych, które w trakcie wzrostu zwiększają swoją objętość, jak i nowo powstających.

W przypadku gdyby stymulujący wpływ giberelin polegał na przyspieszaniu podziałów komórek, można by było spodziewać się znacznego przyrostu frakcji pektyn, bowiem zakładanie się błon komórkowych w procesie podziałów komórek rozpoczyna się od powstawania cieniut-

kiej warstewki, złożonej ze związków pektynowych, która to warstewka daje początek blaszce środkowej, składającej się z pektynianów wapniowych i magnezowych (B o n n e r 1950). Przy przewodzie podziałów komórkowych nad ich wydłużaniem się stosunek frakcji celulozowej do pektynowej powinien być mniejszy niż w przypadku odwrotnym. Wydłużanie się bowiem komórek odbywa się przez rozciąganie błony komórkowej, której szkielet stanowi siateczka celulozowa i wbudowywanie się w nią nowych cząsteczek celulozy, czyli zachodzi ono przy znacznym wzroście zawartości celulozy.

Wyniki niniejszej pracy wskazują na znaczne przesunięcia między poszczególnymi grupami cukrów w epikotylach stymulowanych gibereliną. W doświadczeniu I (tab. 1) w epikotylach stymulowanych tym związkiem nastąpił znaczny spadek zawartości węglowodanów frakcji I. Nieznaczny spadek nastąpił również w zawartości węglowodanów frakcji II, z wyjątkiem doświadczenia B, w którym zanotowano wzrost tej zawartości. Wzrost ten jednak mógłby pochodzić z niecałkowitego wyekstrahowania frakcji I z epikotyli stymulowanych gibereliną, która to frakcja mogła podczas ekstrakcji wodą przejść częściowo do frakcji II. Przypuszczenie to potwierdza fakt, że suma frakcji I i II w epikotylach stymulowanych gibereliną wykazuje spadek zawartości węglowodanów w stosunku do sumy tych frakcji w kontroli.

W epikotylach stymulowanych gibereliną nastąpił znaczny przyrost zawartości składników błon komórkowych zarówno pektyn, jak i celuloz.

Charakterystyczne jest, że epikotyle o różnej długości zawierają różne ilości węglowodanów. Największą zawartość cukrowców wykazywały wycinki z epikotyli najkrótszych (2—3 cm), które okazały się również najbardziej wrażliwe na działanie gibereliny. W tej grupie epikotyli stwierdzono największe różnice w zawartości składników błon komórkowych między epikotylami kontrolnymi i stymulowanymi gibereliną.

Przy większej ilości glukozy w pożywce (0,6%), w doświadczeniu II, zawartość węglowodanów frakcji I wzrosła w epikotylach stymulowanych IAA oraz mieszaniną IAA i gibereliny. Wzrost ten nastąpił prawdopodobnie na skutek intensywniejszego wsysania wody i rozpuszczonej w pożywce glukozy przez komórki epikotyli. Znany jest bowiem fakt, że IAA zwiększa intensywność pobierania wody przez komórki (H a c k e t t 1952, 1953). Zawartość frakcji II nie uległa w porównaniu z kontrolą większym zmianom. We frakcji natomiast IV i V epikotyli stymulowanych IAA i IAA+giberelina nastąpił znaczny wzrost zawartości węglowodanów.

Wzrost zawartości pektyn był większy w epikotylach stymulowanych mieszaniną tych związków niż w epikotylach stymulowanych samym IAA. Odwrotnie z celulozą: największy przyrost jej zawartości wystąpił w epikotylach stymulowanych samym IAA. Można by wyciągnąć z tego

wniosek, że giberelina wpływa na powstawanie związków pektynowych w tkankach w większym stopniu niż IAA. Wzrost zaś substancji pektynowych związany jest z procesem podziałów komórkowych, skąd wynikałoby, że giberelina jest czynnikiem przyspieszającym podziały komórkowe. Wyraźnie uwidacznia to stosunek frakcji celulozowej do frakcji pektynowej. W epikotylach kontrolnych wynosi on 1,32, w epikotylach zaś stymulowanych IAA wzrasta do 1,63. Jeżeli wzrost ten nastąpił na skutek wydłużania się komórek spowodowanego działaniem IAA, to przy założeniu, że giberelina jest też tylko stymulatorem wydłużania się komórek, potraktowanie epikotyli mieszaniną obu tych związków powinno spowodować jeszcze większy wzrost tego stosunku. Stosunek ten jest jednak o wiele mniejszy i wynosi 1,46, co świadczy o stosunkowo większym przyroście pektyn w porównaniu do przyrostu celulozy. Większa długość epikotyli stymulowanych mieszaniną IAA + giberelina w porównaniu z długością epikotyli stymulowanych samym IAA przy zmniejszonym równocześnie stosunku frakcji V do IV mogłaby nasuwać przypuszczenie, że giberelina nie pozostaje bez wpływu na szybkość podziałów komórkowych.

