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

Cz. III. Wpływ kwasu 3-indoliloctowego, kwasu askorbinowego i glutationu na kiełkowanie ziarn pszenicy o różnej żywotności

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

Part III. Effect of 3-indolylacetic acid, ascorbic acid and glutathione on the germination of wheat seeds of varying viability

H. SKRABKA

Problem nasion o osłabionej żywotności, ich zdolności do kiełkowania i uzyskany z nich plon jest stale przedmiotem badań tak fizjologów jak i rolników.

Według Rugego (1947) starzenie się nasion polega na zmniejszaniu specyficznych stymulatorów, zniszczeniu łatwo utleniających się związków i na obniżeniu zdolności komórki do wytworzenia odpowiedniego potencjału oksydoredukcyjnego w starych nasionach.

Crocker i Barton (1953) podają następujące przyczyny utraty żywotności nasion: 1) utrata aktywności przez enzymy, 2) ubytek substancji zapasowych, 3) budowa łupiny nasiennej, 4) utrata zdolności przebudowy cząstek białka w aktywne cząstki protoplazmy, 5) stopniowa koagulacja białka zarodka, 6) nagromadzenie trujących produktów metabolizmu, 7) stopniowa degeneracja jąder komórkowych zarodka.

Elliot i Leopold (cyt. za Blaimem 1955) stwierdzili, że w okrywie nasiennej owsa występuje substancja, która hamuje kiełkowanie i wzrost etiolowanych pędów grochu oraz inaktywuje α - i β -amylazę. Inhibitor traci swą aktywność w obecności papainy. Przypuszczalnie, działanie inhibitora odnosi się do grup sulfhydrylowych, gdyż glutation i dwutiopropanol przywracają aktywność amylaz.

Celem niniejszej pracy było zbadanie jak związki o dużej aktywności fizjologicznej — kwas 3-indoliloctowy, kwas askorbinowy, glutation oraz siarczan miedzi (źródło Cu^{++} dla oksydaz) wpłyną na kiełkowanie ziarn o zakłóconym typie przemiany materii. Miarą działania tych związków było zwiększenie lub zmniejszenie ilości wykiełkowanych ziarn o osłabionej żywotności. Zastosowano następujące rodzaje ziarn: 1) o osłabionej żywotności w znacznym stopniu na skutek starości, kiełkowane normalnie w warunkach tlenowych, 2) o pełnej żywotności przed doświadczeniem, ale kiełkowane w warunkach beztlenowych przez 11 dni, kiedy straciły w dużym stopniu swą żywotność.

Materiał nasienny i stosowane metody kiełkowania we wszystkich trzech częściach były takie same, a bliższe dane podano w cz. I pracy (Skrabka 1964).

BADANIA WŁASNE

Ziarna o osłabionej żywotności

Badano wpływ kwasu 3-indoliloctowego, glutationu, kwasu askorbinowego i siarczany miedzi na procent wykielkowanych ziarn pszenicy o osłabionej żywotności.

Ziarna o osłabionej żywotności były tej samej odmiany ('Komorowska') co ziarna zwane normalnymi, ale posiadały niską siłę kiełkowania wynoszącą około 15%. Pochodziły one ze zbioru 1953 r. i w chwili przeprowadzania doświadczeń miały 9 lat.

Odliczono po 100 szt. ziarn pszenicy, wyjałowiono je powierzchniowo 0,1% HgCl przez 10 minut, a następnie przepłukiwano na sicie wodą destylowaną. Ziarna moczono w odpowiednich roztworach w 100 ml zlewkach przez 24 godziny. Moczzenie odbywało się w termostacie o temperaturze 22°C, w ciemności. Po upływie tego czasu ziarna przepłukiwano i wykładano do kuwet porcelanowych na bibułę. Również i kiełkowanie przeprowadzano w termostacie o temp. 22°C w ciemni. Procent wykielkowanych nasion liczono od dnia 4 (licząc od chwili namoczenia) codziennie. W doświadczeniach wstępnych dobrano odpowiednie stężenia roztworów oraz ich kombinacje. Zastosowano roztwory o następujących stężeniach: kwas 3-indoliloctowy — 0,0005%, glutation — 0,001%, kwas askorbinowy — 0,0025%, CuSO₄ — 0,0005%.

