Zmiany wolnych aminokwasów w czasie spoczynku późniejszego ziarna jęczmienia jarego ('Browarny PZHR')

*Changes of free amino acids during after-harvest dormancy of spring barley grain
(‘Browarny PZHR’)*

K. KULKA, B. SOBIERAJ

Zebrane w dojrzałości morfologicznej ziarno jęczmienia jarego ('Browarny PZHR') nie wykazuje zdolności do kiełkowania w optymalnych dla tego procesu warunkach (odpowiednia temperatura i wilgotność). Zjawisko to związane jest z tzw. spoczynkiem posprzętnym, będącym rodzajem spoczynku głębokiego. Ziarno jęczmienia o takim typie spoczynku uzyskuje gotowość do kiełkowania zwykle dopiero po kilku lub kilkunastu tygodniach przechowywania w stanie powietrznie suchym, w temperaturze pokojowej lub wyższej. Przyjmuje się, że spoczynek głęboki uwarunkowany jest czynnikami natury wewnętrznej (dziedzicznej). Wielu autorów (por. Grzesiuk 1967; Vegis 1964) uważa, że największą rolę w kształtowaniu spoczynku nasion odgrywają naturalne inhibitory wzrostu (kiełkowania). Związki te hamują prawdopodobnie aktywność enzymów lub też ich syntezę, co z kolei prowadzi do zahamowania syntezy białka i wzrostu.

Przerwanie spoczynku danego organu rośliny (bulwy, nasienia) uwarunkowane jest według niektórych badaczy (Bradbeer, Floyd 1964; Metlickij, Korablewa 1965) nagromadzeniem odpowiedniej ilości związków typu ATP oraz kwasów nukleinowych.

Okres spoczynku posprzętnego nasion, w wyniku którego uzyskują one dojrzałość fizjologiczną, cechuje się niskim natężeniem przemiany materii, zaś kierunek procesów biochemicznych podobnie jak w okresie dojrzewania, ma nadal charakter syntetyczny (por. Grzesiuk 1967). W nasionach zmniejsza się wówczas zawartość związków niskocząsteczkowych, a zwiększa ilość związków złożonych. Wyniki badań z octanem $-2-C^{14}$ wskazują, że w nasionach spoczynkowych lesczyni trwa nadal intensywna synteza kwasu asparaginowego i glutaminowego, poprzez cykl kwasów trójkarboksylowych Krebsa (Bradbeer, Colman 1963). Według wymienionych autorów od przebiegu syntezy tych związków zależy wstępny etap uwolnienia się nasion od spoczynku.

Prawdopodobnie uzyskanie przez organy spoczynkowe roślin gotowości do wznowienia procesów wzrostowych uzależnione jest od przebiegu w nich wielu różnorodnych procesów biochemicznych (Metlickij, Korablewa 1965). Wydaje się jednak,

że główną rolę odgrywa tu metabolizm związków azotowych, kwasów nukleinowych i ich prekursorów w powiązaniu z przemianami regulatorów wzrostu — stymulatorów i inhibitorów.

Praca niniejsza miała na celu dostarczenie informacji, w jakiej mierze spoczynek poźniwny jęczmienia jarego związany jest z dynamiką wolnych aminokwasów. Uzyskane wyniki miały również stanowić wskazówkę do dalszych badań nad rolą frakcji białkowych w kształtowaniu spoczynku głębokiego ziarna.

METODY

Badania przeprowadzono na ziarnie jęczmienia jarego 'Browarny PZHR', wyrosłego na glebie brunatnej w majątku doświadczalnym WSR, w 1965 r. Siew wykonano 3 maja, zbiór zaś — 18 sierpnia. W dniu sprzętu wymłócone ręcznie ziarno podzielono na dwie serie. Serię A przechowywano w laboratorium, w temperaturze pokojowej, w ciemności i w stanie powietrzno-suchym, oznaczając co 10 dni (licząc od dnia sprzętu) ciężar 100 ziarn, zdolność kiełkowania oraz pobierając próbkę na zawartość aminokwasów. Serię B umieszczono na kiełkowaniu Jacobsona, na bibule filtracyjnej nasyczonej wodą wodociągową o temp. około 18° C, pobierając co 20 dni próbki na zawartość aminokwasów i oznaczając ciężar 100 ziarn. Próbkę przeznaczoną do analizy aminokwasów utrwalano w przepływającej parze wodnej w ciągu 15 minut w aparacie Kocho.

