

OCENA ŻYWOTNOŚCI ZIAREN ZBOŻ O RÓŻNEJ DOJRZAŁOŚCI ZA POMOCĄ
TESTÓW FIZJOLOGICZNO-BIOCHEMICZNYCH

Janusz Tłuczkiewicz

Instytut Biologii Roślin, Akademia Rolniczo-Techniczna Olsztyn

WSTĘP

W ocenie jakości biologicznej nasion coraz częściej używa się pojęcia - „żywotność”. Żywotnością określa się najczęściej, potencjalną zdolność nasion do kiełkowania i wydania normalnych i zdrowych oraz dynamicznie rosnących siewek w warunkach polowych, tj. przy zmieniającym się zakresie czynników siedliskowych [10, 16, 21]. Wprowadzany termin żywotność zastępuje więc w ocenie jakości nasion takie tradycyjne określenia, jak: zdolność kiełkowania, potencjalną zdolność kiełkowania lub potencjał wzrostowy siewek. Żywotność nasion jest też pojęciem o znacznie szerszym zakresie niż wymienione wyżej. Ponadto żywotność w znacznym stopniu uwzględnia aspekt praktyczny w ocenie nasion.

Podczas dojrzewania zachodzą duże zmiany w budowie morfologicznej, składzie chemicznym i właściwościach fizjologiczno-biochemicznych nasion [10, 11]. W okresie ontogenezy ulega także znacznym zmianom żywotność nasion [9, 25, 26]. Młode nasiona (we wczesnej dojrzałości) cechuje na ogół obniżona zdolność kiełkowania, a także wolny wzrost i rozwój powstałych z nich roślin [10]. W miarę dojrzewania nasiona uzyskują wyższe wskaźniki żywotności i wydają rośliny o lepszym rozwoju oraz wyżej plonujące [2, 10, 11, 22]. Według niektórych autorów [9, 25, 26] ziarniaki zbóż uzyskują najwyższą wartość biologiczną w połowie dojrzałości woskowej. Ziarna zebrane w końcu dojrzałości woskowej i w dojrzałości pełnej wykształcają rośliny niższe [9, 25], mniej odporne na niesprzyjające czynniki siedliskowe [26] oraz mniej plenne. Dane te sugerują, że zbierane ziarna w końcowym etapie ontogenezy mogą stanowić gorszy materiał siewny.

Aktualnie w ocenie żywotności nasion, obok tradycyjnych metod standardowego kiełkowania [7, 10, 16] i testu tetrazolinowego [20, 21, 23], stosuje się także inne wskaźniki fizjologiczno-biochemiczne [1, 5, 16, 20, 30]. Często charakteryzowanym tego typu testem jest proces oddychania i towarzyszące mu przemiany bioenergetyczne [6, 12, 17-19, 28]. W licznych badaniach [1, 13, 14, 17, 18, 27, 31] wykazano wysokie korelacje między intensywnością oddychania, mierzoną ilością pobranego tlenu, u pęczniejących i kiełkujących nasion różnych gatunków a sprawnością ich kiełkowania i dalszego wzrostu siewek. Wysokie zależności osiągnano również między żywotnością nasion a natężeniem metabolizmu oddechowego utożsamianego z aktywnością ogólną dehydrogenaz [13, 21, 23] oraz z aktywnością wybranych dehydrogenaz cyklu Krebsa lub łańcucha oddechowego [5, 20, 27, 30]. Wysokiej żywotności nasion towarzyszy zazwyczaj zdolność do szybkiego powstawania mitochondriów w rosnących siewkach [5, 18, 19]. Mitochondria żywotnych nasion wyróżniają się także zwiększoną aktywnością oksydacyjną i bioenergetyczną [12, 18, 19, 28]. W pęczniejących lub kiełkujących nasionach wydających szybko rosnące siewki stwierdzono również odpowiednio wysoki poziom ATP [5, 6, 17, 20].

Dotychczasowe badania nad kształtowaniem się żywotności ziaren zbóż w końcowych etapach dojrzewania są mało rozpracowane. Wydaje się, że wysoka zależność wzrostu i rozwoju siewek od procesu oddychania może częściowo wyjaśnić przyczyny zmiennej żywotności nasion w procesie ich ontogenezy.

