Zmiany zawartości frakcji białkowych i składu aminokwasowego α i β -zeiny w okresie spoczynku ziaren kukurydzy o niepełnej dojrzałości

Variations in the protein fractions and amino acid composition of alpha and beta
zein at the rest period of maize grain at milk ripeness

P. MASŁOWSKI, K. SMOCZYŃSKA, H. MASŁOWSKA

WSTĘP

Podstawową częścią składową białek zapasowych kukurydzy jest zeina, należąca do grupy prolamin, czyli białek rozpuszczalnych w alkoholu lub w stężonym roztworze mocznika (Turner i wsp. 1965). Zeinę cechuje znikoma wartość biologiczna, na skutek braku w jej składzie lizyny, tryptofanu oraz zbyt małej ilości glicyny (Mosse 1961). Ponieważ zeina stanowi ok. 40—50% wszystkich białek bielma kukurydzy, tym samym obniża ich wartość biologiczną. Próby podniesienia tej wartości drogą selekcji, bądź drogą zabiegów agrotechnicznych, nie dały pozytywnych wyników. Wzrost bowiem ogólnego białka jest wynikiem przede wszystkim wzrostu zawartości zeiny (Sauberlich i wsp. 1953; Bressani i Conde 1961; Masłowski 1962).

Synteza zeiny w dojrzewających ziarnach kukurydzy rozpoczyna się stosunkowo późno, w okresie dojrzałości mleczej, lecz przebieg jej w tym okresie jest bardzo gwałtowny (Bressani i Conde 1961; Masłowski 1963). Natomiast podczas kielkowania ziarna jest zużytkowana najwcześniej (Pawłow 1962; Masłowski i wsp. 1967). Przypuszcza się, że niektóre aminokwasy zeiny, a w szczególności kwas glutaminowy i prolina, stanowiące ok. 50% azotu aminowego tego białka, są niezbędne do syntezy białka rozwijającego się zarodka (Yemm i Folkes 1958; Pawłow 1962).

W świetle tych założeń niezrozumiały wydaje się fakt, że niedojrzałe ziarna, zawierające znikomą ilość prolamin, cechuje większa energia kielkowania, przyspieszenie kwitnienia oraz zwiększenie plonów (Jeremiłow 1958; Grzesiuk i Rejowski 1960). Nasuwa się więc przypuszczenie poważniejszych zmian chemicznych zachodzących w okresie spoczynku ziarna o niepełnej dojrzałości.

Dotychczas prowadzone badania w tym kierunku dotyczyły głównie zmian morfologicznych i anatomicznych oraz wpływu czynników zewnętrznych jak światła, CO_2 , H_2O a ostatnio inhibitorów kielkowania (Varga i Ferenczy 1956; Buch

i Smith 1959; Wareing i wsp. 1964). Brak natomiast danych odnośnie przemian biochemicznych. Zagadnienie to wydaje się tym bardziej ciekawe, że w naszych warunkach klimatycznych używa się często do siewu ziarna kukurydzy niezupełnie dojrzałego.

Celem niniejszej pracy było przesledzenie zmian stosunków ilościowych frakcji białkowych oraz zmian składu aminokwasowego α i β zeiny, zachodzących w okresie spoczynku ziarna kukurydzy o pełnej i niepełnej dojrzałości.

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

1. Przygotowanie materiału do badań

Do doświadczeń użyto kukurydzy odmiany 'Wigor' ze Stacji Hodowlano-Badawczej IHAR w Smolicach, wysianej na poletkach doświadczalnych WSR w Olsztynie w 1965 roku.

Próby do analiz pobrano w dwóch stadiach dojrzałości ziarna: dojrzałości mlecznej (Wm) i pełnej (Wp). Ponieważ dojrzewanie ziarna w kolbie przebiegało nierównomiernie, ziarna do badań pobierano z jednej trzeciej dolnej części kolby, oprócz 2–3 rzędów najniższych.

