Metabolizm azotowy we wczesnych stadiach rozwoju soi

Nitrogen metabolism in early stages of soybean growth

R. SKÓRKO, I. CHMIELEWSKA

WSTĘP

Nasiona soi, podobnie jak i nasiona innych roślin strączkowych, charakteryzują się dużą zawartością związków azotowych, wśród których dominują białka zapasowe. Jak wykazały badania Krobiera i Gibbonsa (1962) w zdrowych, dojrzałych nasionach soi ilość azotu białkowego wynosi około 95%, a ilość azotu niebiałkowego około 5% azotu ogólnego.

Z dotychczasowych badań przeprowadzanych głównie w Japonii (Kondo, Mori, Kajina 1954, Izawa, Okamoto 1965) nad kiełkującymi nasionami uprawianych tam odmian soi wiadomo, że w czasie zużytkowania białek zapasowych, azot w nich zawarty przechodzi do związków niskocząsteczkowych. Celem tej pracy było bardziej szczegółowe zbadanie zmian zachodzących zarówno w wysoko, jak niskocząsteczkowych związkach azotowych w pierwszych stadiach rozwoju soi.

MATERIAŁY I METODY

Do doświadczeń użyto nasion soi (super elita) odmiany 'Warszawska' (*Glicine hispida* Max., var. *Warszawska*) ze zbioru w 1964 r. w Stacji Hodowlano-Badawczej IHAR, Radzików.

Kiełkowanie przeprowadzano w temp. 18—20°C na namoczonej ligninie w kuwetach przykrytych od góry folią polietylenową. Skiełkowane nasiona o długości kiełków 1,5—2,0 cm przenoszono na perforowaną, parafinowaną gazę i dalszą hodowlę przeprowadzano w kulturze wodnej (woda wodociągowa) na świetle.

Do badań używano:

- a) suche nasiona (etap I),
- b) nasiona skiełkowane (etap II),
- c) rośliny w stadium rozwojowym liścieni (etap III),
- d) rośliny w stadium rozwojowym pierwszej pary liści (etap IV).

Analizy wykonano na materiale przygotowanym w pięciu powtórzeniach, zawierających każdorazowo po 200 nasion lub roślin. Materiał do

analiz przygotowywano przez zamrażanie w suchym lodzie poszczególnych partii nasion, całych roślin oraz roślin dzielonych na liście, pędy i korzenie. Dalej postępowano według schematu podanego na ryc. 1.

Ekstrakcja zliofilizowanego materiału bezwodnym acetonem miała na celu dokładniejsze odwodnienie (całkowite zliofilizowanie materiału roślinnego jest procesem długotrwałym) oraz usunięcie większości tłuszczów, które utrudniają ekstrakcję wodą. Odwodniony i odfuszczonej w ten sposób materiał roślinny jest stosunkowo trwały i może być przechowywany nad KOH w eksykatorze z ciemnego szkła w ciągu 4—6 miesięcy.

W przygotowanym materiale oznaczano:

- 1) N ogólny — metodą Kjeldahla (Belcher, Goobert 1945),
- 2) N amidowy ogólny — według Raacke (1957),
- 3) N amidowy glutaminy — metodą Reifera i Tarnowskiej, podaną w podręczniku: Brzeski i Kaniuga (1957),
- 4) N soli amonowych — wg Puchera, Vickery i Lavenwortha (1935),
- 5) N α -NH₂ w ekstrakcie wodnym przed i po jego hydrolizie gazometryczną metodą ninhydrynową Van Slyke'a (1943).

Ryc. 1 Przygotowanie materiału do analiz

Fig. 1 Preparation of material for analysis

1 — Frozen material (ca. -50°C) — grinding 2 — Ground material, 3 — Freeze dried material (total-N est.), — extraction with dried acetone (500 ml to 10 g of material), 4 — Acetone extract (total-N est.), 5 — Dried and defatted material (total-N est.) — extraction with water at 5°C, pH 7.2, 5 min. (4 times with 100 ml to 10 g of material each), 6 — Residue, 7 — Water extract — freeze drying, 8 — freeze dried material (total-N, protein-N, non protein-N, α -amino-N, amide-N, and ammonium-N est.)

Ponadto obliczono:

- 1) N amidowy asparaginy — z różnicy między ilością ogólnego azotu soli amonowych oraz azotu amidowego glutaminy,
- 2) N związków nie ekstrahujących się wodą oraz acetonem — z różnicy między wartością azotu ogólnego materiału surowego a sumą wartości azotu ogólnego ekstraktu wodnego oraz azotu zawartego w ekstrakcie acetonowym,
- 3) N α -NH₂ związany — z różnicy między ilością N α -NH₂ po hydrolizie a sumą wartości N α -NH₂ przed hydrolizą oraz ilości asparaginy.