Celem podjętych badań było określenie tradycyjnymi metodami żywotności u zbieranych w dojrzałości woskowej i pełnej ziaren pszenicy i żyta oraz porównanie tych wskaźników z intensywnością oddychania i aktywnością oddechową mitochondriów u siewek.

MATERIAŁ I METODYKA BADAŃ

Obiektem badań były ziarna dwóch gatunków zbóż ozimych: pszenicy - Grana i żyta - Dańkowskie Żłote. Ziarna zbierano w następujących etapach ontogenezy:

- 1) w dojrzałości woskowej
 - a) pszenica - 32 dni po zapyleniu,
 - b) żyto - 30 dni po zapyleniu,
- 2) w dojrzałości pełnej

a) pszenica - 48 dni po zapyleniu,

b) żyto - 46 dni po zapyleniu.

Zbiór ziaren z dojrzałości woskowej przeprowadzono ręcznie, a z pełnej maszynowo. Uzyskane ziarna z obu etapów dojrzałości dosuszano w temp. pokojowej i poddawano frakcjonowaniu na sitach Foggla o wielkości szczelin 2,8-1,4 mm. Do analiz wybrano frakcje ziaren o najwyższym procentowym udziale w zebranych partiach (tab. 1).

T a b e l a 1

Charakterystyka wielkości / masy powietrznie suchych ziaren pszenicy zbieranych w dojrzałości woskowej i pełnej (dane są średnimi z 3 populacji ziaren)

Numer frakcji i średnica ziaren w mm	Z dojrzałości woskowej		Z dojrzałości pełnej	
	masa 100 ziaren w g	% frakcji w partii ziaren	masa 100 ziaren w g	% frakcji w partii ziaren
I > 2,8	4,4	55,1	4,8	60,6
II 2,8-2,5	3,6	39,0	3,9	33,5
III 2,5-2,2	2,6	3,0	2,7	2,9
IV 2,2-2,0	2,4	1,8	2,5	2,1
V 2,0-1,8	1,5	1,1	1,9	0,9

Warunki przygotowania materiału do badań

Analizy laboratoryjne prowadzono na pęczniejących i kiełkujących całych ziarnach lub na izolowanych zarodkach bądź siewkach od bielm. Rozdzielenie wymienionych części ziaren dokonano ręcznie za pomocą igły preparacyjnej. Wyjściową zawartość suchej masy zarodków i bielm oraz białka mitochondrialnego w zarodkach oznaczano po pęcznieniu ziaren w wodzie przez 12 godz. w temp. 1-2°C. Kiełkowanie ziaren wykonano na bibule filtracyjnej nasyconej wodą w płytkach Petriego w termostacie przy temp. 20-21°C.

Oznaczenia kiełkowania ziaren i wzrostu siewek

W standardowym kiełkowaniu ziaren określano energię (po 3 dobach) i zdolność kiełkowania (po 7 dobach), a także średni czas

potrzebny do skiełkowania 1 ziarna [7, 10]. Wzrost siewek mierzone na podstawie długości łodyżek i korzonków po 3, 5, 7, 9 i 12 dniach kiełkowania ziaren. Ponadto wzrost siewek ustalano za pomocą przyrostu suchej masy po 1, 2, 3 i 4 dniach kiełkowania ziaren.

Oznaczenia żywotności ziaren za pomocą testu tetrazolinowego i aktywności ogólnej dehydrogenaz

Oznaczenia żywotności testem tetrazolinowym wykonano wg. polskiej normy PN-69/R-65950 przyjętej dla ziaren zbóż [3]. Próbki ziaren (100 szt.) poddawano pęcznieniu przez 18 godz. w temp. 20-21°C. Następnie przenoszono do naczynek na lodzie i oddzielano zarodki (bez tarczek) od pozostałej części ziaren. Zarodki zalewano 1% roztworem chlorku 2,3,5-trójfenylotetrazolinowego w 0,1 M buforze K-fosforanowym o końcowym pH 7,0 i pozostawiano przez 24 godz. w termostacie o temp. jak wyżej. Topograficzną ocenę żywotności zarodków dokonano przez porównanie ich wybarwienia z tabelami używanymi w stacjach IHAR.

