Współdziałanie wolnych auksyn z kwasem askorbinowym i glutationem w procesie kiełkowania ziarn pszenicy

Cz. I. Badania ilościowe wolnych auksyn, kwasu askorbinowego
i glutationu w kiełkujących ziarnach pszenicy o zróżnicowanej
żywołności

*Interaction of free auxins with ascorbic acid and glutathione in the
process of wheat grains germination*

*Part. I. Quantitative investigations of free auxins, ascorbic acid
and glutathione in germinating wheat grains with various viability*

H. SKRABKA

Procesami kiełkowania i wzrostu kieruje grupa związków katalizujących i regulujących, zwanych hormonami. Do grupy ciał czynnych należy również kwas 3-indolilooctowy. Związek ten wraz z pochodnymi wchodzi w skład grupy regulatorów wzrostu zwanych auksynami. Auksyny w ziarnach zbóż występują w większości w formie związanej nieaktywnej, jako proauksyny (Crocker i Barton, 1953). W ziarnie żyta auksyny znajdują się w endospermie w pobliżu zarodka. Ziarna niedojrzałe, suche, zawierają większą ilość auksyn niż ziarna dojrzałe. Według Popoffa (1941) wysoka zawartość auksyn jest przyczyną niskiej zdolności do kiełkowania. Linsner (1954), badając zawartość auksyn w okresie spoczynku i kiełkowania ziarn jęczmienia stwierdził, że poziom auksyn wzrasta w trakcie pęcznienia, a maleje w miarę kiełkowania ziarn. Kentzer (1959) stwierdziła, że zawartość wolnych auksyn w ziarnach pszenicy suchych jest nieznaczna, następnie w ciągu kilkunastu godzin kiełkowania szybko wzrasta, ale już po 24 godzinach znowu spada.

Wpływ syntetycznych substancji wzrostowych na kiełkowanie nasion był wielokrotnie badany, ale wyniki są sprzeczne (Söding, 1952, Crocker i Barton, 1953). W większości wypadków nie stwierdzono dodatniego wpływu moczenia w roztworach syntetycznych auksyn na przerwanie okresu spoczynku i przyspieszenie kiełkowania.

Nasiona, które całkowicie utraciły zdolność do kiełkowania przy długim przechowywaniu (kukurydza 36 lat, owies 29 lat, fasola 26 lat), wciąż jeszcze zawierały dość znaczne ilości auksyn (Juel 1941, cyt. za Södingiem 1952).

Rola kwasu askorbinowego i glutationu w procesach kiełkowania i wzrostu nie jest definitywnie wyjaśniona. Od dawna uwagę badaczy przykuwał fakt braku kwasu askorbinowego w suchym ziarnie zbóż i szybki jego wzrost podczas kiełkowania (Sreenivasan 1950; Krietowicz i inni 1948; Michniewicz 1961a, b). Tarczka i bielmo kiełkującego ziarna zboża nie zawierają kwasu askorbinowego.

Całkowita zawartość i zdolność do syntezy kwasu askorbinowego zlokalizowana jest w korzonku. Havas (1935) oraz Hausen (1935), mocząc nasiona wielu różnych roślin (przedsiewnie) w kwasie askorbinowym, uzyskali wzrost suchej masy korzeni średnio o 50%, a pędów 25—30%. Podobne wyniki uzyskali Sugawara (1939) i Sreenivasan (1950). Virtanen i Hausen (1949) przeprowadzili doświadczenia nad wpływem kwasu askorbinowego na wzrost izolowanych zarodków grochu i pszenicy. Wpływ kwasu askorbinowego na wzrost izolowanych zarodków w ich badaniach był uzależniony od rodzaju pożywki. Uzyskano dodatni wpływ na pożywcę z solami azotanowymi, natomiast na pożywcę z solami amonowymi takiego wpływu nie zaobserwowano. Niewątpliwie chodziło tu o zdolności redukcyjne kwasu askorbinowego.

Również zawartość glutationu zredukowanego w czasie kiełkowania szybko wzrasta, chociaż w suchym ziarnie znajduje się jego pewna ilość. Proskuriakow (1952) obliczył, że zawartość glutationu w pszenicach twardych w suchym ziarnie wynosi 0,015% suchej masy.

W czasie kiełkowania zawartość glutationu wzrastała osiągając w czwartym dniu 2,5 raza wyższy poziom niż w suchym ziarnie. Zawartość glutationu w zarodku pszenicy wynosiła 0,14% suchej masy.

Kwas askorbinowy z oksydazą askorbinową i glutationem tworzą układ oksydo-redukcyjny czynny przy oddychaniu. Wykazano wielokrotnie (Newcomb 1951; Scheurmann 1952; Michniewicz 1960) współzależność w działaniu kwasu askorbinowego z kwasem 3-indoliloctowym.

W świetle cytowanych prac interesującym problemem było zbadanie współdziałania układu oksydoredukcyjnego glutation — kwas askorbinowy z kwasem 3-indoliloctowym w czasie kiełkowania i wzrostu pszenicy o zróżnicowanej żywotności.