Frakcje związków wysoko i niskocząsteczkowych uzyskiwano drogą sączenia molekularnego na kolumnie Sephadex G-50, sporządzonej według wskazówek Flodina (1962). Pęcznienie Sephadex i formowanie kolumny przeprowadzono w buforze, który następnie używano do rozdziału. Posłużono się buforem fosforanowym o pH 7,6 i sile jonowej 0,05. Rozdział na frakcje przeprowadzano na kolumnie analitycznej o wymiarach 2×50 cm oraz na kolumnie preparatywnej o wymiarach $3,4 \times 60$ cm. Do oznaczeń ilościowych odważano dokładnie 1,000 g badanego liofilizatu, rozpuszczano go w 10 ml kolbie miarowej używanym buforem, po czym odwirowywano niewielką ilość nierozpuszczalnych składników (8000 g/5 min.). Z tak uzyskanego supernatantu наносzono 2 ml na kolumnę analityczną. Związki wysokocząsteczkowe (białka) wypływały w pierwszych 85 ml, a niskocząsteczkowe w następnych 135 ml wycieku. Do preparatywnego wydzielania frakcji niskocząsteczkowej używano 2,0 g liofilizatu i zbierano wyciek wypływający między 300 a 900 ml.

Składniki frakcji niskocząsteczkowej rozdzielano na kolumnie kationowej (Amberlite IR-120 $\times$ 4 w formie H⁺) o wymiarach $2,7 \times 25$ cm na frakcję nieamfolitową (związki nieadsorbujące się na kolumnie i wypłukiwane z niej do zaniku kwaśnego odczynu wycieku wodą redestylowaną) oraz amfolitową (eluowaną z kolumny 100 ml 6 N NH₄OH a następnie 400 ml wody redestylowanej).

Rozpuszczalne w wodzie białka (związki wysokocząsteczkowe) dzielono na frakcje drogą sączenia molekularnego na kolumnie Sephadex G-200 o wymiarach 2×60 cm.

Do formowania kolumny i rozdziału używano 0,01 M merkaptoetanol w buforze fosforanowym o pH 7,6 i sile jonowej 0,5. Przed naniesieniem roztworu białek na kolumnę usuwano związki nieskokocząsteczkowe drogą dializy. W tym celu próby zawierające po 2,5 mg N białkowego rozpuszczano w 3 ml używanego do rozdziału buforu fosforanowego, nierozpuszczalną zawiesinę odwirowywano (8000 $\times$ g/5 min.), supernatant przenoszono ilościowo do woreczka dializacyjnego i dializowano przez 48 godzin w temperaturze 5°C względem 3 litrów tegoż buforu.

Tabela 1 — Table 1

Masa i zawartość różnych form azotu w poszczególnych frakcjach ze 100 nasion lub roślin
 Content of different nitrogen forms in and the weight of individual fractions from 100 seeds or plants

Etap rozwoju Stage of development	Materiał Material	Świeży Fresh		Po ekstrakcji acetonom After acetone extraction		Frakcja rozpuszczalna w wodzie Water-soluble fraction					
		masa weight g	N-ogól- ny total-N mg	masa weight g	N-ogól- ny total-N mg	masa weight g	N-ogól- ny total-N mg	N-biał- kowy pro- tein-N mg	N-nie- białko- wy non pro- tein-N mg	N-ami- dowy amide-N mg	
I	próba sample	1	15,0	732	13,6	719	8,8	498	426	64	49
		2	15,7	715	14,3	742	8,9	529	449	67	47
		3	14,8	—	13,5	689	8,8	495	422	59	49
		4	15,4	725	13,9	745	9,6	532	463	62	53
		5	15,0	—	13,6	718	9,8	551	460	63	54
	średnio mean		15,2	724	13,8	722	9,2	521	444	63	50
II	próba sample	1	41,8	710	13,2	707	8,1	477	389	81	52
		2	40,2	—	13,4	671	7,7	462	375	82	52
		3	42,6	692	13,1	705	8,1	469	386	74	57
		4	41,4	680	13,5	692	7,9	473	384	77	55
		5	39,3	—	13,2	685	8,4	512	418	79	58
	średnio mean		41,1	694	13,3	692	8,0	479	389	78	55
III	próba sample	1	92,4	674	10,7	642	6,7	441	210	218	98
		2	113,4	695	10,6	667	6,8	449	212	225	104
		3	87,9	662	10,8	651	6,8	441	217	207	95
		4	96,7	—	10,5	684	7,1	461	240	227	93
		5	98,4	—	11,0	659	7,2	452	209	223	94
	średnio mean		97,8	677	10,7	662	6,9	448	218	220	97
IV	próba sample	1	150,1	645	10,6	578	4,8	363	54	299	119
		2	152,0	660	10,3	588	4,6	362	49	301	119
		3	136,4	—	10,4	574	4,1	366	47	308	117
		4	140,8	621	10,9	551	4,8	380	49	316	127
		5	155,2	630	10,4	579	4,4	377	52	316	124
	średnio mean		146,9	639	10,5	575	4,5	370	50	310	121