Jedną część ziarna natychmiast po pobraniu liofilizowano, drugą część rozkładano cienką warstwą na siatce nylonowej i przechowywano w stałej temperaturze 20°C przez okres 12 miesięcy. Ziarna liofilizowane, jak też po 12 miesięcznym spoczynku, rozdrabniano, oznaczano suchą masę, a następnie odtłuszczano na kolumnie przepuszczając przez 25 g mąki 500 ml acetonu i 250 ml eteru z szybkością 100 ml/godz. Odtłuszczony materiał przechowywano w ciemnych zaparafinowanych słoikach w temp. 4°C.

2. Oznaczanie frakcji białkowych

Azot ogólny oznaczano metodą Kjeldahla wg Perrina (1953), frakcje białkowe wg metody Schneidera i wsp. (1952) w modyfikacji własnej. Schemat postępowania podano na ryc. 1.

3. Otrzymywanie α i β zeiny

α i β -zeinę preparowano wg Turnera i wsp. (1965). W tym celu odtłuszczony materiał zadawano trzykrotną objętością 95% etanolu i mieszano przez 5 godzin. Proces ekstrakcji i przemywania powtarzano trzykrotnie. Roztwór wirowano 20 min. przy 4000 obr./min. Połączone supernatanty zawierające α zeinę przenoszono do kolby o pojemności 2 litrów i zagęszczano na wyparce próżniowej w temp. 40°C do 1/2 objętości. Zagęszczony roztwór dializowano 24 godziny wobec 95% etanolu oraz 48 godzin wobec wody podwójnie destylowanej. Uzyskany osad rozpraszano w małej ilości 95% etanolu, przenoszono do rozdzielacza i przemywano

Ryc. 1 — Fig. 1

Schemat ekstrakcji i rozdzielu frakcji białkowych ziarna kukurydzy
 Scheme of extraction and fractionation of the protein fractions of maize grain

trzykrotnie eterem i dwukrotnie acetonem, następnie suszono do stałej wagi nad H₂SO₄ w eksykatorze próżniowym, pod zmniejszonym ciśnieniem w temperaturze pokojowej.

Z osadu po ekstrakcji alfa zeiny, ekstrahowano beta zeinę 60% etanolem identycznie jak poprzednio. Alfa zeina W_m zawierała 14,8% azotu, W_p — 14,9% azotu, natomiast beta zeina W_p — 14,5% N, zaś W_m — 13,2% N.

Otrzymane preparaty białkowe proszkowano i przechowywano w zaparafinowanych słoikach w temp. 4°C.

4. Hydroliza białek

Białka hydrolizowano w zatopionych probówkach 6 n HCl w temp. 105°C w ciągu 24 godzin, oraz na Amberlicie IR 120 H⁺ wg Pöhma (1961). W tym celu 20 mg białka ogrzewano w zatopionych probówkach z 1 g Amberlitu IR 120 H⁺ i 5 ml 80% etanolu w temp. 95°C przez 15 godz. Po oziębieniu aminokwasy eluowano 10% roztworem amoniaku. W naszym jednak przypadku metoda ta okazała się mało przydatna, ze względu na niepełną hydrolizę białka. Dlatego do rozdzielenia aminokwasów stosowano hydrolizat uzyskany metodą pierwszą.

5. Rozdział aminokwasów

Aminokwasy kwaśne i zasadowe rozdzielano metodą wysokonapięciowej elektroforezy bibulowej, na bibule Whatman 3, w buforze pirydynowym o pH 6,5 przy spadku potencjału 50 V/cm w ciągu 60 min. (Maślowski 1960). Aminokwasy obojętne natomiast rozwijano elektroforetycznie na bibule Whatman 1, w buforze octanowo-mrówczanowym o pH 2, przy zastosowaniu różnicy potencjałów 80 V/cm, w czasie 60 min., a następnie chromatograficznie prostopadłe do rozdziału elektroforetycznego w układzie: n-butanol+kwas octowy+woda (4:1:1), (Maślowski 1959).