Ryc. 1. Procent kiełkowania ziarn pszenicy o osłabionej żywotności, w zależności od rodzaju roztworu, w którym ziarno moczono

1 — kwas 3-indoliloctowy; 2 — glutation; 3 — kwas askorbinowy; 4 — siarczan miedzi; 5 — kwas askorbinowy + glutation; 6 — kwas 3-indoliloctowy + glutation; 7 — kwas 3-indoliloctowy + kwas askorbinowy + glutation; 8 — kwas 3-indoliloctowy + kwas askorbinowy + glutation + siarczan miedzi; 9 — woda.

Stężenia roztworów: kwas 3-indoliloctowy — 0,0005%, glutation — 0,001%, kwas askorbinowy — 0,0025%, CuSO₄ — 0,0005%.

Percentage of wheat seeds with decreased viability germinating in dependence on the solution in which they were soaked:

1 — 3-indolylacetic acid; 2 — glutathione; 3 — ascorbic acid; 4 — copper sulphate; 5 — ascorbic acid + glutathione, 6 — 3-indolylacetic acid + glutathione, 7 — 3-indolylacetic acid + ascorbic acid + glutathione, 8 — 3-indolylacetic acid + ascorbic acid + glutathione + copper sulphate, 9 — water.

Concentrations of the solutions used: 3-indolylacetic acid — 0.0005%, glutathione — 0.001%, ascorbic acid — 0.0025%, CuSO₄ — 0.0005%.

Wyniki zestawione na rycinie 1 są średnimi z 6 powtórzeń i dotyczą % wykiełkowanych ziarn w 9 dniu kiełkowania — (1 dzień moczenia + 8 dni na bibule).

Analiza zmienności dla całego doświadczenia wykazała istotne różnice we wpływie stosowanych roztworów, czasu kiełkowania oraz współdziałania czasu kiełkowania z roztworami na procent kiełkowania.

Najwyższy średni procent wykiełkowanych ziarn uzyskano przy moczeniu ich w roztworze kwasu 3-indoliloctowego z glutationem, kwasem askorbinowym i siarczanem miedzi łącznie (ryc. 1 poz. 8), w roztworze glutationu (poz. 2) oraz w roztworze kwasu 3-indoliloctowego z glutationem i kwasem askorbinowym (poz. 7). Podobnie przedstawiają się wyniki w poszczególnych dniach kiełkowania. Wpływ pozostałych roztworów na procent wykiełkowanych ziarn był niewielki i mieścił się w granicach błędu.

Głównym stymulatorem okazał się glutation. Kwas 3-indoliloctowy obniżał raczej siłę kiełkowania, choć w granicach błędu i nawet zmniejszał wpływ stymulujący glutationu.

Ziarna kiełkowane w warunkach beztlenowych

Badano wpływ kwasu 3-indoliloctowego, glutationu, kwasu askorbinowego i siarcznanu miedzi na kiełkowanie ziarn pszenicy, znajdujących się przez 11 dni

Ryc. 2. Procent kiełkowania ziarn pszenicy w zależności od moczenia w poszczególnych roztworach, kiełkowanych czasowo warunkach beztlenowych

1 — kwas 3-indoliloctowy; 2 — glutation; 3 — kwas askorbinowy; 4 — siarczan miedzi; 5 — kwas 3-indoliloctowy + glutation; 6 — kwas 3-indoliloctowy + kwas askorbinowy; 7 — glutation + kwas askorbinowy + siarczan miedzi; 8 — glutation + kwas askorbinowy; 9 — kwas 3-indoliloctowy + kwas askorbinowy + glutation + siarczan miedzi; 10 — woda.

Stężenia roztworów: kwas 3-indoliloctowy — 0,0005%, glutation — 0,001%, kwas askorbinowy — 0,0025%, CuSO_4 — 0,0005%.

Percentage of wheat seeds germinating after being pregerminated in anaerobic conditions, in dependence on the solution in which they had been previously soaked:

1 — 3-indolylacetic acid; 2 — glutathione; 3 — ascorbic acid; 4 — copper sulphate; 5 — 3-indolylacetic acid + glutathione; 6 — 3-indolylacetic acid + ascorbic acid; 7 — glutathione + ascorbic acid + copper sulphate; 8 — glutathione + ascorbic acid; 9 — 3-indolylacetic acid + ascorbic acid + glutathione + copper sulphate; 10 — water.

Concentrations of the solutions used: 3-indolylacetic acid — 0.0005%, glutathione — 0.001%, ascorbic acid — 0.0025%, CuSO_4 — 0.0005%.

w warunkach beztlenowych a następnie kiełkowanych w warunkach normalnych — tlenowych.