W doświadczeniu III nastąpił znaczny spadek zawartości węglowodanów frakcji I zarówno w epikotylach poddanych działaniu światła, promieni UV, jak i w stymulowanych samą gibereliną oraz w poddanych działaniu światła, promieni UV i gibereliny. We frakcji II natomiast nastąpił nieznaczny wzrost zawartości cukrów pod wpływem wymienionych czynników. Największy przyrost pektyn nastąpił w epikotylach poddanych działaniu światła, promieni UV i gibereliny, a najmniejszy w epikotylach stymulowanych samą gibereliną. Odwrotnie we frakcji V: największy przyrost zawartości celulozy stwierdzono w epikotylach stymulowanych gibereliną, mniejszy po poddaniu ich działaniu światła i promieni UV, a najmniejszy pod działaniem światła, promieni UV i gibereliny.

Przy omawianiu wyników doświadczenia III należy podkreślić, że światło i promienie UV zahamowały wzrost epikotyli. Giberelina znosiła hamujące działanie światła i ultrafioletu, chociaż wzrost tych epikotyli był mniejszy niż epikotyli stymulowanych gibereliną bez naświetlania. Wyniki te potwierdzają obserwacje Lokharta (1956), który stwierdził, że zahamowanie wzrostu roślin, spowodowane działaniem światła, można usunąć giberelinami.

Z danych doświadczenia III wynika, że przemieszczanie węglowodanów między poszczególnymi grupami tych związków może zachodzić również w epikotylach poddanych działaniu światła i promieni UV. Wzrost zawartości pektyn w tym przypadku może świadczyć o tym, że przy zahamowanym wzroście niekoniecznie musiały ustać podziały komórkowe.

Reasumując wyniki niniejszej pracy można powiedzieć, że pod wpływem gibereliny następują w epikotylach grochu zmiany ilościowe w zawartości węglowodanów; wzrasta zawartość polisacharydów kosztem mono- i oligosacharydów. Podobne zmiany następują pod wpływem IAA oraz światła i promieni UV. Wyniki te w odniesieniu do IAA pokrywają się z danymi Albertheima i Bonnera (1959), którzy stwierdzili, że inkubowanie wycinków koleoptyli owsa na pożywkach z dodatkiem IAA przyspiesza włączanie się glukozy znakowanej ^{14}C do kwasu galakturonowego pektyn w tkankach koleoptyli. O ile jednak IAA, jako stymulator wydłużania się komórek, przyczynia się do wzrostu zawartości celulozy w epikotylach, to pod wpływem mieszaniny IAA+giberelina wzrost zawartości pektyn w stosunku do zawartości celulozy jest większy niż pod wpływem działania samego IAA. Na podstawie wzrostu zawartości pektyn, spowodowanego działaniem gibereliny, można by przypuszczać, że jest ona stymulatorem podziałów komórek. Większy przyrost zawartości pektyn pod wpływem IAA+giberelina, w porównaniu z mniejszym przyrostem tych związków pod wpływem samego IAA, niekoniecznie musi się wiązać ze stymulującym działaniem gibereliny, a może być wynikiem synergetycznego działania obu tych związków.

Ostateczne jednak wnioski, dotyczące roli gibereliny, jako czynnika podziałów komórkowych można by było wyciągnąć dopiero po przeprowadzeniu doświadczeń nad wpływem gibereliny na zawartość składników błon komórkowych w porównaniu z działaniem IAA jako czynnika wpływającego na wydłużanie się komórek i kinetyny, jako stymulatora podziałów komórkowych.

STRESZCZENIE

Celem niniejszej pracy było zbadanie wpływu gibereliny — IAA kwasu β -indolooctowego oraz mieszaniny gibereliny i kwasu β -indolooctowego na zawartość węglowodanów w etiolowanych epikotylach grochu.