Oznaczenia aktywności ogólnej dehydrogenaz przeprowadzono testem tetrazolinowym z zachowaniem analogicznych warunków jak w metodzie topograficznej. Wytworzony fenyloformazan ekstrahowano z zarodków absolutnym acetonem [21, 23]. Ekstrakty fenyloformazanu mierzone wobec acetonu w spektrofotometrze przy $\lambda = 520$ nm [23]. Zawartość fenyloformazanu odczytywano z krzywej wzorcowej.

Oznaczenia intensywności oddychania

Natężenie oddychania mierzono w kiełkujących całych ziarnach lub ich siewkach. Oznaczenia oddychania przeprowadzono metodą manometryczną w aparacie Warburga przy stałej temperaturze 25°C. Pomiar oddychania dla każdego wariantu doświadczalnego prowadzono jednocześnie w 6 naczynkach powtarzając je czterokrotnie.

Izolowanie mitochondriów z siewek

Mitochondria izolowano z siewek pszenicy i żyta metodą różnicowego wirowania opracowaną przez Pomeroya [24]. Świeżo wydzielone 2-dniowe siewki homogenizowano w moździerzu z mieszaniną o składzie: 0,5 M sacharoza, 1 mM etylenodwuaminocteroocjan, 67 mM bufor K-fosforanowy i 0,1% roztwór albuminy krwi wołowej (BSA) o końcowym pH 7,2, w stosunku 8:1 części wagowych mieszaniny i siewek.

Zhomogenizowaną tkankę sączo przez nylon (około 100 mesh) i wirowano przy 2000 xg w ciągu 5 min. Mitochondria osadzano przy 20 000 xg przez 5 min. Osad mitochondriów zawieszano w 20 ml mieszaniny do izolacji i ponownie wirowano przy 2 500 xg przez 5 min. Mitochondria znów osadzano przy 8 000 xg przez 10 min. Uzyskaną frakcję mitochondriów zawieszano w 1,0 ml mieszaniny o składzie: 0,3 M mannitol, 10 mM bufor tris-HCl i 0,1% BSA o końcowym pH 7,2. Zawiesinę mitochondriów przechowywano w łaźni lodowej. Wszystkie operacje przy izolacji mitochondriów przebiegały w temp. 0-2°C.

Oznaczenia zawartości białka mitochondrialnego w zarodkach i siewkach

Mitochondria izolowano ze 100 zarodków lub siewek w sposób przedstawiony uprzednio. W skład mieszaniny izolacyjnej nie wchodził jednak 0,1% BSA. Mitochondria i zawarte w nich białko rozpuszczano w 1N NaOH przez 2 godz., a nierozpuszczone resztki odwirowywano przy 30 000 xg przez 10 min. Zawartość białka mitochondriów oznaczano metodą Lowry [15], używając jako standardu albuminy krwi wołowej. Oznaczenia zawartości białka mitochondrialnego wykonano w 4 oddzielnych izolacjach dla każdego etapu kiełkowania.

Oznaczenia aktywności oddechowej mitochondriów

Aktywność oddechową izolowanych mitochondriów mierzono metodą polarograficzną przy użyciu elektrody tlenowej typu Clarka. Pomiar aktywności oddechowej prowadzono w mieszaninie reakcyjnej o składzie: 0,3 M mannitol, 10 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 10 mM KH₂PO₄, 10 mM bufor tris-HCl i 0,1% BSA o końcowym pH 7,2 [24] i w temperaturze 25°C. Wyjściowe stężenie tlenu w medium reakcyjnym wynosiło 240 mM [8, 24]. Stosowano jako substraty α -ketoglutaran, L-jabłczan i burżtynian w końcowym stężeniu 10 mM. Aktywność oddechową mierzono w stanie 3 (po dodaniu ADP) i w stanie 4 (po wyczerpaniu się ADP) wg. Chance i Williamsa [4]. Wielkość kontroli oddechowej określano stosunkiem szybkości pobierania tlenu w stanie 3 do szybkości pobierania tlenu w stanie 4 [4, 8]. Stosunek ADP:O wyznaczano na podstawie znanej ilości dodawanego ADP i ilości zużytego tlenu w stanie 3 [8]. Zawartość ADP określano spektrofotometrycznie stosując 15,4 mM współczynnik ekstynkcji przy 260 nm [24]. W zawiesinie mitochondriów w ilości użytej do reakcji i wolnej od BSA oznaczano białko metodą Lowry [15].