Odliczano po 100 szt. ziarn o normalnej żywotności, wyjaławiano je powierzchniowo, przepłukiwano, a następnie moczone przez 24 godziny w odpowiednich roztworach (w ciemności i temperaturze 22°C). W doświadczeniach wstępnych dobrano odpowiednie kombinacje roztworów, nieco inne jak przy ziarnach o osłabionej żywotności, natomiast stężenia podobne jak w dośw. poprzednim. Następnie ziarna przepłukiwano i przenoszono do zlewki 100 ml zawierających 50 ml wody przegotowanej i ostudzonej. Ziarna osadzały się na dnie zlewki. Powierzchnię wody pokrywano warstwą oleju parafinowego grubości kilku milimetrów. Zlewki umieszczano na 10 dni w termostacie o temperaturze 22°C w ciemności. Po tym okresie czasu ziarno nie wykiełkowało z braku dostępu tlenu, a jedynie widoczny był kiełek, który przebił okrywkę ziarniaka. Mimo zahamowania oddychania duża część ziarn była jeszcze żywotna.

Wyniki, które są średnimi z 6 powtórzeń przedstawiono na ryc. 2. Są to dane z 6 dnia kiełkowania na bibule, a 17 dnia od chwili namoczenia.

Analiza zmienności wykazała istotne różnice we wpływie obu czynników i współdziałania.

Najwyższy średni procent wykiełkowanych ziarn uzyskano dla ziarn moczonych w glutationie (ryc. 2 poz. 2), w mieszaninie kwasu 3-indolilooctowego, z glutationem, kwasem askorbinowym i siarczanem miedzi (poz. 9), w mieszaninie glutationu z kwasem askorbinowym i siarczanem miedzi (poz. 7). Pozostałe roztwory działały również dodatnio w stosunku do kontroli, ale w mniejszym stopniu. Podobne wyniki uzyskano przy analizowaniu ilości wykiełkowanych ziarn w poszczególnych dniach kiełkowania na bibule (od 1 do 6).

DYSKUSJA

Poprawa kiełkowania ziarn o osłabionej żywotności nie jest związana z poziomem czy aktywnością auksyn, czego przykładem jest brak dodatniego wpływu syntetycznego kwasu 3-indolilooctowego. Wyniki te potwierdzają prace Rugego (1947), Södinga i Wagnera (1955) oraz Poljakoff-Mayber (1958, cyt. wg Mayer i Poljakoff-Mayber 1963). Nie potwierdzają zaś wyników badań Amlonga (1937) oraz Fittinga (1939).

Niewątpliwie głównym stymulatorem zwiększającym ilość wykiełkowanych ziarn w obu doświadczeniach był glutation zredukowany. Rola glutationu w komórkach roślinnych była przedmiotem wielu badań (Lavrance 1950; Mapson i Goddard 1951; Racker 1951; Krimsky i Racker 1952; Proskuriakov i Mosołowa 1952; Webster 1953; Eichenberg i Thimann 1957; Goriaczko-Morawiecka 1959; Heath i Turner 1960, i inni). Za główną jego rolę uważa się aktywację dehydrogenazy aldehydu 3-P-glicerolowego jako koenzymu. Również dzięki posiadaniu grup —SH bierze on udział w reakcjach oksydo-redukcyjnych jako związek silnie redukujący. Jest również aktywatorem proteinaz, oraz koenzymem

glioksalazy. Dostarczony z zewnątrz do tkanek posiada duże zdolności regenerowania enzymów zawierających grupy —SH. Prawdopodobnie jego rola przy poprawie kiełkowania nasion polega na regeneracji niektórych enzymów zawierających grupy —SH. Enzymy te są bardzo wrażliwe na działanie czynników zewnętrznych (np. promieniowanie wszelkiego rodzaju) i łatwo ulegają inaktywacji. Nie można również wykluczyć działania glutationu w sposób pośredni np. przez ochronę kwasu askorbinowego, współdziałanie z auksynami (Skrabka 1964) lub poprzez syntezę czy aktywację innych związków.

Mechanizm działania glutationu w obu doświadczeniach jest zbliżony, ale nie identyczny, czego dowodem jest różny wpływ poszczególnych mieszanin z glutationem, na kiełkowanie. W doświadczeniach z ziarnami kiełkowanymi czasowo w warunkach beztlenowych efekt działania glutationu jest większy, co można tłumaczyć większą żywotnością ziarn. Trudno jest wytłumaczyć rolę kwasu askorbinowego, który jest również silnym reduktorem jak glutation, ale efekt jego działania nie jest tak wyraźny. Być może chodzi tu o wpływ pośredni na inne związki, które z kolei oddziałują na kiełkowanie.