Ekstrakcję wolnych aminokwasów przeprowadzono 80% etanolem. Ekstrakt ten następnie oczyszczano z lipidów poprzez wytrząsanie z chloroformem. Po oddzieleniu warstwy chloroformowej roztwór właściwy odparowywano w temperaturze 45°C w ciągu około 4 godz. Suchą pozostałość rozpuszczano w 1 ml 80% etanolu i przechowywano w szafie chłodniczej w temp. 0°C.

Do rozdzielu aminokwasów zastosowano chromatografię bibulową wstępującą, jednokierunkową, w układzie rozwijającym: n-butanol — lodowaty kwas octowy — woda (4 : 1 : 1). Celem uzyskania lepszego rozdzielu aminokwasów, na bibule Whatman Nr 3 nanoszono badany wyciąg w postaci pasków (w ilości 40 µl). Wyciąg aminokwasów pochodzący z ziarna kiełkującego nanoszono na bibule w ilości 20 µl. Próby badano w 2 powtórzeniach. Każdy chromatogram rozwijano pięciokrotnie, suszono w temperaturze pokojowej i wywoływano acetonowym roztworem ninhydryny. Ilościowo aminokwasy oznaczano na densytometrze firmy „Jouan”. Zarówno do ilościowego oznaczania aminokwasów, jak i do ich identyfikowania używano 0,01 M roztworów standardowych firmy „Shandon”.

WYNIKI I DYSKUSJA

1. Aminokwasy w ziarnie powietrzno-suchym. Ziarno jęczmienia uzyskało gotowość do normalnego kiełkowania dopiero po około 8 tygodniach przechowywania w laboratorium. Wilgotność ziarna w tym okresie systematycznie malała

Ryc. 1. Chromatogram wolnych aminokwasów zawartych w ziarnie jęczmienia jarego będącego w stanie spoczynku późniwego

I—17 aminokwasy; I—VII kolejne próby ziarna powietrznie suchego; S — standard; X — ziarno skielkowane; 2' — 7' kolejne próby ziarna nasyczonego wodą

Chromatogram of the free amino acids contained in the spring barley grain during post-harvest dormancy.

I—17 — leucine + izoleucine, phenylalanine, valine, γ -amino butyric acid, tryptophan, tyrosine, pyrrolidine, γ -alanine, threonine, glutamic acid, serine, glycine, aspartic acid, glutamine, asparagine, arginine, lysine + histidine, cysteine; I—VII — alternate samples of air-dry grain; S — standard; X — germinating grain; 2' — 7' — alternate samples of imbibed grain.

(z 33,6 do 13,4%) w miarę upływu spoczynku. Straty suchej masy wskutek procesów oddechowych wynosiły w omawianym okresie czasu zaledwie 2,9%. Dokładniejsze dane na ten temat podają Rejowski i Kulka (w druku).

Natężenie procesów biochemicznych w organach spoczynkowych roślin jest niewielkie. Wiąże się to prawdopodobnie z całkowitą lub częściową represją aparatu genetycznego (Tuan, Bonner 1964) oraz zablokowaniem aktywności wielu układów enzymatycznych przez naturalne inhibitory. W ziarnie jęczmienia będącego w spoczynku zawartość wielu wolnych aminokwasów również nie podlegała większym zmianom ilościowym i jakościowym (tabela 1, ryc. 1). Bliższe jednak rozpatrzenie tabeli 1 pozwala stwierdzić, że zawartość asparaginy, glicyny i argininy wyraźnie zwiększała się w pierwszej połowie spoczynku ziarna, po czym w dalszym okresie spoczynku ponownie malała. Obserwowany wzrost ilości wymienionych aminokwasów mógł być wynikiem hydrolizy białek zapasowych ziarna oraz przemiany jednych aminokwasów w drugie. Wiadomo bowiem że aktywność enzymów proteolitycznych (w porównaniu z innymi enzymami) podczas posprzętnego dojrzewania ziarna jest stosunkowo wysoka i zależy od stopnia uwodnienia i kwaso-