WYNIKI I DYSKUSJA

W celu uzyskania możliwie dokładnego obrazu zmian ilościowych w obrębie różnych form związków azotowych w czasie pierwszych etapów rozwoju soi oraz określenia fizjologicznego rozrzutu wyników z każdego etapu przygotowywano po 5 oddzielnych prób. Otrzymane wyniki zestawiono w tabeli 1.

Zwraca uwagę strata N ogólnego między I a IV etapem rozwoju. Jeszcze większą stratę N ogólnego obserwuje się w materiale ekstrahowanym acetonem.

We frakcji związków azotowych rozpuszczalnych w wodzie w czasie rozwoju maleje wyraźnie N białkowy, a odpowiednio wzrasta N niebiałkowy i N amidowy.

1. Zmiany N ogólnego

W celu wyjaśnienia przyczyn strat azotu oznaczono N ogólny w łuskach i w ekstrakcie acetonowym (tabela 2). Łuski odpadają w czasie rozwoju rośliny i azot w nich zawarty nie był oznaczany w roślinach z III i IV etapu rozwoju. Po uwzględnieniu ilości azotu zawartego w łuskach jego utrata okazała się nadal wyraźna, gdyż między etapem I a IV wynosiła 73 mg N/100 nasion, co stanowi około 10% N ogólnego zawartego w nasionach spoczynkowych.

Ubytek N ogólnego w porównaniu z zaobserwowanym przez Danielssona (1951) 9%-owym ubytkiem w kiełkujących nasionach grochu oraz przez Ingle, Beevera i Hagemana (1964) 20%-owym ubytkiem w kiełkujących nasionach kukurydzy nie wydaje się być duży. Jednakże inni autorzy (Chibnal 1952; Rodionowa 1957, 1960) nie stwierdzali straty N ogólnego w czasie kiełkowania i dalszego rozwoju szeregu roślin w wodzie pozbawionej związków azotowych.

Zaobserwowaną u soi stratę N ogólnego można częściowo tłumaczyć dyfuzją poprzez korzenie rozpuszczalnych w wodzie związków azotowych. Wydalanie poprzez korzenie szeregu związków, a między innymi aminokwasów było stwierdzane już wielokrotnie (Frank 1954, Kandler 1951; Mc Kee 1962; Rovira 1956, 1959). Występowały one w glebie w stosunkowo niewielkich ilościach ze względu na ponowne ich absorbowanie przez korzenie rośliny lub zużywanie przez mikroorganizmy glebowe. Duża objętość kultury wodnej (5000 ml/200 roślin), którą użyto do doświadczeń z soją, sprzyjała zwiększonemu przenikaniu rozpuszczalnych w wodzie składników poprzez korzenie. Drugą przyczyną ubytku azotu może być częściowa przemiana w trakcie rozwoju roślin, oznaczalnych zastosowaną metodą form azotu, w formy nieoznaczalne.

Azot związków ekstrahujących się acetonem występował w nasionach spoczynkowych i skiełkowanych (etap I i III) jedynie w ilościach śladowych, w roślinach z etapu III było go już 15 mg/100 roślin, a w roślinach

Tabela 2 — Table 2

Strata N ogólnego w czasie rozwoju (w mg N/100 nasion lub roślin)
Loss of total-N during development (in mg N/100 seeds or plants)

Etap rozwoju Stage of development	N ogólny Total-N					
	Surowy materiał Crude material	Łuski Coats	Strata Loss	Materiał ekstr. acetonom After acetone extraction	Ekstr. aceton. Acetone extract	Strata Loss
I	724	—	0	722	+	0
II	694	—	30	692	+	30
III	677	12	35	662	15	45
IV	639	12	73	575	64	83

nach z etapu IV 64 mg/100 roślin, co stanowi 10% N całkowitego rośliny. Ten znaczny przyrost rozpuszczalnych w acetonie związków azotowych jest w głównej mierze wynikiem przemiany N aminowego aminokwasów w azot prekursorów chlorofilu.

2. Zmiany różnych form azotu rozpuszczalnego w wodzie

Jak widać z rysunku (ryc. 2) w trakcie rozwoju soi od etapu I do etapu IV zachodzi stały ubytek N ogólnego. Ubytek ten spowodowany jest omówioną uprzednio utratą N ogólnego rośliny oraz wzrostem zawartości związków azotowych nie ekstrahujących się wodą.