W pierwszej części przebadano zawartość wolnych auksyn kwasu askorbinowego i glutationu w ziarnach pszenicy: 1) kiełkowanych w warunkach normalnych, 2) kiełkowanych w warunkach beztlenowych (przemiana materii zakłócona czynnikami zewnętrznymi, 3) w ziarnach o osłabionej żywotności (przemiana materii zakłócona czynnikami wewnętrznymi).

MATERIAŁ I METODY OGÓLNE

Do wszystkich oznaczeń użyto ziarn pszenicy ozimej odmiany 'Komorowska', zbiór 1960 i 1961 r. z Rolniczego Zakładu Doświadczalnego WSR Pawłowice oraz zbiór 1953 r., znajdujących się do 1958 r. w magazynach Zakładu Biologii i Przechowalnictwa Nasion IHAR Wrocław. Ziarna pszenicy ze zbioru 1953 r. znajdowały się od 1958 r. w Katedrze Fizjologii Roślin WSR Wrocław. Ziarna tej ostatniej pszenicy posiadały obniżoną żywotność. Początkowo ziarna te posiadały siłę kiełkowania równą 97%. Po trzech latach przechowywania w warunkach magazynowych, siła kiełkowania spadła do 85%. Zmiany w energii i sile kiełkowania ziarn pszenicy w okresie prowadzenia doświadczeń przedstawiono w tabeli 1.

Doświadczenia trwały przez okres około 2 lat i dlatego, aby móc porównywać dane dotyczące ziarn pszenicy o osłabionej żywotności z ziarnami pszenicy możliwie najbardziej żywotnymi (najmłodszymi) w czasie doświadczeń używano ziarn ze zbioru 1960 i 1961 r. Do doświadczeń z oznaczaniem kwasu askorbinowego i wolnych auksyn użyto pszenic zbioru 1960 r., a do pozostałych doświadczeń użyto pszenicy ze zbioru 1961 r. Doświadczenia kontrolne nie wykazały istotnych różnic w zawartości kwasu askorbinowego i wolnych auksyn między zbiorem 1960 i 1961 r. Ziarna pszenicy — zbiór 1960 i 1961 r. — posiadały siłę kiełkowania od 96 do 99% we wszystkich doświadczeniach.

Zastosowano następujące kombinacje:

- 1) ziarna kiełkujące normalnie (zbiór 1960 i 1961 r.),
- 2) ziarna kiełkowane w warunkach beztlenowych (zbiór 1960 i 1961 r.),
- 3) ziarna o obniżonej żywotności, kiełkowane w warunkach normalnych (zbiór 1953 r.).

T a b e l a 1

Procent kiełkujących ziarn pszenicy o osłabionej żywotności
Percentage of germinating wheat grains with low viability

	Okres badania Period of investigation					
	1960		1961		1962	
	III	X	III	X	III	X
Energia kiełkowania Germination viability	2,4	2,2	2,0	1,6	1,2	0,8
Siła kiełkowania Germination power	18,4	16,0	15,4	12,8	11,0	10,6

T a b e l a 2

Procent kiełkujących ziarn, kiełkowanych początkowo w warunkach beztlenowych,
następnie normalnie na bibule
Siła kiełkowania = 97 %

Percentage of germinating wheat grains, germinated initially in anaerobic conditions and afterwards normally on filter paper
Germinating power = 97 %

Czas kiełkowania w warunkach beztlenowych Time of germination in anaerobic conditions	Dzień kiełkowania normalnie na bibule Day of normally germination on filter paper				
	2	3	4	5	6
8 dni (days)	25,5	58,2	89,4	76,2	77,0
9 dni (days)	13,4	42,8	47,6	53,0	55,0
10 dni (days)	9,2	20,4	26,4	31,0	31,0

Ziarna pszenicy przed kiełkowaniem wyjaławiano powierzchniowo 0,1% roztworem HgCl_2 przez 10 minut, po czym przepłukiwano ziarna na sicie wodą wodociągową i destylowaną. Kiełkowanie przeprowadzano w termostacie o temperaturze 22°C ($\pm 1,5^\circ$) w ciemności. Ziarna kiełkowane normalnie znajdowały się na podwójnej warstwie bibuły filtracyjnej zwilżonej wodą wodociągową w kiuwetach. Ziarna kiełkowane w warunkach beztlenowych (według Gumińskiej 1958) znajdowały się na dnie zlewek 100 ml wypełnionych do połowy wodą wodociągową przegotowaną i ostudzoną. Powierzchnię wody zalewano olejem parafinowym. Nasiona tak „kiełkowane” jedynie napęczniały i nawet w 7 dniu nie kiełkowały.

Procent kiełkujących ziarn, znajdujących się początkowo w warunkach beztlenowych a potem tlenowych — zestawiono w tabeli 2.

Zawartość kwasu askorbinowego, wolnych auksyn i glutationu badano w ziarnach suchych przed kiełkowaniem i w czasie kiełkowania codziennie od pierwszego do siódmego dnia kiełkowania.

Do analiz pobierano całe ziarna pszenicy tak kiełkujące, jak i niekiełkujące. Do doświadczeń używano wody wodociągowej lub destylowanej dwukrotnie w szkle.

Wyniki doświadczeń opracowano statystycznie według metody serii niezależnych dla jednej zmiennej.