wości tkanek (Grzesiuk 1966; Prochorowa, Kretowicz 1958; Szwecowa, Sosedow 1958). Mejbaum-Katzenellenbogen i Morawiecka (1963) wykazały, że podczas przechowywania zmniejsza się w ziarnie pszenicy zawartość albumin. W ziarnie jęczmienia w czasie jego wtórnego dojrzewania ma prawdopodobnie miejsce przebudowa kompleksu białkowego. W wielu pracach stwierdzono, że odnowa białek odbywa się nie tylko w młodych organach roślin, ale także w starych. Metodą izotopową stwierdzono, że pomiędzy białkiem a rozpuszczalnymi związkami azotowymi istnieje ciągła wymiana azotu (por. Kaniuga 1960). Szczególną aktywność w tej wymianie wykazuje grupa amidowa białka.

Szybki wzrost syntezy asparaginy w początkowym okresie spoczynku ziarna świadczy o znacznym natężeniu procesów dysymilacyjnych pewnej części amino-

Ryc. 2. Zmiany ilościowe glutaminy, asparaginy i kwasu glutaminowego w powietrzno suchym ziarnie jęczmienia

Quantitative changes of glutamine, asparagine and glutamic acid in the air-dry barley grain.

kwasów (ryc. 2). Natomiast wyraźne obniżenie się zawartości tego amidu w drugiej połowie spoczynku ziarna jęczmienia wskazuje na jego udział w syntezie nowych aminokwasów i białek. Dużym zmianom ulega również zawartość glutaminy i kwasu glutaminowego (ryc. 1 i 2, tabela 1). Wszystkie wymienione związki niewątpliwie zajmują kluczową pozycję w metabolizmie azotowym roślin. Należy jednak dodać, że zmniejszanie się kwasu glutaminowego odbywało się stopniowo, zaś spadek glutaminy był bardzo szybki. Świadczy to, że zapotrzebowanie na glutaminę było w tym okresie spoczynku większe, niż na kwas glutaminowy. Prawdopodobnie związane to było z tworzeniem się białek o znacznym udziale glutaminy. Można również przyjąć, że gwałtowne obniżenie się glutaminy związane było z jednoczesnym zwiększaniem ilości asparaginy (rys. 2). Istnieje bowiem możliwość przemiany pewnej części glutaminy w asparaginę. Bardziej jednak prawdopodobne wydaje się przypuszczenie, że biosynteza asparaginy zachodziła głównie kosztem kwasu szczawiooctowego jako ogniwa cyklu Krebsa i grup aminowych zdysymilowanych ami-

Tabela 2 — Table 2

Poziom wolnych aminokwasów w ziarnie jęczmienia jarego będącego w stanie spoczynku późniejszego (w mg/100 g suchej masy)

Free amino acids content in the spring barley grain during after-ripening dormancy (in mg/100 g of dry matter)