WYNIKI

Charakterystyka wielkości ziaren, sucha masa siewek i bielń podczas kiełkowania oraz wzrost siewek uzyskanych z ziaren o różnej dojrzałości

Powietrznie suche ziarna pszenicy zebrane w dojrzałości woskowej i pełnej rozdzielono na 5 frakcji (tab. 1). Natomiast w populacjach ziaren żyta z obu dojrzałości wydzielono 7 frakcji (tab. 2). U ziaren pszenicy zebranych w obu etapach dojrzałości przeważało ziarno dobrze wykształcone (frakcja I i II). Jednak ziarniaki pszenicy o najwyższej masie i średnicy stanowiły większy udział w partii ziaren zebranych w dojrzałości pełnej (61%), niż woskowej (51%) (tab. 1). Również masa ziaren pszenicy w równoległych frakcjach była wyższa z dojrzałości pełnej, jak woskowej.

T a b e l a 2

Charakterystyka wielkości i masy powietrznie suchych ziaren żyta zbieranych w dojrzałości woskowej i pełnej (dane są średnimi z 3 populacji ziaren)

Numer frakcji i średnica ziaren w mm	Z dojrzałości woskowej		Z dojrzałości pełnej	
	masa 100 ziaren w g	% frakcji w partii ziaren	masa 100 ziaren w g	% frakcji w partii ziaren
I > 2,8	3,7	0,1	5,0	6,0
II 2,8-1,5	3,2	13,6	3,9	65,6
III 2,5-2,2	2,8	45,0	3,1	16,0
IV 2,2-2,0	2,5	26,4	2,6	8,2
V 2,0-1,8	2,1	11,9	2,4	3,5
VI 1,8-1,6	1,8	2,4	2,1	0,2
VII 1,6-1,4	1,4	0,6	1,6	0,1

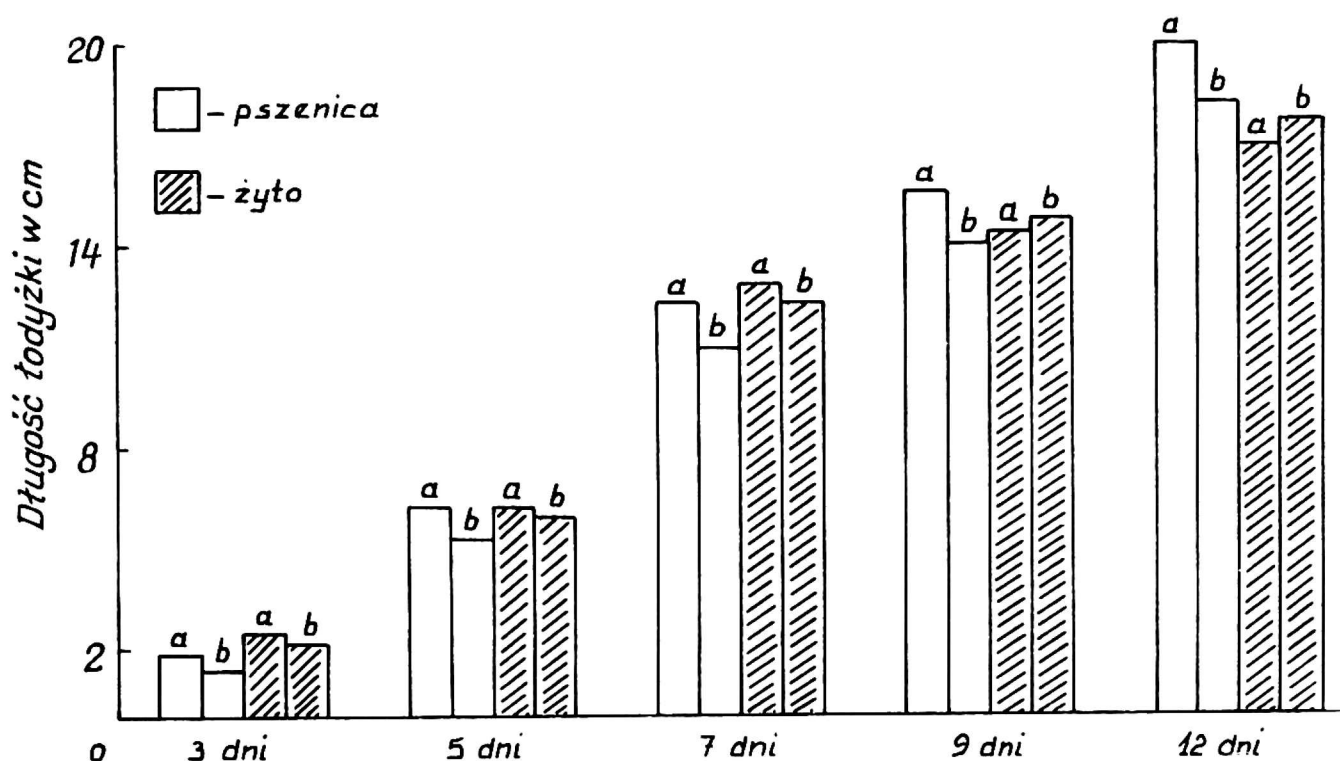
U ziarniaków żyta stosunkowy udział ziaren lepiej wykształconych był wyraźnie wyższy z dojrzałości pełnej, niż z woskowej (tab. 2). Z dojrzałości pełnej zasadniczą część ziaren (66%) stanowiła frakcja II, zaś z dojrzałości woskowej dopiero frakcja III i IV obejmowały 71% całości ziaren. Podobnie jak u ziaren pszenicy, masa ziaren żyta z dojrzałości pełnej była wyższa niż z dojrzałości woskowej w odpowiadających sobie frakcjach (tab. 2).

