Wpływ kwasu giberelowego na poziom aminokwasów w kiełkujących ziarnach jęczmienia i owsa

*The influence of gibberellic acid on the level of amino acids in germinating corn barley
and oats seeds*

R. DĄBROWSKA, Z. WIERZCHOWSKA i P. WIERZCHOWSKI

Gibereliny — hormony roślinne, stymulujące procesy kiełkowania, wzrost i kwitnienie wielu roślin znalazły praktyczne zastosowanie do produkcji słoðu. Korzystne efekty odnoszą się nie tylko do przyspieszenia cyklu produkcji, lecz również ekstrakty kiełkujących nasion zbóż traktowanych giberelinami, zawierają większe ilości enzymów i innych składników rozpuszczalnych (Hayashi 1940; Birecka i wsp. 1962; Verner 1964).

Zagadnienie wolnych aminokwasów podczas kiełkowania jest mało zbadane i dotyczyło głównie dwuliściennych. Badania przeprowadzone przez Ganaguli (1954) na łubinie w warunkach normalnych bez hormonizacji wykazują istnienie ciekawych zmian w poziomie aminokwasów zasadowych: argininy, lizyny i histydyny w miarę rozwoju procesu kiełkowania. Istnieją również różnice gatunkowe, a mianowicie stwierdzono, że podczas kiełkowania fasoli następuje spadek wolnej glicyny natomiast w łubinie w tych warunkach obserwuje się wzrost poziomu tego aminokwasu (Aronoff 1962).

Ostatnio zainteresowanie wzbudziło zagadnienie wpływu giberelin na metabolizm wolnych aminokwasów podczas kiełkowania nasion. Herich (1961) przeprowadzając badania na nasionach konopii, zauważył, że stosowanie giberelin podczas kiełkowania wpływa na metabolizm aminokwasów i amidów kwasowych, co wyraża się w ich zmianach jakościowych i ilościowych w porównaniu z kontrolą. Zwróciło uwagę zachowanie alaniny, której stężenie okazało się proporcjonalne do dawek kwasu giberelowego.

Istatkow i Edreva (1961) śledzili biochemiczne zmiany w kiełkujących bulwach ziemniaków, traktowanych kwasem giberelowym. Oznaczenia chromatograficzne wykazały, że bulwy i ich kiełki hormonizowane, różnią się od kontrolnych jakością i stężeniem aminokwasów. Autorzy ci wyrażają pogląd, że stosowanie giberelin może wpływać zarówno na syntezę jak też dezaminację aminokwasów podczas kiełkowania.

Celem dalszego wyjaśnienia wpływu różnych dawek kwasu giberelowego na metabolizm aminokwasów podjęto badania nad składem wolnych aminokwasów w kiełkującym jęczmieniu i owsie.

MATERIAŁ I METODY

Badania prowadzono na ziarnach owsa zwyczajnego *Avena sativa* i jęczmienia zwyczajnego *Hordeum sativum*.

Odpowiednie ziarna w próbkach po 25 g moczono w ciągu 48 godz. w 100 ml roztworu kwasu giberelowego (KG) o następujących stężeniach 1 mg, 5 mg, 10 mg KG w litrze wody. Próbką kontrolną zawierała wodę destylowaną bez kwasu giberelowego. Następnie ziarna umieszczano w termostacie o temperaturze 17–18°C na podłożu z bibuły nawilgoconej odpowiednim roztworem kwasu giberelowego. W termostacie była utrzymana stała wilgotność, przez ustawienie szeregu naczyń i ułożenie bibuły zanurzonej końcami w wodzie. Do pomiaru długości korzonków i kielków oraz zawartości aminokwasów pobierano próbki w drugim i piątym dniu kiełkowania. Oznaczono też stężenie aminokwasów w ziarnie suchym nie poddanym kiełkowaniu. Po usunięciu ziaren martwych, ziarna skiełkowane suszono w temperaturze 50°C, dokładnie rozcierano w moździerzu i suszono do stałej wagi.

Aminokwasy kilkakrotnie ekstrahowano 70% roztworem alkoholu etylowego, ekstrakt zagęszczano, rozpuszczano w wodzie i odsalano na amberlicie IR-120 w formie wodorowej. Dla ustalenia stosunku glutaminy do kwasu glutaminowego analizy wykonano również na materiale nie poddanym odsalaniu.