Po wysuszeniu elektroforegramów, plamy aminokwasów wywoływano w roztworze o składzie: 100 mg octanu kadmu, 10 ml H₂O i 5 ml kwasu octowego lodowatego, 100 ml acetonu i 1 g ninhydryny (Bielecki i Turner 1966). Wywołane elektroforegramy suszono w suszarce w temp. 80°C 15 min a następnie 10 godzin w termostacie w temp. 40°C nad H₂SO₄ i NaOH.

6. Oznaczanie ilościowe aminokwasów

Plamki wywołanych aminokwasów wycinano z bibuły, cięto na drobne pasemka i ekstrahowano barwnik 2 ml roztworu o składzie: metanol+octan etylu+woda (1:1:1) zawierającym 1% kwasu octowego i 1% octanu kadmu. Gęstość optyczną mierzono po 20 min w 1 cm kuwetach przy $\lambda = 495 \text{ m}\mu$. Ilość poszczególnych aminokwasów odczytywano z krzywych standardowych.

Wyniki analiz z trzech serii doświadczeń i z 10 powtórzeń podano w tabeli 3 i 4.

WYNIKI

1. Energia kiełkowania

Wyniki badań zestawione w tabeli 1 wykazują, że ziarno kukurydzy zebrane w fazie dojrzałości młeczej i dojrzałości pełnej, wysiane bezpośrednio po sprzęcie kiełkuje nierównomiernie i posiada słabą energię.

Inaczej natomiast zachowuje się po 12-miesięcznym przechowywaniu, szczególnie ziarno o niepełnej dojrzałości (Wm). Wykazuje ono wyższą energię kiełkowania aniżeli ziarno w pełni dojrzałe (Wp).

2. Wzajemne stosunki frakcji białkowych

W tabeli 2 zestawiono dane liczbowe odnośnie ilości poszczególnych frakcji białkowych ziarna kukurydzy w fazie dojrzałości mleczej (Wm) i dojrzałości pełnej (Wp), bezpośrednio po zbiorze i po 12 miesięcznym przechowywaniu.

Wyniki badań podano w g azotu badanej frakcji na 100 g suchej masy oraz w g azotu frakcji na 100 g azotu ogólnego.

Tabela 1 — Table 1

Kiełkowanie ziarna kukurydzy o pełnej i niepełnej dojrzałości bezpośrednio po zbiorze i po 12 miesięcznym przechowywaniu

Germination of maize seeds at full ripeness and at milk ripeness immediately after harvest and after 12 months of storage

Dojrzałość ziarna Ripeness of grain	Kiełkowanie w % Germination per cent									
	bepośrednio po zbiorze immediately after harvest					po 12-miesięcznym przechowywaniu after 12 months of storage				
	w dniu on the day					w dniu on the day				
	5	10	16	20	ogółem sum	5	10	16	20	ogółem sum
Mleczna (W _m) Milk	—	2	4	10	16	19	79	2	—	100
Pełna (W _p) Full	1	15	20	26	62	10	70	15	1	96

Jak z powyższej tabeli wynika, ziarno o dojrzałości mleczej w przeciwieństwie do ziarna o dojrzałości pełnej, bezpośrednio po zbiorze wykazuje niską zawartość zeiny, której stężenie w czasie przechowywania wzrasta prawie czterokrotnie kosztem pozostałych frakcji azotowych. Najintensywniejszemu przy tym rozpadowi ulegają gluteliny (ok. 70% stanu początkowego), następnie globuliny (60%), azot niebiałkowy (51%), wreszcie albuminy (48%). W efekcie końcowym wzajemne stosunki frakcji azotowych w ziarnie o niepełnej dojrzałości upodobią się do stosunków tych frakcji w ziarnie dojrzałym.