Posługując się metodą Biełozierskiego (1954) oznaczono w badanym materiale 5 grup węglowodanów: 1) jedno-, dwu- i trójcukry, 2) dekstryny, śluzu i część substancji pektynowych, 3) skrobię, 4) hemicelulozy, 5) celulozę.

Wyniki naszych analiz wydają się potwierdzać pogląd szeregu autorów (Greulich i Haesloop 1958, Sachs 1957, 1959, Bradley i Crane 1957, Schroeder i Spector 1957, Gatrige i Thompson 1958, Humphries i Wheeler 1960) o roli gibereliny jako czynnika podziałów komórkowych, gdyż pod działaniem gibereliny oraz mieszaniny gibereliny i kwasu β -indolooctowego nastąpiły znaczne przesunięcia w zawartości węglowodanów poszczególnych grup. Kosztem węglowodanów bardziej prostych: jedno- i dwucukrów zwiększyła się zawartość polisacharydów wchodzących w skład błon komórkowych przede wszystkim pektyn.

SUMMARY

The present paper deals with the influence of gibberellin, β -indoleacetic acid as well as of the mixture of gibberellin and β -indoleacetic acid on the carbohydrate content in etiolated peas epicotyls.

Using the method described by Biełozierski (1954) we have determined 5 groups of carbohydrates: 1) mono-, di- and trisaccharides, 2) dextrines, mucilages and a part of pectic substances, 3) starch, 4) hemicelluloses and pectic substances, 5) celluloses.

The results of our analyses seem to confirm the opinion of a number of workers (Greulach and Haesloop 1958, Sachs 1957, 1959, Bradley and Crane 1957, Schroeder and Spector 1957, Gattrige and Thompson 1958, Humphries and Wheeler 1960) concerning the role of gibberellin as a stimulant of the cellular division process, because under the influence of gibberellin and the mixture of gibberellin and β -indoleacetic acid the great change-over in the carbohydrates levels of the individual groups ensued.

At the expense of the more simple carboxydrates mono- and bisaccharides increased the content of polysaccharides cell-wall constituents, first of all of pectic substances.

LITERATURA

- Albertheim P., Bonner J., 1959, J. Biol. Chem. 234, 3104.
 Biełozierski A., Proskuriakow N., 1954, Ćwiczenia z biochemii roślin 35—45, Warszawa.
 Bonner J., 1950, Plant Biochemistry 299—327, N. York.
 Bradley M. W., Crane J. C., 1957, Science 126; 972.
 Brian P. W., Elson G. W., Hemming H. G., Radley M., 1954, J. Sc. Fd. Agric. 5; 602.
 Brian P. W., Petty J., Richmand P., 1959, Nature 183; 58.
 Ergle D., 1958, Plant Physiol. 33; 344.
 Gattrige C., Thompson P., 1959, Nature 183; 197.
 Groulach V. A., Haesloop J. G., 1958, Amer. J. Bot. 45; 566.
 Hackett D., 1952, Plant Physiol. 27: 2.
 Hackett D., Scheiderman H., Thimann K., 1953, Arch. of Biochem. and Biophys. 47; 1.
 Humphries E. C., Wheeler A., 1960, J. of Exp. Bot. 11 (31).
 Kato J., 1953, Mem. Coll. Sci. Kyoto, B, 20: 189.
 Lokhart J., 1956, Proceedings of the Nat. Acad. of Sc. of USA 42: 841.
 Maciejewska-Potapczyk W., Łukasiak H., 1959, Acta Soc. Bot. Pol. 28: 95.
 Nickell L. G., 1958, Nature 181; 499.
 Sachs R. M., Lang A., 1957, Science 125: 1144.
 Sachs R. M., Bretz C. F., Lang A., 1959, Amer. J. Bot. 46: 376.
 Sayed M., Bed J., 1959, J. Amer. Pharmac. Assoc. Scient. Ed. 48: 43.
 Schroeder C. A., Spector C., 1957, Science 126; 701.
 Stowe B., Yamaki J., 1960, Science 129: 807.
 Sumiki Y. J., 1952, J. Agr. Chem. Soc. Japan 26; 393.
 Sumiki Y. J., 1955, Ref. Żurnal, Chemia Biol. 1959, 23, poz. 22242.
 Yabutta T., Hayashi T., 1939 a, J. Agr. Chem. Soc. Japan, 15, 174, 257.
 Yabutta T., Hayashi T., 1939 b, J. Agr. Chem. Soc. Japan, 15, 175, 403.