U wybranych populacji ziaren (patrz materiał do badań) pszenicy i żyta o różnej dojrzałości analizowano zmiany zawartości suchej masy w zarodkach i siewkach oraz bielmach przez kolejne cztery dni kiełkowania (tab. 3). Wyjściowa sucha masa zarodków i bielma (pęcznienie w temp. 1-2^oC przez 12 godz.) była wyraźnie wyższa u ziaren pszenicy i znacznie wyższa u ziaren żyta z dojrzałości pełnej, niż woskowej. W miarę wydłużenia kiełkowania sucha masa zwiększała się bardziej dynamicznie u siewek wyrosłych z ziaren o dojrzałości woskowej, niż pełnej (tab. 3). Obrazuje to procentowy przyrost suchej masy siewek w odniesieniu do ich wyjściowej masy. Szybszy wzrost suchej masy z ziaren z dojrzałości woskowej zaznaczył się wyraźnie u pszenicy, zaś w mniejszym stopniu u żyta. Siewki ziaren pszenicy z dojrzałości woskowej w porównaniu z siewkami ziaren z dojrzałości pełnej osiągały nawet wyższą masę już po 3 dobie kiełkowania (tab. 3). Natomiast siewki ziaren żyta z dojrzałości woskowej, mimo dynamiczniejszego wzrostu, nie przewyższały suchą masą siewek ziaren z dojrzałości pełnej do 4 dni wzrostu.