Wstępną identyfikację aminokwasów w odsolonych ekstraktach przeprowadzano za pomocą chromatografii jednokierunkowej w układzie butanol: kwas octowy; woda, w stosunku 12 : 3 : 8. Do pełnej identyfikacji i oznaczeń ilościowych aminokwasów wykorzystano metodę chromatografii kolumnowo-bibułowej. W metodzie tej wyciek z kolumny jest zbierany na automatycznie przesuwające się arkusze bibuły Whatman Nr. 1, które następnie rozwija się w odpowiednim układzie rozpuszczalników. Na kolumny wypełnione skrobią nanoszono ekstrakt, a następnie eluowano wg wariantu alkalicznego metody kolumnowo-bibułowej (Wierchowski i wsp. 1962) etanolem wzbogaconym stopniowo amoniakiem lub wg wariantu kwaśnego (Wierchowski i wsp. 1964) roztworem etanolem zawierającym 0,5% kwasu solnego. Chromatogramy bibułowe rozwijano w metanolu, wybarwiano roztworem ninhydryny i oznaczano kolorymetrycznie wg Kay'a (1956).

WYNIKI I DYSKUSJA

Wyniki analizy aminokwasów w kiełkujących ziarnach jęczmienia i owsa w miarę rozwoju procesu kiełkowania w zależności od stężenia kwasu giberelowego podane są w tabelach 1 i 2. W ziarnach jęczmienia oznaczono 17 aminokwasów oraz kolaminę, przy czym brak jest metioniny, obecnej w ziarnach owsa. Zróżnicowanie gatunkowe przejawia się też w występowaniu w ziarnach owsa dodatkowej substancji barwiącej się ninhydryną uwidocznionej na rycinie 1, przedstawiającej chromatogram aminokwasów zawartych w ziarnach owsa jako plama X. Na podstawie lokalizacji tej plamy można stwierdzić, że nie jest ona żadnym z aminokwasów występującym w hydrolizatach białkowych, a raczej nietłną aminą, lub aminoalkoholem.

Tabela 1 — Tabela 1

Poziom aminokwasów w μ molach/g nasion jęczmienia przy różnych dawkach kwasu gibberelowego

KG — kwas gibberelowy, K — kontrola, 1, 5, 10 — dawki KG w mg/l, O — przed kiełkowaniem

The level of amino acids (μ mol/g) in barley seeds in dependence of the doses gibberellic acid.KG — gibberellic acid, K — control, 1, 5, 10 — the doses of KG in μ g/ml, O — before germination

Lp.	Aminokwas Amino acid	O-przed kiełko- waniem before germi- nation	2-gi dzień kiełkowania second day germination				5-ty dzień kiełkowania fifth day of germination			
		K	K	1	5	10	K	1	5	10
1.	Alanine	2,50	6,7	4,8	8,4	7,8	9,9	10,8	11,5	14,7
2.	β -alanine	śl.	śl.	śl.	śl.	śl.	śl.	śl.	śl.	śl.
3.	Arginine	śl.	2,0	1,9	4,7	2,9	3,1	4,2	5,3	5,8
4.	Asparagine	2,35	13,7	9,4	11,7	9,3	42,9	46,9	61,0	74,1
5.	Aspartic acid	0,51	2,9	3,6	6,1	2,3	4,8	4,7	6,7	4,3
6.	Colamine	2,35	5,2	4,5	4,8	4,5	4,5	4,4	4,4	4,3
7.	Glutamine	1,1	7,7	śl.	6,3	4,3	26,9	30,7	33,0	34,0
8.	Glutamic acid	1,07	6,3	7,9	8,0	7,5	7,8	8,5	10,4	10,7
9.	Glycine	1,49	2,0	1,9	4,7	2,9	5,5	5,8	8,5	8,5
10.	Histidine	śl.	1,6	śl.	2,5	1,5	śl.	śl.	śl.	śl.
11.	Leucine+isoleucine	1,02	17,2	13,3	17,0	20,1	19,7	24,1	25,4	26,3
12.	Lysine	śl.	3,0	1,6	4,4	3,7	3,2	3,3	3,8	4,2
13.	Nonidentified spot X	śl.	śl.	śl.	śl.	śl.	1,7	1,7	1,7	1,5
14.	Phenylalanine	0,41	8,9	14,1	8,8	9,8	12,7	12,7	13,0	16,9
15.	Proline	1,95	8,8	15,9	19,7	16,2	29,6	31,1	35,8	48,5
16.	Serine	1,36	5,9	3,5	7,3	6,6	5,7	8,0	8,0	9,5
17.	Threonine	2,77	7,9	5,9	10,1	5,1	10,5	11,5	12,3	18,1
18.	Tyrosine	śl.	4,0	3,2	5,7	5,6	śl.	śl.	śl.	śl.
19.	Valine	1,14	7,7	4,1	9,5	9,7	12,8	14,4	15,2	15,9

Plama X ekstynkcja i obliczenia jak dla kolaminy

Spot X extinction and calculation as for colamine.