Ziarna młode wykazują tylko nieco niższą zawartość zeiny na korzyść azotu niebiałkowego.

Tabela 2 — Table 2

Zawartość różnych form azotu ziaren o pełnej i niepełnej dojrzałości bezpośrednio po zbiorze i po 12 miesięcznym przechowywaniu

Content of different nitrogen forms of maize grain in full and milk ripeness immediately after harvest and after 12 months of storage

Formy azotu Form of nitrogen	Dojrzałość mleczna milk ripeness				Dojrzałość pełna full ripeness			
	przed spoczynkiem before rest period		po 12-mies. przechowywaniu after 12 months of storage		przed spoczynkiem before rest period		po 12-mies. przechowywaniu after 12 months of storage	
	% s.m.	% N-ogól- nego	% s.m.	% N-ogól- nego	% s.m.	% N-ogól- nego	% s.m.	% N-ogól- nego
N-ogólny Total-N	2,20	—	2.14	—	1.95	—	1.85	—
N-albuminowy Albumin-N	0.28	12.7	0.13	6.0	0.13	6.7	0.10	5.4
N-globulinowy Globulin-N	0.37	17.0	0.22	10.3	0.17	8.7	0.17	9.2
N-glutelinowy Glutelin-N	0.85	38.6	0.63	29.5	0.58	29.8	0.54	29.2
N-zeinowy Zein-N	0.18	8.2	0.81	37.9	0.71	36.4	0.81	43.8
N-niebiałkowy Non protein-N	0.42	19.0	0.23	10.7	0.19	9.7	0.10	5.4
N-nierozpuszczalny Non soluble-N	0.1	4.5	0.12	5.6	0.17	8.7	0.13	7.0

3. Skład aminokwasowy α zeiny

W tabeli 3 przedstawiono ilościowy skład aminokwasowy α zeiny ziarna kukurydzy o pełnej (Wp) i niepełnej dojrzałości (Wm) po 12-miesięcznym przechowywaniu.

1° — jako ilość aminokwasów w gramach na 16 g N frakcji,

2° — jako liczbę reszt aminokwasowych przypadających na 1000 reszt, czyli w molach na 1000 ogólnie znalezionych moli. Wielkość ta została wprowadzona przez Moss'e (1961) dla łatwiejszego porównywania składu różnych białek, uzyskanych przez poszczególnych badaczy.

Jak z tabeli 3 wynika, α -zeina ziarna Wp różni się składem aminokwasowym od α -zeiny ziarna Wm. Jeżeli zestawimy reszty aminokwasów tej samej klasy, to

Tabela 3 — Table 3

Aminokwasy alfa zeiny ziarna kukurydzy o pełnej i niepełnej dojrzałości po 12 miesięcznym przechowywaniu

Amino acids of alpha zein of maize grain at full and milk ripeness after 12 months of storage

Aminokwasy Amino acids	Ilość aminokwasów w g/16 g N-białkowego Content of amino acids in g/16 g protein-N		Ilość reszt aminokwasów na 1000 reszt ogólnych Number of amino acids residues per 1000 of total residues	
	Dojrzałość pełna full ripeness	Dojrzałość mleczna milk ripeness	Dojrzałość pełna full ripeness	Dojrzałość mleczna milk ripeness
Alifatyczne Aliphatic				
Gli	1.28	0.89	21.2	15.4
Ala	10.51	9.11	147.5	130.4
Wal	3.66	2.24	39.2	24.7
Leu+Ileu	18.20	20.40	174.4	196.6
Razem Total	33.65	32.64	382.3	467.1
Aromatyczne Aromatic				
Fen	8.77	9.00	66.3	69.2
Pro	9.45	10.45	102.6	116.4
Try	—	—	—	—
Razem Total	18.22	19.45	168.9	185.6
Hydroksyaminokwasy Hydroxyaminoacids				
Ser	6.47	6.02	76.8	72.9
Tre	3.80	3.10	40.0	33.6
Tyr	6.69	6.24	46.2	44.3
Razem Total	16.96	15.36	163,—	150.8
Tioaminokwasy Thioaminoacids				
Cys	—	—	—	—
Met	1.40	0.7	11.6	6.4
Razem Total	1.40	0.7	11.6	6.4
Zasadowe Basic				
Lis	—	—	—	—
Arg	1.53	1.45	11.0	10.9
His	1.60	1.70	12.9	14.2
Razem Total	3.13	3.15	23.9	25.1
Kwaśne Acid				
Glu	23.87	24.17	202.8	208.8
Asp	5.00	5.80	47.2	56.2
Razem Total	28.87	29.97	250.0	265.0