Próby Samples	Data pobrania próby Date of sam- pling	Aminokwasy w ziarnie nasyconym wodą Amino acids in grain imbibed with water																Suma amino- kwa- sów Sum of amino acids		
		Leucine + isoleucine	Phenylalanine	Valine	γ-aminobutric acid	Tryptophan	Tyrosine	Proline	α-alanine	Threonine	Glutamic acid	Serine	Glycine	Aspartic acid	Glutamine	Asparagine	Arginine		Lysine + histidine	Cystine
2'	24.VIII	47,0	14,3	38,6	42,6	+	62,8	+	52,2	20,0	111,8	53,3	47,3	15,0	95,0	52,0	29,7	40,9	+	722,5
4'	10.IX	30,0	11,4	35,1	51,2	+	66,3	+	44,2	20,3	129,4	65,3	26,2	16,0	66,7	26,0	27,7	31,8	+	649,6
6'	1.X	70,1	14,5	42,0	69,2	+	80,0	+	67,0	21,6	120,6	86,9	52,5	20,2	127,8	42,9	38,1	54,5	+	907,9
7'	20.X	69,1	14,5	42,1	66,7	+	83,5	+	61,6	20,3	147,0	86,9	61,2	18,7	105,5	36,4	44,6	40,9	+	899,0
X	—	199,9	100,0	126,3	76,0	+	136,0	+	80,3	55,9	64,7	—	26,2	68,3	438,9	156,0	45,6	22,7	+	1596,8

nokwasów w obecności ATP. Na taki przebieg biosyntezy tego amidu w nasionach spoczynkowych wskazują również badania Bradbeera i Colmana (1963).

Szczególnie interesujące było wyraźne obniżenie się zawartości wielu aminokwasów i amidów w końcowej fazie spoczynku ziarna. Nasuwa to przypuszczenie nasilenia w omawianym okresie spoczynku ziarna syntezy białek, być może nawet o charakterze enzymatycznym. Należy przy tym założyć, że zachodziła wówczas przynajmniej częściowa derepresja aparatu genetycznego, gdyż w innym wypadku nie byłaby możliwa synteza m-RNA i białka enzymatycznego. Pogląd taki znajduje częściowe potwierdzenie w kształtowaniu się dynamiki naturalnych inhibitorów wzrostu w trakcie spoczynku ziarna jęczmienia jarego (Rejowski i Kułka 1967). Wspomniani autorzy stwierdzili zanikanie naturalnych inhibitorów w ziarnie pod koniec okresu spoczynku.

Przytoczone wyżej dane, dotyczące zmian ilościowych w poziomie wolnych aminokwasów i amidów sugerują, że w trakcie posprzętnego dojrzewania ziarna, a szczególnie w pierwszym okresie, aktywność wykazują nie tylko enzymy proteolityczne (proteinyazy), ale również enzymy odpowiedzialne za metabolizm aminokwasów (transaminazy, dehydrogenazy i inne).

2. Aminokwasy w ziarnie nasyconym wodą. Jak już zaznaczano uprzednio, ziarno jęczmienia będące w stanie powietrzno-suchym uzyskało gotowość do kiełkowania po upływie około ośmiu tygodni suchego przechowywania, natomiast ziarno nasycone wodą po 8 tygodniach przebywania na kiełkowniku nie skiełkowało (poza bardzo nielicznymi wyjątkami). Znaczna część tego ziarna kiełkowała dopiero po 9 miesiącach. Wilgotność ziarna podczas trwania eksperymentu nie ulegała większym wahaniom i wynosiła w przybliżeniu 50%, zaś straty suchej masy w okresie pierwszych 20 dni również były niewielkie (2,5%). Po zakończeniu doświadczenia ubytek suchej masy ziarna wynosił 9%. W nielicznych ziarnach, które skiełkowały po 3 tygodniach pęcznienia, straty suchej masy osiągnęły 20%.

W składzie jakościowym aminokwasów ziarna przechowywanego w stanie powietrzno-suchym i ziarna nasyconego wodą nie stwierdzono różnic (tabele 1 i 2). Wyraźne jednak różnice zarysowały się w ilości poszczególnych aminokwasów. W ziarnie napęczniałym (seria B) obserwowano wyraźny spadek ogólnej zawartości aminokwasów (próby 2' i 4') w porównaniu z ilością tych związków zawartych w ziarnie powietrzno-suchym (seria A — próby I—IV).