Oznaczanie wolnych auksyn

Odliczano 600 ziarn suchych pszenicy, ważono je, sterylizowano i wkładano do kiełkowania. Do oznaczeń pobierano wszystkie wyłożone do kiełkowania ziarna, płukano alkoholem etylowym bezwodnym, mrożonym w temperaturze -10°C , przenoszono do zlewek 150 ml i zalewa-

no 50—80 ml mrożonym alkoholem. Zlewki wstawiano do zamrażalnika o temperaturze -10°C i pozostawiano tam przez 90 minut. Po tym czasie zlewano alkohol nad ziarn, ziarna przesypano do moździerza i rozcierano z niewielką ilością drobnego piasku. Tak roztartą masę zalewano ponownie tym samym alkoholem i wstawiano do lodówki o temperaturze $+4^{\circ}\text{C}$ na 1 godzinę. Potem zlewano alkohol nad ziarn, dolewano nową porcję alkoholu i wstawiano z powrotem do lodówki o temperaturze $+4^{\circ}\text{C}$ na przeciąg 1 godziny. Roztartą masę wraz z alkoholem odwirowywano przez 10 minut przy 3000 obr/min. Alkohol odsączano wprost do parowniczek, do których dolano alkohol z początkowej ekstrakcji. Alkohol odparowywano na łaźni wodnej o temperaturze 56°C . Pozostałość po odparowaniu alkoholu rozpuszczano na łaźni wodnej w 1,5 ml wody destylowanej, przenoszono do cylinderków, w których znajdowało się 2 ml 3% agaru i uzupełniano wodą całość do 4 ml. Ciepły agar wraz z wyciągiem wylewano na płytki szklane o wymiarach tak dobranych, aby po wystudzeniu grubość płytki agarowej wynosiła 2 mm. Płytkę agarową krajano na kostki o boku 2,4 mm każdy tak, że objętość kostek wynosiła około 11 mm^3 . Jako testu użyto owsa, według testu owsianego Wenta w modyfikacji Funkego. Metoda ta została szczegółowo przedstawiona przez Kentzer w *Acta Agrobotanica* 1959. Kąt wygięcia mierzono po 20 godzinach od chwili nałożenia kostek agarowych z odbitek fotograficznych.

Oznaczanie kwasu askorbinowego

Kwas askorbinowy oznaczano odczynnikiem Tillmansa (2,6 dwuchlorofenolindofenol) według Pijanowskiego, używając jako stabilizatora 6% kwasu metafosforowego.

Odwagowaną próbkę 100 sztuk kiełkujących ziarn pszenicy rozcierano w moździerzu z równą objętością 6% kwasu metafosforowego i nieznaczna ilość piasku. Roztartą masę przenoszono ilościowo do kolbki miarowej na 50 ml i dopełniano 6% kwasem metafosforowym. Następnie wyciąg wirowano przez 10 minut przy 3000 obr/min. Po odwirowaniu pobierano 10 ml wyciągu i miareczkowano 2,6 dwuchlorofenolindofenolem do słabo różowego zabarwienia. Tak sporządzone wyciągi zapewniały całkowite wyekstrahowanie kwasu askorbinowego z tkanek ziarn pszenicy.

Oznaczanie glutationu

Badania jakościowe. Glutation zredukowany, w warunkach tlenowych łatwo ulega utlenieniu poprzez wydzielenie H_2 i wtedy z dwóch cząsteczek trójpeptydu powstaje jedna cząsteczka sześciopieptydu połą-

czona mostkiem siarkowym. Taki związek jest mało aktywny biologicznie i nie wchodzi w połączenia z glioksalazą. Odtworzenie glutationu zredukowanego jest możliwe, między innymi, przez elektroredukcję przeprowadzoną w odpowiednich warunkach. Celem zorientowania się, czy w kielkujących ziarnach pszenicy znajduje się glutation tylko zredukowany, czy również utleniony, przeprowadzono badania jakościowe za pomocą chromatografii bibułowej.

Zastosowano metodę wstępującej chromatografii bibułowej w komorze chromatograficznej przez 10 godzin na bibule Whatmana nr 4. Układ rozpuszczalników stanowił fenol nasycony wodą. Atmosferę komory nasycono 1% kwasem solnym (Krimsky, Racker 1952). Chromatogramy po wysuszeniu w temperaturze około 40° C wywoływano 0,1% alkoholowym roztworem ninhydryny przez 10 minut w 80° C. Na bibułę naniesiono ekstrakty wszystkich kombinacji plus wzorce glutationu utlenionego i zredukowanego. Glutation utleniony otrzymano działając 0,02% roztworem H_2O_2 przez 24 godziny. Taki glutation nie wykazywał żadnej aktywności w stosunku do glioksalazy.