Tabela 4 — Table 4

Aminokwasy beta zeiny ziarna kukurydzy o pełnej i niepełnej dojrzałości po 12 miesięcznym przechowywaniu

Amino acids of beta zein of maize grain harvested in the period of full and milk ripeness after 12 months of storage

Aminokwasy Amino acids	Ilość aminokwasów w g/16 g N-białkowego Content of amino acids in g/16 g protein-N		Ilość reszt aminokwasów na 1000 reszt ogólnych Number of amino acids residues per 1000 of total residues	
	Dojrzałość pełna full ripeness	Dojrzałość mleczna milk ripeness	Dojrzałość pełna full ripeness	Dojrzałość mleczna milk ripeness
Alifatyczne Aliphatic				
Gli	2.17	3.45	37.8	59.0
Ala	9.91	9.26	147.1	138.1
Wal	2.35	4.22	26.5	49.1
Leu + Ileu	19.30	15.50	194.7	155.5
Razem Total	33.73	32.43	406.1	401.7
Aromatyczne Aromatic				
Fen	3.90	4.38	31.4	35.2
Pro	9.50	9.50	83.1	83.4
Try	—	—	—	—
Razem Total	13.40	13.88	114.5	118.6
Hydroksyaminokwasy Hydroxyaminoacids				
Ser	6.20	5.27	77.8	66.5
Tre	2.80	4.28	31.1	49.0
Tyr	3.40	4.30	24.8	31.6
Razem Total	12.40	13.85	133.7	147.1
Tioaminokwasy Thioaminoacids				
Met	1.76	2.34	15.4	20.7
Cys	2.15	4.18	11.8	23.1
Razem Total	3.91	6.52	27.2	43.8
Zasadowe Basic				
Liz	—	—	—	—
Arg	1.20	2.10	9.0	15.8
His	1.10	1.80	9.8	15.1
Razem Total	2.30	3.90	18.8	30.9
Kwaśne Acid				
Glu	28.50	25.90	256.2	233.8
Asp	4.36	2.50	43.3	24.9
Razem Total	32.86	28.40	299.7	258.7

największe różnice stwierdza się w przypadku aminokwasów alifatycznych, tioaminokwasów i aminokwasów kwaśnych.

α -zeina Wp zawiera więcej glicyny, alaniny i waliny (270 reszt na 1000 reszt Wp w stosunku do 207 reszt/1000 reszt Wm) oraz metioniny (11,6 reszt/1000 reszt do 6,4 reszt/1000 reszt). Natomiast α -zeina Wm posiada więcej leucyny i izoleucyny (196 reszt na 1000 reszt do 174 reszt/1000 reszt), fenyloalaniny i proliny (185 reszt/1000 reszt do 169 reszt/1000 reszt) oraz aminokwasów kwaśnych (265 reszt/1000 reszt do 250 reszt/1000 reszt).