WNIOSKI

Z przeprowadzonych badań można wysnuć następujące wnioski:

1) Ziarna pszenicy o osłabionej żywotności lepiej kiełkowały, jeżeli przed kiełkowaniem zostały namoczone w roztworze glutationu lub w mieszaninie kwasu 3-indolilooctowego, kwasu askorbinowego, glutationu i CuSO_4 .

2. Ziarna pszenicy o normalnej żywotności kiełkowane początkowo w warunkach beztlenowych (11 dni) lepiej kiełkowały później na bibule (normalnie), jeżeli przed kiełkowaniem zostały namoczone w roztworze glutationu, w mieszaninie kwasu 3-indolilooctowego, kwasu askorbinowego, glutationu i siarczanu miedzi lub w roztworze glutationu z kwasem askorbinowym i siarczanem miedzi.

3. Uwzględniając wyniki wszystkich doświadczeń należy stwierdzić, że związkiem najbardziej aktywnym był glutation, działając skutecznie w roztworach pojedynczych, jak również razem z pozostałymi związkami.

Panu Profesorowi S. Gumińskiemu składam serdeczne podziękowanie za cenne uwagi w czasie wykonywania doświadczeń oraz przy opracowywaniu wyników wszystkich trzech części pracy.

*Katedra Fizjologii Roślin
Wyższej Szkoły Rolniczej we Wrocławiu*

(Wpłynęło dn. 9.II.1965 r.)

SUMMARY

The effect of 3-indolylacetic acid, glutathione, ascorbic acid and copper sulphate on germination of wheat seeds with decreased viability owing to ageing, and on seeds with normal viability pregerminated for a time in anaerobic conditions, was studied. The seeds were first soaked in the respective solutions for 24h, those with depressed viability were then directly germinated on filter

paper, and those subjected to pregermination in anaerobic conditions were placed in beakers filled with water for a period of 11 days. Thereafter, the seeds were transferred onto filter paper, and the percentage of seeds which germinated within a 6-day period was calculated. The following conclusions may be drawn from the experiments:

1. Wheat seeds with decreased viability germinated better if they were soaked before germination in glutathione solution or in a mixture of 3-indolylacetic acid, ascorbic acid, glutathione and CuSO_4 .

2. Wheat seeds with normal viability, when pregerminated in anaerobic conditions (11 days), germinated better on filter paper (normally) if they had been soaked before germination in a glutathione solution, in a mixture of 3-indolylacetic acid, ascorbic acid, glutathione and copper sulphate or in a solution of glutathione with ascorbic acid and copper sulphate.

3. It may be stated, when taking into account the results of all the experiments that glutathione proved to be the most active compound, since it was effective both when applied alone and in combination with the other compounds tested.

LITERATURA

- Amlong H. V., Naundorf G., 1937, *Forschungsdienst* 4: 417.
Blaim K., 1955, *Postępy Nauk Rolniczych* 5: 99.
Crocker W., Barton L. V., 1953, *Physiology of seeds* (tłumaczenie na jęz. ros. III Moskwa 1955).
Eichenberger E., Thimann R. V., 1957, *Arch. Bioch. Bioph.* 67: 466.
Fitting A., 1939, *Jahrb. f. wiss. Bot.* 88: 663.
Goriaczko-Morawiecka B., 1959, *Acta Soc. Bot. Pol.* 28 (4): 635.
Heatch M. D., Turner J. F., 1960, *Biochem. J.* 1: 75.
Krimsky I., Racker E., 1952, *J. Biol. Chem.* 198: 721.
Lawrance J. M., 1950, *Arch. Biochem.* 27: 1.
Mapson L. W., Goddard D. R., 1951, *Nature* 167: 975.
Mayer M. A., Poljakoff-Mayber A., 1963, *The germination of seeds*, Pergamonn Press-Oxford.
Proskuriakow N. I., Mosołowa I. M., 1952, *Dokł. A. N. ZSRR* 87: 465.
Ruge U., 1947, *Planta* 35.
Skrabka H., 1964, *Acta Soc. Bot. Polon.* 33 (4): 689.
Skrabka H., 1965, *Acta Soc. Bot. Pol.* 34(3): 479.
Söding H., Wagner M., 1955, *Planta* 45: 557.
Webster G. C., 1953, *Plant Physiol.* 28: 729.