Badania ilościowe. Glutation zredukowany oznaczano zmodyfikowaną metodą Schroedera i Woodwarda przystosowaną do oznaczeń manometrycznych na aparacie Warburga. Zasada tej metody opiera się na tym, że zredukowany glutation jest koenzymem glioksalazy. W reakcji enzymatycznej, pod wpływem glioksalazy i glutationu jako koenzymu, z metyloglioksalu (aldehydu pirogronowego) powstaje kwas mlekowy. Szybkość tej reakcji jest uzależniona od stężenia glutationu w obrębie określonych granic. Powstający kwas mlekowy reaguje z kwaśnym węglanem sodu, skutkiem czego wytwarza się dwutlenek węgla powodując wzrost ciśnienia w manometrze, proporcjonalnie do ilości glutationu. Źródłem glioksalazy były drożdże piekarskie sproszkowane i pozbawione glutationu. Drożdże przygotowano według Umbreit'a (1949). Ilość zawiesiny drożdży na jedno naczynko określano na podstawie aktywności glioksalazy. Stosowany 1 ml 20% zawiesiny drożdży w ciągu 20 minut, w obecności 0,1 mg glutationu i 10 mg metyloglioksalu, wytwarzał 180—200 μ l CO_2 przy temperaturze 25° C.

Do bocznego ramienia naczynka Warburga dawano 0,5 ml wyciągu, w którym zawarty był glutation. Do głównej części naczynka dawano: 1 ml 20% zawiesiny drożdży, 0,5 ml 2% roztworu wodnego metyloglioksalu, 0,5 ml 0,4 M roztworu kwaśnego węglanu sodu. Tak przygotowane naczynka umieszczano na manometrach. Na wyloty rurek manometrycznych nakładano rurki szklane w kształcie litery T przy pomocy węża gumowego. Górne odgałęzienia rurek łączono ze sobą węzłem gumowym, a koniec łączono z manometrem rtęciowym. Manometr rtęciowy połączony był z jednej strony poprzez wąż gumowy z siedmioma manometrami jednocześnie, z drugiej strony z pompą ssącą wodną

i z trzeciej strony z butlą zawierającą mieszaninę azotu i dwutlenku węgla. Poszczególne połączenia regulowano zaciskami (ryc. 1).

Poprzednio przygotowano w butli pięciolitrowej mieszaninę azotu i CO_2 w stosunku 95% : 5%. Azot otrzymywano z butli stalowych, a CO_2 z aparatu Kippa. Stosowano azot o czystości 99,9%, który do tych celów był wystarczająco czysty. Po odessaniu powietrza wpuszczano mieszaninę gazową do manometrów. Czynność tę powtarzano aż do zużycia całej ilości mieszaniny gazów. Po napełnieniu manometrów zamykano kurki i przenoszono je do łaźni wodnej aparatu o temperaturze 25°C . Po 5-minutowym wstrząsaniu wyrównywano poziomy cieczy manometrycznych, zamykano kurki i przelewano zawartość bocznych ramion. Odczytu dokonywano co 5 minut bez zatrzymywania wstrząsanych manometrów. Odczyt pierwszych pięciu minut odrzucano, a do obliczeń brano wyniki z dalszych odczytów i ekstrapolowano. Ilość glutationu określano na podstawie odczytu ciśnienia CO_2 z krzywej wzorcowej po upływie 20 minut. Glutation zredukowany czysty do krzywej standartowej otrzymano z importu poprzez B.O.O. Gliwice, zaś metylogliksal z firmy dr T. Schuchardt, Monachium.

Wyciąg przygotowywano w sposób następujący: Odważoną próbkę 50 sztuk kiełkujących ziarn umieszczano w moździerzu porcelanowym i zalewano 15 ml 4% kwasu sulfosalicylowego. Próbkę ucierano z nieznaczną ilością piasku. Wyciągi odwirowywano przy 3000 obr/min przez 10 minut. Pozostałość przemywano dwukrotnie 5 ml 4% kwasu sulfo-

Ryc. 1. Aparat do wymiany gazów

A — naczynie z wodą; B — naczynie z mieszaniną gazów; C — manometr rtęciowy; D — przewód do pompy ssącej

Apparatus for gas exchange

A — vessel with water; B — vessel with gas mixture; C — mercury manometr; D — tubing to the suction pump.

salicylowego. Takie przemycie było wystarczające dla całkowitej ekstrakcji glutationu. Płyny po odwirowaniu łączono i neutralizowano 0,4 M kwaśnym węglanem sodu wobec oranżu metylowego. Tak przygotowany wyciąg przenoszono do bocznych ramion naczynek Warburga w ilości 0,5 ml na 1 naczynko.

WYNIKI BADAŃ

Wolne auksyny

Doświadczenia przeprowadzono w okresie od lutego do czerwca 1961 roku.

Analizę zmienności przeprowadzono osobno dla każdej kombinacji.

Przeprowadzona analiza zmienności dla ziarn normalnych wykazała istotne różnice w zawartości auksyn pomiędzy dniami kiełkowania. Natomiast analiza zmienności przeprowadzona dla ziarn kiełkowanych beztlenowo i o osłabionej żywotności nie wykazała istotnych różnic w zawartości wolnych auksyn pomiędzy dniami kiełkowania. Statystycznie różnice te są przypadkowe, chociaż charakter krzywej każe przypuszczać, że tak nie jest. Być może, że zbyt duży błąd doświadczenia, a za-

Ryc. 2. Zmiany zawartości wolnych auksyn w kiełkujących ziarnach pszenicy

1 — ziarna normalne; 2 — ziarna kiełkowane w warunkach beztlenowych; 3 — ziarna o osłabionej żywotności

Changes of free auxins content in the wheat grains during the germination

1 — normal grains; 2 — grains germinated in anaerobic conditions; 3 — grains of low viability.

tem i duży przedział ufności niwelowały zmienność czasową doświadczenia.