4. Skład aminokwasowy β -zeiny

Skład aminokwasowy β -zeiny ziarna kukurydzy Wp i Wm po 12 miesięcznym przechowywaniu podano w tabeli 4. Jak z niej wynika β -zeina ziarna Wp i Wm różni się głównie zawartością tioaminokwasów i aminokwasów zasadowych. Dotyczy to głównie β -zeiny Wm (ok. 44 reszty/1000 reszt w stosunku do 27 reszt/1000 reszt tioaminokwasów oraz 31 reszt/1000 reszt do 19 reszt/1000 reszt aminokwasów zasadowych).

W przeciwieństwie do alfa -zeiny, beta-zeina ziarna Wp posiada więcej aminokwasów kwaśnych (ok. 300 reszt/1000 reszt do 260 reszt/1000 reszt).

5. Porównanie składu aminokwasowego α i β -zeiny

Porównując skład aminokwasowy α i β -zeiny ziarna o dojrzałości pełnej (Wp) jak i niepełnej (Wm) stwierdza się, że te dwie podfrakcje zeiny różnią się między sobą nie tylko składem ilościowym, lecz i jakościowym.

α -zeinę cechuje wyższa zawartość aminokwasów aromatycznych natomiast β -zeinę — tioaminokwasów, przy czym w tej pierwszej nie stwierdzono w ogóle obecności cystyny (cysteiny).

OMÓWIENIE WYNIKÓW I DYSKUSJA

Analizując powyższe wyniki daje się zauważyć dużą różnicę w sile i energii kiełkowania ziarna Wp i Wm po 12-miesięcznym przechowywaniu.

Ziarno o dojrzałości młeczej (Wm) kiełkuje bardziej równomiernie i wykazuje większą energię kiełkowania (100% po 16 dniach kiełkowania) niż ziarno o dojrzałości pełnej (Wp) (96% po 20 dniach kiełkowania). Było to już stwierdzone wcześniej przez innych badaczy, a Tascher i Dungan (1948) tłumaczą to zjawisko większą przepuszczalnością wody przez okrywę nasienną ziarna o niepełnej dojrzałości oraz bardziej dostępnymi dla zarodka pokarmami w ziarnie młodym. Nie wyjaśnia to jednak faktu, że rośliny wyrosłe z tego ziarna wykazują zwiększenie plonów, wcześniejsze kwitnienie, a tym samym skrócenie okresu wegetacyjnego (Jermilow 1958; Grzesiuk i Rejowski 1960). Można by przypuszczać, że w niedojrzałym ziarnie, już w okresie spoczynku, winny zachodzić głębsze zmiany bioche-

miczne. Dowodem tego są wyniki badań zmian stosunków frakcji azotowych w ziarnie w czasie przechowywania, wykazujące silny wzrost zeiny na niekorzyść innych frakcji azotowych a w szczególności glutelin i globulin (tabela 2). Jeszcze bardziej interesujących wyników dostarczyły analizy składu aminokwasowego α i β -zeiny ziarna kukurydzy o pełnej (Wp) i niepełnej (Wm) dojrzałości po 12 miesięcznym przechowywaniu (tabela 3 i 4).

Dane te sugerują, że struktura I-rzędowa zeiny ziarna o pełnej dojrzałości (Wp), różni się przynajmniej ilością aminokwasów w łańcuchu polipeptydowym, od struktury I-rzędowej zeiny ziarna młodego (Wm).

Przy badaniach naszych braliśmy pod uwagę możliwość powstania artefaktów, wynikłych chociażby z zanieczyszczenia α i β -zeiny innymi frakcjami białkowymi na skutek niedokładności metody ich ekstrakcji i oczyszczania. W dostępnej nam jednak literaturze nie znaleźliśmy dokładniejszej metody frakcjonowania zeiny. Dotychczas nie udało się uzyskać rozdziálu preparatywnego tych białek na wymiennicach jonowych, ani też przy zastosowaniu elektroforezy. Niemniej jednak badania składu aminokwasowego zeiny różnych odmian kukurydzy przy zastosowaniu powyższej metody nie wykazały większych odchyśleń i zgodne były z wynikami innych badaczy, przy zastosowaniu różnych technik analitycznych.