Ryc. 2. Zmiany różnych form azotu w pierwszych etapach rozwoju soi (w mg N/100 roślin)
Fracja rozpuszczalna w wodzie: 1 — N-ogólny; 2 — N-białkowy; 3 — N-niebiałkowy; 4 — N-amidowy; 5 — N-ogólny frakcji nie rozpuszczalnej w wodzie

Fig. 2. Changes in different nitrogen forms during early stages of soybean development
Water soluble fraction: 1 — Total-N; 2 — Protein-N; 3 — Non-protein-N; 4 — Amide-N; 5 — Total-N of water insoluble compounds

W czasie badanych etapów rozwoju zachodzą zasadnicze zmiany w ilości N białkowego i niebiałkowego. W etapie I ilość N niebiałkowego stanowi zaledwie 14% ilości N białkowego, natomiast w etapie IV jest go sześć razy więcej niż N białkowego. Zmiany te, nieznaczne między I i II etapem rozwoju zachodzą intensywnie między etapami II i III oraz III i IV. Szybkiemu zanikowi rozpuszczalnych w wodzie białek towarzyszy widoczny przyrost N ogólnego związków nierozpuszczalnych w wodzie, między innymi białek strukturalnych nowopowstających komórek.

Między I i IV etapem rozwoju obserwuje się również ponad dwukrotny przyrost rozpuszczalnego w wodzie N amidowego. Zwiększanie się ilości N amidowego, nieznaczne między I i II etapem rozwoju, najintensywniej zachodzi między II i III etapem, a następnie maleje między III i IV etapem rozwoju rośliny. Należy jednak zwrócić uwagę na stosunkowo dużą ilość białek (które również zawierają azot amidowy), w etapie III, a niewielką ich ilość w etapie IV. Wskazuje to, że między etapami III i IV zachodzą nadal intensywne przemiany w obrębie związków azotowych, charakteryzujące się dalszym wzrostem ilości asparaginy.

Jest rzeczą znaną, że rozpad białek zapasowych w czasie kiełkowania zachodzi przy równoczesnym nagromadzaniu się nieskoczasteczkowego N amidowego (Dunn, Cannien, Shankman, Block 1948; Panalaks, Smith, Walker 1963; Yemm 1949). W gromadzących się niebiałkowych związkach azotowych w czasie pierwszych stadiów rozwoju soi na świetle N amidowy zawarty jest prawie wyłącznie w asparaginie. Otrzymane wyniki jak również wcześniejsze wyniki Panalaksa, Smitha i Walkera (1963) wskazują, że do etapu rozwoju liścieni udział procesów fotosyntezy w ogólnym metabolizmie związków azotowych jest jeszcze nieznaczny.

3. Zmiany w obrębie rozpuszczalnych w wodzie białek

Rozpuszczalne w wodzie zapasowe białka nasion soi ulegają w czasie rozwoju rośliny nie tylko omówionym uprzednio przemianom ilościowym, charakteryzującym się ich szybkim ubytkiem, ale również i przemianom jakościowym, które dały się wykazać za pomocą sączenia molekularnego na kolumnie Sephadex G-200. Analizie poddano rozpuszczalne w wodzie białka nasion spoczynkowych oraz liścieni roślin z III i IV etapu rozwoju. Uzyskane wyniki przedstawiono na rysunkach (ryc. 3a, 3b, i 3c).

Rozpuszczalne w wodzie białka nasion (ryc. 3a) rozdzieliły się na cztery frakcje, przy czym najwięcej ich było we frakcji pierwszej i drugiej, licząc według kolejności wypływu. Świadczy to, że zapasowe białka nasion soi są związkami o dużej masie cząsteczkowej.

Ryc. 3a, 3b, 3c. Ilościowe zmiany białek rozpuszczalnych

a — nasiona spoczynkowe, *b* — liście roślin ze stadium III, *c* — liście roślin ze stadium IV.

Fig. 3a, 3b, 3c. Quantitative changes in soluble proteins

a — Dormant seeds, *b* — Cotyledons of the stage III of development, *c* — Cotyledons of the stage IV of development

Ilość aminokwasów siarkowych we frakcji drugiej wynosi 2,85% sumy wszystkich aminokwasów, zaś we frakcji pierwszej 2,1%. Jeżeli rozdział przeprowadzano buforem bez dodatku merkaptioetanolu ilość białek we frakcji drugiej wyraźnie się zmniejszała, a we frakcji pierwszej — zwiększała. Wskazuje to na obecność grup sulfhydrylowych w białkach drugiej frakcji i tworzeniu się przy braku środków redukujących mostków siarczkowych między łańcuchami poszczególnych cząsteczek białkowych.