Spadek ten spowodowany był obniżeniem się w pierwszych dwóch próbach ziarna napęczniałego głównie zawartości kwasu asparaginowego i γ -aminomasłowego oraz glicyny i argininy. Zmniejszenie się ilości czterech wymienionych aminokwasów w ziarnie serii B, w omawianej fazie doświadczenia, nie wiązało się z przyrostem amidów — glutaminy i asparaginy, co świadczy, że aminokwasy te nie podlegały wówczas procesom dysymilacyjnym, lecz zostały prawdopodobnie zużyte do syntezy białka. W związku z tym istnieje również małe prawdopodobieństwo aby w napęczniałym ziarnie (próby 2' i 4') miały miejsce przemiany jednych aminokwasów w drugie (tzw. wtórna synteza aminokwasów). Jak wiadomo, ten ostatni proces jest charakterystyczny dla nasion kiełkujących.

W następnym etapie doświadczenia (próby 6' i 7') zawartość aminokwasów wyraźnie się zwiększała. Było to następstwem rozpadu białek zapasowych oraz ubytku suchej masy ziarna.

Ziarno kiełkujące miało znacznie wyższy poziom wolnych aminokwasów (tabela 2, próba X), niż ziarno nasyczone wodą i będące w spoczynku. Drugą istotną różnicą były stosunki ilościowe pomiędzy poszczególnymi aminokwasami. Podczas kiełkowania w ziarnie gromadziły się duże ilości glutaminy, asparaginy, leucyny i innych aminokwasów, natomiast niewielkie ilości kwasu glutaminowego i aminokwasów zasadowych. Tego rodzaju zmiany w dynamice aminokwasów, towarzyszące kiełkowaniu ziarna, były wyrazem intensywnie przebiegających w nim procesów syntezy i rozpadu różnych białek, czego nie stwierdzono w ziarnie naępczniałym.

W ziarnie serii B (naępczniałym), w przeciwieństwie do ziarna serii A, nie obserwowano tak wyraźnych zmian w dynamice wolnych aminokwasów. Potwierdza to w pewnej mierze przypuszczenie wysunięte już poprzednio, że w stanie powietrzno-suchym tworzyły się w ziarnie różnorodne białka (enzymy), które między innymi warunkowały ustąpienie spoczynku. W ziarnie serii B (naępczniałym) proces tworzenia się białek był prawdopodobnie powolny wskutek zahamowania aktywności znacznej części aparatu genetycznego. Rezultatem tego były małe zmiany w dynamice aminokwasów.

STRESZCZENIE I WNIOSKI

Badania przeprowadzono na ziarnie jęczmienia jarego, będącego w stanie spoczynku późniwnego. Świeżo zebrane ziarno podzielono na dwie grupy. Ziarno pierwszej grupy przechowywano w stanie powietrzno suchym w laboratorium. Ziarno drugiej grupy (nasyczone wodą) trzymano na kiełkowniku. Przeciętnie co 10 dni pobierano próbki ziarna do analizy wolnych aminokwasów. Stwierdzono:

1. Ziarno jęczmienia, będące w stanie powietrzno-suchym, uzyskało gotowość do normalnego kiełkowania po 8 tygodniach przechowywania w laboratorium. Po analogicznym okresie czasu ziarno naępczniałe nie uzyskało zdolności kiełkowania.

2. W spoczynkowym ziarnie powietrzno-suchym zachodzą istotne zmiany zawartości wolnych aminokwasów. W miarę upływu spoczynku późniwnego wyraźnie zmniejsza się ilość kwasu glutaminowego i glutaminy, natomiast zawartość asparaginy, glicyny i argininy zwiększa się w pierwszej połowie okresu spoczynku, a następnie maleje.

3. Zawartość większości wolnych aminokwasów i amidów wyraźnie obniża się w końcowej fazie spoczynku ziarna.

4. Uzyskane wyniki sugerują, że w trakcie posprzętnego dojrzewania ziarna jęczmienia jarego (będącego w stanie powietrzno-suchym) zachodzi w nim dość intensywny metabolizm aminokwasów. Prawdopodobnie jest on związany z wytwarzaniem się w ziarnie spoczynkowym białek (być może o charakterze enzymatycznym), warunkujących w pewnym zakresie likwidację spoczynku.