Ryc. 1. Chromatogram aminokwasów występujących w kiełkujących ziarnach owsa

leu — leucyna, val — walina, phe — fenyloalanina, meth — metionina, pro — prolina, tyr — tyrozyna, ala — alanina, glu — kwas glutaminowy, asp — kwas asparaginowy, thr — threonina, β ala — β alanina, ser — seryna, glu-NH₂ — glutamina, gly — glicyna, his — histydyna, asp-NH₂ — asparagina, et-NH₂ — kolamina, lys — lizyna, arg — arginina

Chromatogram of amino acids composition in germinating oats seeds.

leu — leucine, val — valine, phe — phenylalanine, meth — methionine, pro — proline, tyr — tyrosine, ala — alanine, glu — glutamic acid, asp — aspartic acid, thr — threonine, β ala — β alanine, ser — serine, glu-NH₂ — glutamine, gly — glycine, his — histidine, asp-NH₂ — asparagine, et-NH₂ — colamine, lys — lysine, arg — arginine.

Tabela 2 — Tabela 2

Poziom aminokwasów w μ molach/g nasion owsa przy różnych dawkach kwasu giberelowego
 KG — kwas giberelowy, K — kontrola, 1, 5, 10 — dawki KG w mg/l, O — przed kiełkowaniem

The level of amino acids (μ mol/g) in oats seeds in dependence of the doses gibberellic acid
 KG — gibberellic acid, K — control, 1, 5, 10 — doses of KG in mg/l. O — before germination.

Lp.	Aminokwas Amino Acid	O-przed kiełko- waniem before germi- nation	2-gi dzień kiełkowania second day of germination					5-ty dzień kiełkowania fifth day of germination			
		K	K	1KG	5KG	10KG	K	1KG	5KG	10KG	
1	Alanine	1,45	3,3	2,8	3,6	3,1	7,1	8,2	9,6	9,2	
2	β-alanine	śl.	śl.	śl.	śl.	śl.	śl.	śl.	śl.	śl.	
3.	Arginine	śl.	1,9	0,65	1,3	0,68	1,7	2,9	3,8	3,6	
4.	Asparagine	5,90	9,4	6,3	11,3	6,2	16,5	18,1	20,2	19,0	
5.	Aspartic acid	1,26	2,7	2,1	2,4	1,9	2,6	3,5	5,0	4,8	
6.	Colamine	4,10	5,1	4,1	3,3	3,0	3,1	3,1	3,1	2,8	
7.	Glutamine	1,65	4,8	3,3	3,9	3,1	15,3	16,2	16,7	17,0	
8.	Glutamic acid	2,26	6,7	3,9	4,8	4,1	8,0	8,6	9,4	9,2	
9.	Glycine	0,77	2,3	1,8	2,5	1,7	3,2	3,1	3,7	4,5	
10.	Histidine	śl.	śl.	0,7	0,5	0,8	0,8	0,9	1,1	1,0	
11.	Leucine+isoleucine	0,90	4,7	2,4	4,1	2,3	7,9	11,5	12,9	13,3	
12.	Lysine	śl.	2,2	0,78	1,7	0,59	2,3	3,0	3,7	3,5	
13.	Methionine	—	śl.	śl.	śl.	śl.	śl.	śl.	śl.	śl.	
14.	Phenylalanine	śl.	3,4	1,6	2,1	1,7	4,6	6,2	7,4	8,1	
15.	Proline	0,98	4,4	3,1	5,4	4,4	6,2	10,4	14,3	11,3	
16.	Serine	0,70	2,2	2,1	2,7	2,6	4,2	4,8	5,7	6,7	
17.	Threonine	1,39	3,8	2,5	3,4	2,0	4,9	5,8	7,7	8,0	
18.	Tyrosine	śl.	śl.	śl.	śl.	śl.	śl.	śl.	śl.	śl.	
19.	Valine	0,53	1,9	1,3	2,5	1,3	4,0	5,8	6,7	6,4	

Zawartości poszczególnych aminokwasów dla owsa są niższe w porównaniu z jęczmieniem. Różnice te mogą być spowodowane różnymi fazami kiełkowania, gdyż po 5-ciu dniach kiełkowania owsa brak jeszcze kiełków, podczas gdy u jęczmienia długość ich dochodzi do 0,5 cm. Fazy te jednak nie mogą być zbyt odległe, ponieważ długość korzonków po 2 i 5 dniach kiełkowania jest jednakowa dla obydwu zbóż.