Wyniki przedstawiające średnie z 6 powtórzeń zawartości wolnych auksyn wszystkich trzech kombinacji są umieszczone na wykresie (ryc. 2).

Zawartość wolnych auksyn w ziarnach pszenicy normalnie kiełkowanych szybko wzrastała, osiągając maksimum w drugim dniu, po czym stopniowo malała. Najniższą zawartość auksyn stwierdzono w ostatnim (badanym) dniu kiełkowania. Jak widać z wykresu w ziarnach o osłabionej żywotności jest jeszcze bardzo wiele wolnych auksyn w porównaniu z ziarnami o normalnej żywotności. Biorąc pod uwagę przedział ufności, różnice pomiędzy kombinacjami, jak i pomiędzy dniami, są nieznaczne.

Kwas askorbinowy

Doświadczenia przeprowadzono w okresie od kwietnia do lipca 1962 r. W ziarnach kiełkowanych w warunkach beztlenowych kwas askorbinowy nie został wykryty. Dlatego też analizę zmienności sporządzono tylko dla ziarn kiełkujących normalnie i dla ziarn o osłabionej żywotności, ale każdą z osobna.

Ryc. 3. Zmiany zawartości kwasu askorbinowego w kiełkujących ziarnach pszenicy w mg % (ilość mg w 100 g suchej masy)

1 — ziarna normalne; 2 — ziarna kiełkowane w warunkach beztlenowych (zawartość kwasu askorbinowego = 0); 3 — ziarna o osłabionej żywotności

Changes of ascorbic acid content in the wheat grains during the germination in mg % (mg in 100 g dry weight)

1 — normal grains; 2 — grains germinated in anaerobic conditions (Content of ascorbic acid = 0); 3 — grains of low viability.

Wyniki przedstawiające średnie z 6 powtórzeń zawartości kwasu askorbinowego w ziarnach normalnych i o osłabionej żywotności są umieszczone na wykresie (ryc. 3).

Stosunkowo niewielkie ilości kwasu askorbinowego wykryto w ziarnach o osłabionej żywotności. Do analizy brano wszystkie ziarna tak kiełkujące, jak i nie kiełkujące. W doświadczeniu uzupełniającym rozdzielono ziarna kiełkujące od nie kiełkujących i stwierdzono, że cała zawartość kwasu askorbinowego znajdowała się tylko w ziarnach kiełkujących. Ziarna nie kiełkujące nie zawierały kwasu askorbinowego. Gdy przeliczono ilość kwasu askorbinowego zawartego w ziarnach o osłabionej żywotności, ale kiełkujących, to okazało się, że poziom kwasu w tych ziarnach jest w przybliżeniu równy poziomowi kwasu askorbinowego w ziarnach normalnie kiełkujących.

Analiza zmienności dla obu kombinacji wykazała istotne różnice w zawartości kwasu askorbinowego pomiędzy dniami kiełkowania. Zawartość kwasu askorbinowego wzrastała w miarę upływu czasu kiełkowania od 0 przy ziarnach suchych (przed kiełkowaniem) do około 40 mg % w siódmym dniu kiełkowania w ziarnach normalnych. W ziarnach o osłabionej żywotności również następował wzrost zawartości kwasu askorbinowego w czasie kiełkowania, ale proporcjonalny do ilości ziarn zdolnych do kiełkowania.

Glutation

Doświadczenia przeprowadzono w okresie od listopada 1961 do marca 1962 roku.

Na rycinie 4 przedstawiono chromatogramy trzech kombinacji badań jakościowych glutationu.

W żadnym wyciągu nie stwierdzono występowania glutationu utlenionego. Glutation zredukowany stwierdzono we wszystkich wyciągach oraz w ziarnie suchym.

Wyniki oznaczeń ilościowych glutationu (średnie z 5 powtórzeń) ze wszystkich kombinacji zestawiono na wykresie (ryc. 5).

Analizę zmienności przeprowadzono osobno dla każdej kombinacji. Analiza ta wykazała, że różnice w zawartości glutationu pomiędzy dniami kiełkowania są istotne we wszystkich kombinacjach.

Zawartość glutationu w ziarnach pszenicy normalnie kiełkowanej wzrastała w miarę upływu czasu kiełkowania, osiągając w siódmym dniu poziom przeszło dwukrotnie wyższy od ziarn suchych. Zawartość glutationu w ziarnach kiełkowanych w warunkach beztlenowych początkowo nieznacznie rosła, potem stopniowo malała. Suche ziarna pszenicy o osłabionej żywotności zawierały nieco mniej glutationu niż pszenicy tzw. normalnej, a w miarę kiełkowania zawartość ta rosła, ale dużo wolniej.