Rozdział rozpuszczalnych w wodzie białek liścieni z etapu rozwoju III (ryc. 3b) wykazał znaczny spadek zawartości białek wysokocząsteczkowych. Najdalej idącym zmianom uległy białka zawarte w liściach roślin ze stadium rozwojowego IV (ryc. 3c). Zanikły występujące w nasionach białka o dużej masie cząsteczkowej, natomiast wzrosła ilość białek niskocząsteczkowych.

Odrębność nowopowstałych rozpuszczalnych białek pędów i korzeni w porównaniu z białkami zapasowymi nasion ujawnia się również w zawartości azotu amidowego. W białkach nasion ilość jego wynosi 9,6% N ogólnego w białkach liścieni wzrasta do 10,7%, natomiast w białkach pędów wynosi tylko 5,4%, a w białkach korzeni 4,8% N ogólnego danej tkanki. Uzyskane wyniki zbliżone są do podanych przez Y e m m a (1956) wartości dla mieszaniny białek cytoplazmatycznych i chloroplastowych roślin strączkowych. Duża procentowa zawartość N amidowego białek zapasowych liścieni wskazuje, że białka te tracą grupy amidowe dopiero w czasie hydrolizy.

4. Zmiany w obrębie rozpuszczalnych w wodzie niebiałkowych związków azotowych

W etapie rozwojowym I ilość azotu związków niebiałkowych wynosi 12%, a w etapie IV 82% azotu rozpuszczalnego w wodzie, co wskazuje na prawie całkowity zanik białek zapasowych między etapami I i IV.

Analiza niebiałkowych związków azotowych wykazała, że głównym ich składnikiem w etapie III i IV jest asparagina. Ilość N amidowego asparaginy w I etapie wynosiła tylko 1,1 mg/100 nasion, w etapie III — 65 mg, zaś w etapie IV — 106 mg/100 roślin (tabela 3).

Ogólna ilość azotu asparaginy w IV etapie wynosi zatem 212 mg i stanowi 70% azotu rozpuszczalnych w wodzie niebiałkowych związków azotowych. W przeciwieństwie do asparaginy ilość glutaminy zmienia się stosunkowo nieznacznie. Wskazuje to, że w metabolizmie soi glutamina odgrywa mniejszą rolę niż asparagina.

Ilość azotu soli amonowych w badanych etapach rozwoju soi jest nieznaczna.

Dalsze zróżnicowanie form N niebiałkowego przeprowadzono za pomocą rozdzielania związków azotowych frakcji niskocząsteczkowej na

Tabela 3 — Table 3

Azot różnych form związków niskocząsteczkowych (w mg N/100 roślin)
 Nitrogen of different forms of low molecular weight compounds (in mg N/100 plants)

Forma azotu Nitrogen form	Etap I Stage I	Etap III Stage III	Etap IV Stage IV
niebiałkowy non protein	63	220	310
amonowy ammonium	0,8	2,8	3,2
amidowy Asp amide Asp	1,1	65,0	106,0
amidowy Glu amide Glu	2,2	10,8	7,0
inne formy others	58,9	151,4	193,8

Tabela 4 — Table 4

Zawartość N ogólnego i N_{NH_2} we frakcji amfolitowej i nieamfolitowej (w mg N/100 nasion lub roślin)

Total- N_{NH_2} in ampholytic and non-ampholytic fraction (in mg N/100 seeds or plants)

Frakcja Fraction	Forma azotu Nitrogen form	Etap I Stage I	Etap IV Stage IV
Amfolitowa Ampholytic	N-ogólny — Total N	58,5	274,3
	N_{NH_2} • wolny — Free N_{NH_2}	20,5	124,0
	N_{NH_2} związ. — Bound N_{NH_2}	16,2	9,0
Nieamfolitowa Non-ampholytic	N-ogólny — Total-N	6,5	29,7
	N_{NH_2} związ. — Bound N_{NH_2}	3,8	12,3

kolumnie kationitowej na frakcję amfolitową i nieamfolitową. Badania przeprowadzano na nasionach (etap I) i roślinach z etapu rozwoju IV. Uzyskane wyniki przedstawiono w tabeli 4.

Zwraca uwagę, że mimo znacznego wzrostu N ogólnego związków niskocząsteczkowych w czasie badanych etapów rozwoju soi stosunek N ogólnego frakcji amfolitowej i nieamfolitowej ulega tylko nieznacznej zmianie. Znaczny wzrost N aminowego wolnego w etapie IV należy przypisać wzrostowi ilości asparaginy.