5. W ziarnie napęczniałym, w przeciwieństwie do ziarna będącego w stanie powietrzno-suchym, nie obserwuje się tak wyraźnych zmian w dynamice wolnych aminokwasów.

Panu Prof. Dr Stanisławowi Grzesiukowi składamy serdeczne podziękowanie za cenne wskazówki i pomoc w czasie wykonywania niniejszej pracy.

Katedra Fizjologii Roślin

WSR w Olsztynie

Kierownik Katedry: Prof. dr St. Grzesiuk

SUMMARY AND CONCLUSIONS

Studies were made of the spring barley after-ripened dormancy.

As soon as the barley was harvested, the grains were separated into two groups. One was stored in the laboratory at room temperature, and the other was first soaked in water, and then placed in germinating dishes and allowed to germinate. Approximately at ten-days intervals the grain samples from both groups were taken for free amino acids determination. It was found that:

1. The air-dry barley grains kept in the laboratory at room temperature were able to germinate normally after 8 weeks of storage. The imbibed grains, on the other hand, did not to germinate after this time period.

2. In the dormant air-dry grain vital changes occur in the content of free amino acids. As the after ripening dormancy progresses the amount of glutamic acid and glutamine decreases. The contents of asparagine, glycine and arginine increase in the first half of dormancy and decrease in the second.

3. At the end of dormancy most free amino acids and amides markedly decrease.

4. The results obtained indicate that in the course of after-harvest ripening of the barley grain, the metabolism of amino acids goes on quite intensively. Probably it is associated with protein formation (perhaps enzymatic in character) which has some bearing on breaking of dormancy.

5. Contrary to air-dry grains, no such distinct changes in free amino acids were observed in the imbibed grains.

High School of Agriculture, Olsztyn

Department of Plant Physiology

Head: Prof. dr St. Grzesiuk

LITERATURA

- Bradbeer J. W., Colman B., 1963, Internal. Symp. Physiol. Ecol. and Biochem. of Germination (Greifswald), A VII a I (Według Vegisa 1964).
- Bradbeer J. W., Floyd V. H., 1964, Nucleotide synthesis in hazel seeds during after ripening, *Nature* 201 (4914): 99—100.
- Grzesiuk St., 1967, *Fizjologia nasion*, Warszawa.
- Kaniuga Z., 1960, *Metabolizm aminokwasów i białek*. [W:] *Zagadnienia metabolizmu roślin w świetle izotopowej metodyki badań*, Warszawa.

- Mejbaum-Katzenellenbogen W., Morawiecka B., 1963, Albuminowa frakcja białek ziarna pszenicy (*Triticum vulgare* L.) odmiany 'Olza' podczas przechowywania i kiełkowania, *Hodowla Roślin, Aklimatyzacja i Nasiennictwo* 7(2): 117—125.
- Metlickij L. W., Korablewa N. P., 1965, *Biochimia pokoja zapasajuszczich organow rastienij*, Moskwa.
- Prochorowa A. P., Kretowicz W. L., 1958, O fermentatiwnych processach w chranjaszczichsia suchich rastitelnych materiałach, *Biochimia zerna* 4:132—138.
- Rejowski A., Kulka K., 1967, Rola naturalnych inhibitorów wzrostu i kwasów nukleinowych w kształtowaniu spoczynku ziarna jęczmienia jarego (w druku)
- Szwecowa W. A., Sosedow N. I., 1958, Biochimizskije izmienia pri dlitelnom chranenii pszenicy w germetizieskich usłowijach. *Biochimia ziarna* 4: 229—241.
- Tuan D. Y. H., Bonner J., 1964, Dormancy associated with repression of genetic activity, *Plant Physiol.* 39(5): 768—772.
- Vegis A., 1964, Dormancy in higher plants, *Ann. Rev. of Plant Physiol.* 15: 185—224.