Zagadnienie to jednak interesujące zarówno z punktu widzenia teoretycznego, jak i praktycznego, pozostaje nadal otwarte i wymaga jeszcze dalszych badań.

STRESZCZENIE

W ziarnach kukurydzy w fazie dojrzałości młeczej i pełnej bezpośrednio po zbiorze i po 12-miesięcznym przechowywaniu badano energię kiełkowania, zawartość różnych frakcji azotowych: N-ogólny, N-albuminowy, N-globulinowy, N-glutelinowy, N-zeinowy i N-niebiałkowy oraz skład aminokwasowy α i β -zeiny. Stwierdzono, że:

1. Ziarno o niepełnej dojrzałości po 12 miesięcznym spoczynku wykazuje wyższą energię kiełkowania niż ziarno dojrzałe.
2. W ziarnie młodym zachodzi intensywny wzrost zawartości zeiny kosztem innych frakcji.
3. α i β -zeina ziaren o niepełnej dojrzałości i dojrzałości pełnej różnią się zawartością aminokwasów.

*Katedra Biochemii Żywności
W.S.R. w Olsztynie*

(Wpłynęło dn. 24.1.1968)

SUMMARY

Germination viability, total-N, albumin-N, globulin-N, glutelin-N, zein -N, non-protein-N and amino acid composition of alpha and beta zein were determined in maize at milk- and full ripeness immediately after harvest and after 12 months of storage.

It has been found, that:

1. Maize grain in milk ripeness after 12 months of storage showed a higher germinating power than mature grains.
2. In the young grain occurs an intensive transformation of N-fractions and the zein amount increases.
3. Alpha and beta zein of the grain at the stage of milk and full ripeness differ in their amino acid content.

LITERATURA

- Bielecki R. L., Turner N. A., 1966, *Analit. Biochem.* 17: 278.
- Bressani R., Conde R., 1961, *Cereal Chem.* 38: 76.
- Buch M. L., Smith O., 1959, *Physiol. Plant.* 12: 706.
- Grzesiuk St., Rejowski A., 1960, *Roczn. Nauk Roln.* 81 A: 137.
- Jermiłow J. B., 1958, *DAN SSSR*, 118: 598.
- Masłowski P., 1959, *Chem. Analit.*, 4: 611.
- Masłowski P., 1960, *Roczn. Nauk. Roln.* 81-A-3: 561.
- Masłowski P., 1962, *Genet. Polon.* 3: 275.
- Masłowski P., 1963, *Hod. Aklimat. Nas.* 7: 17.
- Masłowski P., Masłowska H., Wierzbicka M., 1967, *Acta Soc. Bot. Polon.* 36: 459.
- Mosse' J., 1961, *Ann. Physiol. Vegetale* 3: 105.
- Pawłow A. N., 1962, *DAN SSSR*, 143:235.
- Perrin C. H., 1953, *Anal. Chem.* 25: 968.
- Pöhm H., 1961, *Naturwiss.* 48: 551.
- Sauberlich M. E., Chang W., Salmin W. D., 1953, *J. Nutrition* 51:241.
- Schneider E. O., Earley E. B., De Turk E. E., 1952, *Agron. J.*, 44: 161.
- Tascher W. R., Dungan G. H., 1948, *J. Amer. Soc. Agron.* 20: 133.
- Turner J. E., Boundy J. A. Dimler R. J., 1965, *Cereal Chem.* 42: 452.
- Varga H., Ferenczy L., 1956, *Nature* 178: 1075.
- Wareing P. F., Eagles C. F., Robinson P. M., 1964, *Colloques Internat. du Centre Nat. Rech. Scient.*, 377: 7.
- Yemm, E. W., Folkes B. F., 1958, *Annual Review of Plant Physiol.* 9: 245.