Miedzy etapami I i IV obserwuje się prawie dwukrotny spadek N aminowego związanego frakcji amfolitowej, natomiast trzykrotny wzrost N aminowego związanego frakcji nieamfolitowej. Na tej podstawie moż-

na by wysnuć przypuszczenie, że aminokwasy lub peptydy z zablokowaną grupą aminową odgrywają jakąś rolę w metabolizmie azotowym soi. Nie jest wykluczone, że są między nimi tRNA-aminokwasy lub tRNA-peptydy.

5. Rozmieszczanie się poszczególnych form azotu w różnych częściach rośliny.

W celu zbadania przemieszczania się poszczególnych form związków azotowych przed przygotowaniem do analiz podzielono rozwijające się rośliny (etap III i IV) na trzy części: liścienie, część pod- i nadliścieniową

Ryc. 4 Rozmieszczenie poszczególnych form azotu w różnych częściach rośliny (w mg N/100 roślin)

1 — N-białkowy rozpuszczalny w wodzie, 2 — N-niebiałkowy rozpuszczalny w wodzie, 3 — N nierozpuszczalny w wodzie i acetonie, 4 — N-amidowy rozpuszczalny w wodzie

Fig. 4 Distribution of nitrogen forms in various parts of the plant (in mg N/100 plants)

1 — Water-soluble protein-N, 2 — Water-soluble nonprotein-N, 3 — Acetone and water insoluble-N, 4 — Water-soluble amido-N

(dalej nazywaną pędami) oraz korzenie. Wyniki przedstawiające udział wagowy poszczególnych części oraz zawartość w nich różnych form azotu zestawiono w tabeli 5 oraz na ryc. 4.

W korzeniach nie daje się zaobserwować istotnych różnic w badanych frakcjach azotowych, natomiast w liścieniach następuje znaczne obniżenie się zawartości N ogólnego (od 429 mg N/100 roślin w etapie III, do 172 mg N/100 roślin w etapie IV). Analogicznie do obniżania się zawartości N ogólnego maleje zawartość azotu związków rozpuszczalnych w wodzie.

Ubywający z liścieni azot jest przetransportowywany do pędów powodując znaczny przyrost N ogólnego, gromadzącego się głównie w postaci niskocząsteczkowych związków azotowych. Jak już zaznaczono przeważającym ilościowo składnikiem tej frakcji jest asparagina. Zawartość białek rozpuszczalnych w wodzie nie ulega w pędach zasadniczym zmianom.

Porównanie podawanej w literaturze zawartości kwasu asparagino-

Tabela 5 — Table 5

Masa i zawartość różnych form azotu w poszczególnych częściach 100 roślin
 Content of different nitrogen forms in and the weight of individual parts of the 100 plants

Etap rozwoju Stage of development	Nr próby i część rośliny Sample No and part of a plant		Świeża masa Fresh weight g	Po ekstrakcji acetonem After acetone extr.		Frakcja rozpuszczalna w wodzie Water-soluble fraction				
				masa weight g	N-ogólny total-N mg	masa weight g	N-ogólny total-N mg	N-białkowy pro- tein-N mg	N-niebiałkowy non pro- tein N mg	N-ami- dowy amide-N mg
III	1	a	33,3	6,9	440	4,2	293	183	101	52
		b	39,7	2,6	150	1,5	121	21	98	37
		c	19,4	1,2	52	1,0	27	6	19	9
	2	a	38,8	6,0	416	3,8	282	186	91	54
		b	52,5	3,4	195	1,9	140	20	115	41
		c	20,1	1,2	56	1,0	27	6	19	9
	3	a	33,3	7,2	432	4,3	301	194	90	50
		b	34,7	2,5	166	1,4	117	18	102	38
		c	19,9	1,1	53	1,1	23	5	15	7
	4	a	33,4	6,7	443	4,3	298	215	89	45
		b	50,0	2,9	195	1,7	141	20	122	41
		c	13,3	0,9	46	1,1	22	5	16	7
	5	a	34,2	6,8	408	4,3	281	185	91	52
		b	41,5	3,3	202	1,8	148	19	117	35
		c	18,4	0,9	49	1,1	23	5	15	7
	średnio mean	a	34,6	6,7	429	4,2	291	193	92	50
		b	43,7	2,9	182	1,9	133	20	111	39
		c	18,2	1,1	51	1,1	24	5	17	8
IV	1	a	43,1	3,9	193	1,8	121	32	81	38
		b	71,0	5,3	336	2,5	220	18	201	75
		c	36,0	1,4	49	0,5	22	4	17	6
	2	a	45,7	3,6	190	1,7	116	27	85	34
		b	68,1	5,4	352	2,4	224	18	199	79
		c	38,2	1,3	46	0,5	22	4	17	6
	3	a	44,2	3,7	158	1,3	111	28	80	30
		b	56,4	5,5	369	2,3	230	15	207	80
		c	35,8	1,2	47	0,5	25	4	21	7
	4	a	40,1	3,7	153	1,8	120	29	93	33
		b	75,5	5,8	356	2,5	234	16	211	87
		c	25,2	1,4	48	0,5	26	4	22	7
	5	a	41,0	3,3	169	1,4	126	31	82	37
		b	87,1	5,7	365	2,5	226	17	213	80
		c	27,1	1,4	45	0,5	25	4	21	7
	średnio mean	a	42,8	3,6	172	1,6	119	29	84	34
		b	71,6	5,5	356	2,4	227	17	206	80
		c	32,5	1,3	47	0,5	24	4	20	7