Ryc. 4. Chromatogram standardu glutationu zredukowanego i utlenionego oraz wyciągów sulfosalicylowych z kiełkujących ziarn pszenicy

A — z ziarn normalnie kiełkujących; B — z ziarn kiełkowanych beztlonowo, C — z ziarn o osłabionej żywotności
1 — suche ziarna; 2—8 — wyciągi z kiełkujących ziarn od 1 do 7 dnia kiełkowania; 9 — glutation zredukowany; 10 — glutation utleniony

Chromatogram of the standart of reduced and oxidized glutathione and sulphasalicylic acid extracts from germinating wheat grains
A — normal germinating wheat grains; B — grains germinated in anaerobic condition; C — grains of low viability

1 — dry grains; 2—8 — extracts of germinating grains from 1 to 7 day; 9 — reduced glutathione; 10 — oxidized glutathione.

Ryc. 5. Zmiany zawartości glutationu zredukowanego w kiełkujących ziarnach pszenicy w μg na 1 g suchej masy

1 — ziarna normalne; 2 — ziarna kiełkowane w warunkach beztlenowych; 3 — ziarna o osłabionej żywotności

Changes of reduced glutathione content in the wheat grains during the germination (μg 1 g dry weight)

1 — normal grains; 2 — grains germinated in anaerobic conditions; 3 — grains of low viability.

DYSKUSJA

W literaturze dotyczącej kiełkowania jest dość dużo danych odnoszących się do zawartości kwasu askorbinowego, auksyn i glutationu w ziarnach pszenicy kiełkowanych w warunkach normalnych i o normalnej żywotności. Dane te są porównywalne z wynikami otrzymanymi w tej pracy. Inaczej przedstawia się sprawa, jeśli chodzi o ziarna kiełkowane w warunkach beztlenowych i o osłabionej żywotności. Tu dane są skąpe i często niemożliwe do porównywania ze względu na sposób przeprowadzania doświadczeń. Większość danych z literatury, dotyczących badań ilościowych jest przytoczona we wstępie.

Zawartość wolnych auksyn w ziarnie pszenicy normalnie kiełkowanej była zgodna z wynikami otrzymanymi przez innych (Schocken 1947; Linser 1954; Kentzer 1959; Michniewicz 1962). Zawartość wolnych auksyn w suchym ziarnie pszenicy o osłabionej żywotności była jedynie niewiele niższa od zawartości w ziarnie pszenicy normalnej, co zresztą zgadza się z danymi z literatury otrzymanymi przez Juela (1941).

W ziarnie pszenicy kiełkowanej w warunkach beztlenowych poziom wolnych auksyn nie ulegał większym zmianom w ciągu całego okresu kiełkowania.

U ziarn o osłabionej żywotności nieznaczna wyżka wolnych auksyn na początku kiełkowania była zapewne związana z niewielką ilością ziarn zdolnych do syntezy czy aktywacji auksyn związanych. Natomiast niewielki spadek poziomu wolnych auksyn pod koniec badanego okresu kiełkowania można tłumaczyć małym zużyciem na procesy wzrostowe. Należy jednak podkreślić, że wyniki dotyczące zawartości wolnych auksyn w ziarnach kiełkowanych beztlenowo i w ziarnach o osłabionej żywotności leżą w granicach błędu.

Ogólnie biorąc, tak ziarna kiełkowane w warunkach beztlenowych, jak i o osłabionej żywotności, charakteryzuje mały dynamizm — niewielki początkowy wzrost, a następnie spadek zawartości wolnych auksyn przy końcu badanego okresu.

W ziarnie suchym pszenicy normalnej i o osłabionej żywotności nie stwierdzono kwasu askorbinowego, a w czasie kiełkowania zawartość rosła, zgodnie zresztą z wynikami innych badaczy. Ponieważ ziarna kiełkowane w warunkach beztlenowych nie zawierały kwasu askorbinowego, można by z tego wysnuć wniosek, że do syntezy kwasu askorbinowego potrzebny jest tlen. Ale można i inaczej to zagadnienie ująć. Tlen jest konieczny do rozpoczęcia kiełkowania i potem do wzrostu rośliny, a wobec braku procesów wzrostowych nie tworzy się kwas askorbinowy.

Zawartość kwasu askorbinowego w kiełkujących ziarnach o osłabionej żywotności była minimalna, a w przybliżeniu równa kilkunastu procentom zawartości w ziarnach normalnie kiełkowanych. Zatem poziom kwasu askorbinowego w ziarnach o osłabionej żywotności odpowiadałby procentowi kiełkujących ziarn. I rzeczywiście, jeśli oddzielono ziarna kiełkujące od nie kiełkujących (możliwe to było dopiero w końcowym okresie kiełkowania, 5—7 dzień) stwierdzono, że cały kwas askorbinowy był zawarty w ziarnach kiełkujących. W ziarnach niezdolnych do kiełkowania nie znaleziono kwasu askorbinowego. Wyniki te potwierdzają badania Michniewicza i Rowickiej (1961).

Biorąc pod uwagę wyniki z tych trzech kombinacji, trzech różnych typów przemiany materii, należy przypuszczać, że istnieje pewien związek między obecnością kwasu askorbinowego a kiełkowaniem i wzrostem. To potwierdzałoby sugestie Virtanena, Hausena, Sreenivasana i innych, którzy zaliczają kwas askorbinowy do grupy związków oddziałujących na wzrost.