Podczas kiełkowania zaobserwowano na ogół powolny i systematyczny przyrost aminokwasów. Spośród aminokwasów obojętnych najbardziej intensywny przyrost wykazuje leucyna (oznaczona w naszych analizach razem z izoleucyną), która w piątym dniu kiełkowania hormonizowanego jęczmienia przy dawce (5 mg KG/l) osiąga poziom 25,4 μ mola/g, a w wypadku owsa — 12,9 μ mola/g. Inne aminokwasy obojętne: alanina, treonina, walina, seryna i glicyna wykazują bardziej umiarkowany przyrost stężenia w granicach od 8—15 μ moli/g dla jęczmienia i 1—10 μ moli dla owsa (ryc. 2).

Szczególnie charakterystyczne jest intensywne nagromadzenie się amidów:

Ryc. 2. Zmiany stężenia aminokwasów obojętnych podczas kiełkowania nasion zbóż: A — jęczmienia, B — owsa, hormonizowanych 5 mg KG/l

The changes of concentration of the neutral amino acids during germination of corn seeds: A — barley B — oats, which were hormonized 5 mg KG/l.

Ryc. 3. Zmiany stężenia aminokwasów kwaśnych i ich amidów podczas kiełkowania nasion zbóż: A — jęczmienia, B — owsa, hormonizowanych 5 mg KG/l

The changes of concentration of the amino acids and their amides, during germination of corn seeds A — barley, B — oats, which were hormonized 5 mg KG/l.

Ryc. 4. Zmiany stężenia aminokwasów zasadowych podczas kiełkowania nasion zbóż: *A* — jęczmienia, *B* — owsa, hormonizowanych 5 mg KG/l

The changes of concentration of the basic amino acids during germination corn seeds: *A* — barley, *B* — oats, which were hormonized 5 mg KG/l

asparaginy i glutaminy, które w piątym dniu kiełkowania osiągają dla hormonizowanego jęczmienia wartości 61,0 μ mola/g i 33,0 μ mola/g, a dla owsa odpowiednio 20,2 μ mola/g i 16,7 μ mola/g. Przyrost odpowiednich aminokwasów; glutaminowego i asparaginowego jest powolny (ryc. 3). Tak więc np. stosunek glutaminy do kwasu glutaminowego wzrasta w okresie kiełkowania jęczmienia dziesięciokrotnie. Świadczy to o intensywności procesów dezaminacji i transaminacji.

Aminokwasy zasadowe: arginina, lizyna i histydyna nie wykazują większych wahań podczas procesu kiełkowania (ryc. 4).

Jak widać z powyższych zestawień stosowanie kwasu giberelowego wyraźnie wpływa na poziom aminokwasów i amidów w nasionach kiełkującego owsa i jęczmienia.

W drugim dniu kiełkowania owsa i jęczmienia dawka kwasu giberelowego 5 mg/l, powoduje maksymalny przyrost poziomu aminokwasów.

Przy dawkach mniejszych — 1 mg/L i większych — 10 mg/L sumaryczny poziom aminokwasów po dwu dniach kiełkowania jest niższy nawet, niż w nasionach kiełkowanych bez podania kwasu giberelowego. Zależność poziomu aminokwasów od dawek kwasu giberelowego w piątym dniu kiełkowania ma już inny przebieg. W granicach stosowanych stężeń KG — od 1 do 10 mg/L obserwuje się stopniowy wzrost poziomu aminokwasów (ryc. 5).

Z doświadczeń Istatkowa i Edrevej (1961) wiadomo, że w wypadku ziemniaków traktowanych kwasem giberelowym zawartość protein obniża się znacznie w porównaniu z kontrolą. Świadczyłoby to po podwyższonej intensywności procesów hydrolitycznych pod wpływem kwasu giberelowego.

Ponieważ w naszych badaniach kiełkowanie jęczmienia i owsa, jak też rozwój siewek przebiegały w środowisku wodnym bez podawania do podłoża aminokwasów, znaczny przyrost ich stężenia pod wpływem KG, może świadczyć o stymulowaniu

Ryc. 5. Sumaryczny poziom aminokwasów i długość korzonków oraz kielków po 2 i 5 dniach kiełkowania *A* — jęczmienia, *B* — owsa, w zależności od stężenia KG. *K* — kontrola, 1, 5, 10 — dawki KG w mg/l

The total level of amino acids and length of roots and germs after two and five days of germination *A* — barley, *B* — oats, in dependence of the doses of gibberellic acid, *K* — control, 1, 5, 10 — the doses KG in mg/l.

proteolizy tylko w późniejszym okresie kiełkowania. Można wnioskować, że wpływ KG nie jest spowodowany bezpośrednią aktywacją enzymów proteolitycznych.