a — liście, cotyledons, b — pędy, shoots, c — korzenie, roots.

wego w białkach nasion spoczynkowych soi z jego ilością w asparaginie występującej w pędach wskazuje, iż przynajmniej połowa tego związku została zsyntetyzowana z metabolitów cyklu kwasów trójkarboksylowych.

Z ryc. 4 widać, że z liścieni oprócz azotu białek rozpuszczalnych ubywa również azot białek nierozpuszczalnych w wodzie, w pędach natomiast przy praktycznie stałej i niewielkiej ilości rozpuszczalnego N białkowego przyrasta wyraźnie N białek strukturalnych nierozpuszczalnych w wodzie. Ubytek białek nierozpuszczalnych w wodzie z liścieni wskazuje, że i ta forma białek nasion może być wykorzystana jako białko zapasowe.

Katedra Biochemii
Uniwersytetu Warszawskiego

(Wpłynęło: 17.7.1967 r.)

STRESZCZENIE

Przeprowadzono analizę związków azotowych w pierwszych stadiach rozwoju soi. Do doświadczeń użyto nasion soi odmiany Warszawska (*Glicine hispida* Max. var. Warszawska) ze zbioru w 1964 r. w Stacji Hodowlano-Badawczej IHAR Radzików. Badano: nasiona w stadium spoczynkowym (etap I), nasiona skiełkowane o długości kiełków 1,5–2,0 cm (etap II), rośliny w stadium rozwojowym liścieni (etap III) oraz rośliny w stadium rozwojowym pierwszej pary liści (etap IV). Kiełkowanie i dalszą hodowlę przeprowadzano w kulturze wodnej na świetle. Oznaczano: N ogólny, N związków rozpuszczalnych w acetonie, N rozpuszczalnych w wodzie białek, N rozpuszczalnych w wodzie związków niskocząsteczkowych, N α -NH₂ frakcji niskocząsteczkowej, N amidowy ogólny, N asparaginy, N glutaminy i N amonowy. Analizę frakcji azotowych związków rozpuszczalnych w wodzie przeprowadzano w całej roślinie oraz w poszczególnych jej częściach.

Stwierdzono, że w badanym okresie roślina traci 10% N ogólnego nasion spoczynkowych. Równocześnie zachodzi synteza i nagromadzanie się znacznych ilości (do 10% N ogólnego rośliny w IV etapie rozwoju) rozpuszczalnych w acetonie związków azotowych. W czasie rozwoju soi następuje ubytek frakcji wysokocząsteczkowej rozpuszczalnych w wodzie białek przy jednoczesnym wzroście procentowego udziału białek niskocząsteczkowych, przy czym rozpuszczalne w wodzie białka zapasowe tracą grupy amidowe dopiero w czasie swej hydrolizy. Jako materiał zapasowy wykorzystywane są nie tylko białka rozpuszczalne, ale i część białek nierozpuszczalnych nasion soi.

Porównanie ilości kwasu asparaginowego zawartego w białkach zapasowych nasion soi z ilością asparaginy zawartej w roślinie z etapu rozwoju pierwszej pary liści wskazuje, iż co najmniej połowa tego aminokwasu została nowo zsyntetyzowana. Azot asparaginy (amidowy i aminowy) w etapie rozwoju pierwszej pary liści wynosi 60% azotu związków rozpuszczalnych w wodzie. Udział glutaminy jest nieznaczny. Ilość wolnych aminokwasów ulega nieznacznemu spadkowi w czasie pierwszych stadiów rozwoju soi. Ilość aminokwasów związanych frakcji niskocząsteczkowej w badanym okresie rozwoju utrzymuje się na tym samym poziomie, jednak zmienia się ich charakter: prawie dwukrotnie maleje ilość związanych aminokwasów z wolną grupą aminową, przyrasta zaś odpowiednio ilość związanych aminokwasów z zablokowaną grupą aminową. Świadczy to o tym, że peptydy lub aminokwasy z zablokowaną grupą aminową odgrywają jakąś rolę w metabolizmie azotowym soi.