Wzrost zawartości glutationu w czasie kiełkowania ziarn pszenicy normalnie kiełkowanej sugeruje, że jest on związany z kiełkowaniem i wzrostem. Potwierdzeniem tego są wyniki uzyskane z kiełkowaniem w warunkach beztlenowych i kiełkowaniem ziarn o osłabionej żywotności, w których poziom glutationu minimalnie wzrastał.

Biorąc pod uwagę, że synteza glutationu wymaga obecności tlenu, wyniki kiełkowania ziarn w warunkach beztlenowych i w warunkach

normalnych potwierdzają tezę o tym, że glutation jest tworzony z pojedynczych aminokwasów od nowa (Braunstein 1948), a nie jest produktem rozpadu łańcuchów peptydowych.

W większości prac spotykanych w literaturze dotyczących glutationu oznaczano tylko grupy $-SH$, przyjmując je za miernik ilości glutationu, tak że trudno porównywać wyniki tej pracy z wynikami innych.

Wyniki badań jakościowych nad glutationem zredukowanym i utlenionym, dotyczące ziarn kielkowanych w warunkach beztlenowych, potwierdzają przypuszczenie, że przy braku tlenu nie powstaje glutation utleniony (Morawiecka 1960). Również ziarna kielkowane w warunkach tlenowych (normalne) i ziarna o osłabionej żywotności albo nie zawierały glutationu utlenionego w ogóle, albo zawierały go w ilości za małej, by mógł zostać wykryty stosowanymi metodami. Tu materiału bezpośredniego do porównań brak. Istnieje tylko szereg prac, w których wykazano istnienie glutationu utlenionego w późniejszym okresie kielkowania, ale u innych roślin (Proskuriakow i Mosołowa 1952; Spragg i Yemm 1954; Morawiecka 1960).

Analizując wpływ tlenu na poszczególne związki można stwierdzić, że warunki beztlenowe ograniczają syntezę nowych związków biorących udział we wzroście, mianowicie kwasu askorbinowego całkowicie i glutationu znacznie. U ziarn o osłabionej żywotności stwierdzono mniejszą zdolność do syntezy kwasu askorbinowego i glutationu. Natomiast zapasy wolnych auksyn i glutationu nie uległy większym zmianom w porównaniu z ziarnami normalnie żywotnymi.

Również należałoby zwrócić uwagę na fakt, że zawartość wolnych auksyn nie ulegała większym zmianom w czasie kielkowania, niezależnie od tego, czy były to ziarna normalne, czy o osłabionej żywotności oraz czy były kielkowane w warunkach tlenowych, czy w beztlenowych. Przeciwnie było z zawartością kwasu askorbinowego i glutationu. Ilość tych związków zależała od rodzaju analizowanego ziarna.

WNIOSKI

Badano dynamikę wolnych auksyn, kwasu askorbinowego i glutationu. Do doświadczeń używano: 1) ziarn pszenicy normalnie kielkowanych i normalnie żywotnych, 2) ziarn pszenicy takich samych, jak w punkcie 1, ale kielkowanych w warunkach beztlenowych, 3) ziarn pszenicy o osłabionej żywotności. Ziarna pszenicy były tej samej odmiany, a różniły się rokiem zbioru lub warunkami kielkowania. Zawartość wolnych auksyn, kwasu askorbinowego i glutationu badano w suchym ziarnie (dzień kielkowania — 0), oraz codziennie aż do siódmego dnia kielkowania.

Na podstawie przeprowadzonych doświadczeń można wysnuć następujące wnioski:

1. Zawartość wolnych auksyn w normalnie kielkujących ziarnach

pszenicy początkowo rośnie (do 2 dnia), następnie wolno opada. U pszenicy kiełkowanych w warunkach beztlenowych zawartości wolnych auksyn początkowo wzrasta, choć wolniej niż u ziarn normalnych, a następnie nie ulega większym zmianom. W ziarnach o osłabionej żywotności zmiany zawartości wolnych auksyn są nieznaczne i są statystycznie nie uduwnione, podobnie jak w ziarnach kiełkowanych beztlenowo.

2. W suchym ziarnie pszenicy nie stwierdzono kwasu askorbinowego, ale w miarę kiełkowania zawartość kwasu askorbinowego szybko wzrastała. W ziarnach pszenicy kiełkowanych w warunkach beztlenowych do 7 dnia nie stwierdzono kwasu askorbinowego. W ziarnach o osłabionej żywotności zawartość kwasu askorbinowego była w przybliżeniu proporcjonalna do siły kiełkowania ziarn, tzn. jeśli ziarna o osłabionej żywotności kiełkowały w 10%, to również zawartość kwasu askorbinowego w całej próbie wynosiła 10% w porównaniu z ziarnami normalnymi.

3. W kiełkowanych normalnie ziarnach pszenicy, zawartość glutationu szybko wzrastała osiągając w 7 dniu wartość przeszło dwukrotnie wyższą w porównaniu z zawartością w suchym ziarnie. Zmiany w zawartości glutationu u ziarn kiełkowanych w warunkach beztlenowych i o osłabionej żywotności były nieznaczne.