Z doświadczeń wynika, że działanie kwasu giberelowego w zastosowanych dawkach powoduje wyraźniej zaznaczone efekty na procesy związane z metabolizmem aminokwasów, niż na przebieg kiełkowania nasion i rozwój siewek określony długością korzonków kiełkujących ziaren. Wpływ różnych dawek kwasu giberelowego na poziom aminokwasów i długość korzonków nie zawsze jest zgodny (ryc. 5). Po dwóch dniach kiełkowania, kiedy długość korzonków w zależności od stężenia kwasu giberelowego stale się zwiększa, poziom aminokwasów wyraźnie zależy od dawek KG — pierwsza 1 mg/L powoduje znaczne obniżenie poziomu aminokwasów, druga — 5 mg/L maksymalny przyrost i trzecia — 10 mg/L spadek.

Po pięciu dniach przyrost poziomu aminokwasów jak i długości korzonków w przypadku owsa są wprost proporcjonalne do stężenia kwasu giberelowego.

U jęczmienia, wykazującego w procesie kiełkowania szybsze i bardziej dynamiczne zmiany, przyrost stężenia aminokwasów jest proporcjonalny do stężenia kwasu giberelowego, natomiast nie obserwuje się już przyrostu długości korzonków przy zwiększeniu dawek KG w porównaniu z dawką 1 mg/L (ryc. 5a).

Autorzy składają podziękowanie Komitetowi Biochemicznemu PAN za dotację przyznaną na prowadzenie niniejszej pracy.

STRESZCZENIE

Badano wpływ różnych dawek kwasu giberelowego na poziom aminokwasów w kiełkujących ziarnach jęczmienia i owsa.

W początkowym okresie tj. w 2-gim dniu kiełkowania dawka kwasu giberelowego 5 mg/L powoduje maksymalny przyrost poziomu aminokwasów. Użycie dawek mniejszych lub większych hamuje przyrost aminokwasów.

W późniejszym okresie kiełkowania (po 5-ciu dniach) przyrost stężenia aminokwasów jest proporcjonalny do wielkości dawki kwasu giberelowego w granicach od 1—10 mg KG/L.

Działanie gibereliny GA₃ powoduje wyraźniej zaznaczone efekty na procesy związane z metabolizmem aminokwasów niż na kiełkowanie nasion i rozwój siewek określony długością korzonków.

*Katedra Chemii Ogólnej
Akademii Medycznej w Warszawie*

SUMMARY

The influence of various doses of gibberellic acid on the level of amino acids in germinating corn barley and oats seeds was investigated. Gibberellin influences distinctly the level of amino acids and amides in germinating corn seeds. In the first period, i.e. on the second day of germination, the dose of gibberellic acid (5 mg KG/l) was optimal, causing the greatest increase of the amino acids level. Application of amounts smaller or larger than optimal inhibits the increase of the amino acids level. In the later period (five days) the concentration increase of amino acids is proportional to the gibberellic acid dose.

The action of gibberellic acid is more pronounced in regard to the processes connected with metabolism of amino acids, than to the course of germination of seeds measured by the length of roots.

LITERATURA

- Aronoff S., 1962, Amino Acid Pools, p. 657, J. Holden, Amsterdam.
- Birecka H., Żebrowska J., 1962, Acta Soc. Bot. Pol. 31 (3): 587—599.
- Ganaguli N. C., 1954, Naturwiss. 1: 140—143.
- Hayashi T., 1940, Jour. agr. Chem. Soc. Jap. 1: 511—521.
- Hayashi T., 1940, Ibidem 1: 531—538.
- Herich R., 1961, Physiol. Plant. 14 (1): 111—114.
- Istatkow St., Edreva A., 1961, Dokl. Bolg. A.N. 14 (1): 91—94.
- Kay R. W., Harris D. C., Entenman C., 1956, Arch. Biophys. 63: 14—25.
- Niekrasowa T. V., 1960, Fizj. Rastienij 7: 106—109.
- Verner J. E., 1964, Plant. Physiol. 39: 413—415.
- Wierzchowski P., Janczarski I., Kruze D., 1962, Acta Bioch. Pol. 9: 343—349.
- Wierzchowski P., Kruze D., 1964, J. Chromatography. 14: 194—198.