SUMMARY

Nitrogenous compounds were examined in early stages of soybean development. Seeds of the Warszawska variety of soybean (*Glicine hispida* Max. var. Warszawska), 1964 crop, from the Horticulture and Research Station IHAR, Radzików, were used in these experiments. Following stages of the seed development were studied: dormant seeds (Stage I), seedlings with the germ 1.5—2.0 cm long (Stage II), plants in the "cotyledons" stage of development (Stage III), and plants in the "two primary leaves" stage of development (Stage IV). Germination and subsequent cultivation were done in a water culture in light. Determinations of total-N, acetone-soluble-N, water-soluble protein-N, N of the low molecular-weight water soluble compounds, α -amino-N of the low molecular-weight fraction, total amide-N, asparagine-N, glutamine-N, and ammonium-N were performed. Analysis of the fraction of water-soluble nitrogenous compounds was done in the whole plant as well as in its individual parts.

It was stated that, during the period under examination, the plant loses 10% of the dormant seed total-N. Simultaneously, the synthesis and accumulation of great quantities (up. to 10% of the total-N of the plant in the stage IV of the development) of acetone-soluble nitrogenous compounds is going on. During soybean development, a decrease takes place in a high molecular-weight fraction of water-soluble proteins accompanied by a rise in the proportion of low molecular-weight proteins. The water-soluble reserve proteins do not lose their amide groups then until they are hydrolyzed. Besides, not only water-soluble proteins, but also some insoluble proteins of soybean seed, serve as a reserve material.

A comparison of the aspartic acid content in the reserve soybean-seed-proteins with that in the plant in the "two primary leaves" stage of development shows that at least half the amount of this amino acid must have been synthesized anew. In the "two primary leaves" stage of development, the asparagine nitrogen (amide- and amino-N together) represents 60% of the water-soluble nitrogen. Proportion of glutamine is insignificant there. The quantity of free amino acids gets somewhat lower during the early stages of soybean development. The amount of bound amino acids of the low molecular-weight fraction keeps constant during the studied period, their nature, however, being changed: the quantity of bound amino acids with a free amino group is reduced almost to a half, while the quantity of bound amino acids with a blocked amino group is accordingly increased. This would suggest that peptides and amino acids with a blocked amino group may play a certain role in the nitrogenous metabolism in soybean.

Department of Biochemistry,
Warsaw University, Warszawa

LITERATURA

- Belcher R., Goobert A. L., 1945, *Semimicro Quantitative Analysis*, London.
Brzeski W., Kaniuga Z., 1957, *Ćwiczenia z Biochemii Roślin*.
Chibnal A. C., 1952, *Metabolizm białek w roślinie*.
Danielsson C. E., 1951, *Acta Chem. Scand.* 5:541.
Dunn M. S., Cannien M., Shankman N. and Block H., 1948, *Arch. Biochem. Biophys.* 18:195.
Flodin P., 1962, Dextran gels and their application in gel filtration, Uppsala.
Frank H., 1954, *Planta* 44:319.
Ingle J., Beevers L., Hageman R. H., 1964, *Plant Physiol.* 39:735.

- Izawa G. and Okamoto S., 1962, Hyogo Noka Daigaku Kenkyu Hokoku, Noge-Kagaku Hen 5:101. [wg C. A. 60:2052 d (1964)].
- Kandler O., 1951, Z. Naturforsch. 6b:437.
- Kondo K., Mori S., Kajima M., 1954, Bull Research Inst. Food Sci. Nr 13, 19 [wg C. A. 48:13751 (1954)].
- Krober O. A., Gibbons S. J., 1962, J. Agr. Food Chem. 10:57.
- Mc Kee H. S., 1962, Nitrogen Metabolism in Plants, Clarendon Press, Oxford.
- Panalaks T., Smith M. D. and Walker E. I., 1963, Biochem. Biophys. Acta 78:101.
- Pucher G. W., Vickery H. P., Lavenvorth Ch. S., 1935, Ind. Eng. Chem. Anal. Ed. 7:152.
- Raacke J. D., 1957, Bioch. J. 66:103.
- Rodionowa N. A., 1957, Biull. Glawn. Botan. Sada 28:56.
- Rodionowa N. A., 1960, Trudy Glawn. Botan. Sada Akad. Nauk SSSR 7:32.
- Rovira A. D., 1956, Plant and Soil 7:178.
- Rovira A. D., 1959, Plant and Soil 11:53.
- Van Slyke D. D., Mac Fadyen D. A., Hamilton P. B., 1943, J. Biol. Chem. 150:251.
- Yemm E. W., 1949, New Phytologist 48:315.
- Yemm E. W., 1958, Encyclopedia of Plant Physiology, Springer-Verlag, 8:315.