4. Zawartość wolnych auksyn w czasie kiełkowania nie ulegała większym zmianom tak u ziarn normalnych, jak i u ziarn o osłabionej żywotności, oraz kiełkowanych w warunkach beztlenowych jak i tlenowych, w przeciwieństwie do zawartości kwasu askorbinowego i glutationu, których ilość była różna w zależności od rodzaju analizowanego ziarna.

*Katedra Fizjologii Roślin
Wyższej Szkoły Rolniczej we Wrocławiu
Kierownik — Prof. dr S. Gumiński*

(Wpłynęło: 5.4.1964)

SUMMARY

The dynamics of the auxins, ascorbic acid and glutathione has been investigated. For the experiments there were used: 1) wheat grains normally germinated and of normal viability, 2) identical wheat grains as in point 1 but germinated in anaerobic conditions, 3) wheat grains of low viability. The wheat grains were of the same variety and differed only by the year of harvest or condition of germination. The content of auxins, ascorbic acid and glutathione was studied in dry grains every day to the 7-th day of germination.

On the basis of these experiments the following conclusions may be drawn:

1. The content of free auxins of normally germinating wheat grains increases in the beginning (as to the 2-nd day) afterwards falls slowly. In wheat germinating in anaerobic conditions the content of auxins increases in the beginning, though slower than in normal grains, and does not alter very much later on. In grains of low viability the changes of the contents of the auxins are insignificant and are not proved statistically, so as in anaerobically germinated grains.

2. In the dry wheat grains ascorbic acid was not confirmed, but during the germination the content of ascorbic acid grew rapidly. In wheat grains germinated in anaerobic conditions no ascorbic acid was confirmed as to the 7-th day. In grains of low viability the content of ascorbic acid was approximately proportional to the germinating power, e.g. if the grains of low viability germinated in 10%, the content of ascorbic acid in the whole experiment amounts also 10%, compared with normal grains.

3. In normally germinating wheat grains the content of glutathione increased quickly, reaching on the 7-th day a more than double value compared with the content in the dry grain. The changes in the content of glutathione in grains germinated in anaerobic conditions and of low viability was insignificant.

4. The content of free auxin did not change during the germination neither in normal grains, nor in grains with low viability, both germinated in aerobic and anaerobic conditions in contrary to the ascorbic acid and glutathione which quantity was different in dependence of the kind of the analyzed grains.

High School of Agriculture, Wrocław

Department of Plant Physiology

Head: Prof. dr S. Gumiński

LITERATURA

- Braunstein A. E., Szamszykowska T. A., 1948, *Biochimia* 13: 95.
 Brzeski W., Kaniuga Z., 1956, *Ćwiczenia z biochemii roślin*, PWN, Warszawa.
 Crocker W., Barton L. V., 1953, *Physiology of seeds* (tłumaczenie na jęz. ros. II Moskwa 1955).
 Gumińska Z., 1958, *Acta Soc. Bot. Polon.* 27 (4): 501.
 Hausen S., 1935, *Nature* 136: 516.
 Havas L., 1935, *Nature* 136: 435.
 Kentzer T., 1959, *Acta Agrobot.* 8: 151.
 Krietowicz W. L., Bundell A. A., Drozdowa T. W., 1948, *Biochim.* 13: 332.
 Krinsky I., Racker E., 1952, *J. Biol. Chem.* 198: 721.
 Linser H., 1954, *Planta* 44: 103.
 Michniewicz M., 1960, *Zesz. Nauk. UMK Toruń, Nauki Mat. Przyr.* 6: 103.
 Michniewicz M., 1961 a, *Acta Agrobot.* 10 (2): 119.
 Michniewicz M., Rowicka K., 1961 b, *Acta Agrobot.* 10 (2): 19.
 Michniewicz M., 1962, *Acta Agrobot.* 11: 197.
 Morawiecka B., 1960, *Wiadomości Botaniczne* 4 (2): 95.
 Newcomb E. H., 1951, *Proc. Soc. Exper. Biol. a Med.* 76: 504.
 Popoff M., 1941, *Angewandte Botanik* 23: 33.
 Proskuriakow N. I., Mosołowa I. M., 1952, *Dokł. AN ZSRR* 87: 465.
 Scheurmann R., 1952, *Planta* 40: 265.
 Schocken V., 1947, *Bound auxin*, *Amer. J. Bot.* 34: 602.
 Soding H., 1952, *Die Wuchsstofflehre* (tłum. na jęz. ros. IIL Moskwa).
 Spragg S. P., Yemm E. W., 1954, *Biochem. J.* 58: 11.
 Sreenivasan A., Wandrekar S. D., 1950, *Proceedings of the Indian Academy of Sciences* 32: 143.
 Sugawara T., 1939, *Jap. J. Bot.* 10: 141.
 Umbreit W. W. R., Burris R. H., Stauffer J. H., 1949, *Manometric Techniques and Tissue Metabolism*; Minneapolis Burgess Publishing Co.
 Virtanen A. I., Saubert v. Hausen, 1949, *Nature* 163: 482.