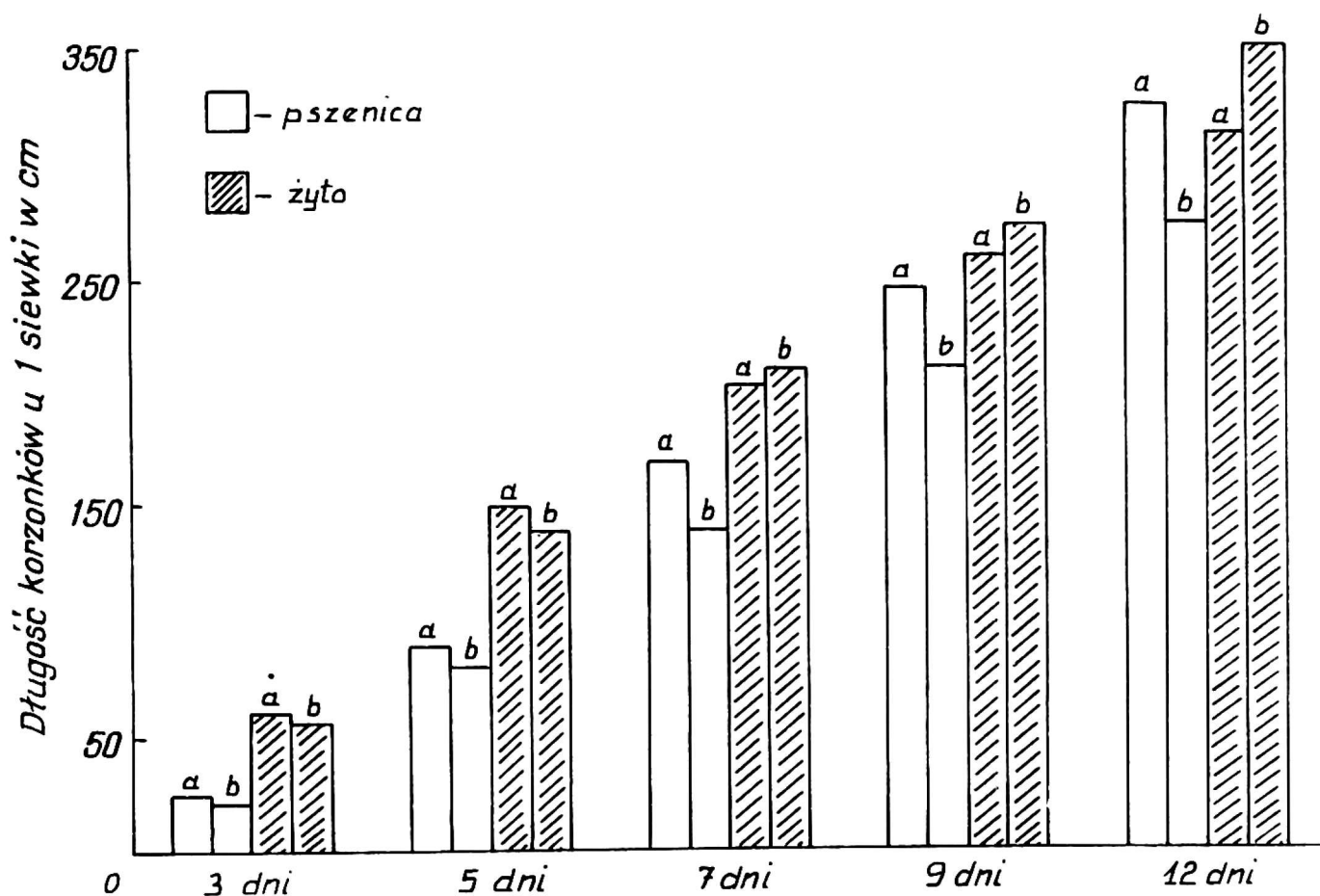
Intensywnemu wzrostowi suchej masy siewek z ziaren o dojrzałości woskowej towarzyszył również szybki ubytek masy bielma (tab. 3). W kiełkujących ziarnach pszenicy i żyta z dojrzałości pełnej obniżenie masy rozkładanych bielma zachodziło wolniej i ich rozpad po 4 dobach kiełkowania był mniejszy o 4-5% w stosunku do masy wyjściowej (tab. 3).

Analizowany przez 12 dni wzrost siewek z ziaren pszenicy i żyta o różnej dojrzałości wykazał również charakterystyczne prawidłowości (rys. 1 i 2). Wzrost łodyżek u siewek z ziaren pszenicy o dojrzałości woskowej w odniesieniu do dojrzałości pełnej był szybszy. Przez cały badany okres różnice w długości łodyżek kształtowały się około 20-25% (rys. 1). Natomiast długość łodyżek u siewek ziaren żyta o dojrzałości woskowej była większa do 7 dni kiełkowania, a dalej wzrost ich przebiegał nieco wolniej niż u siewek ziaren o dojrzałości pełnej (rys. 1).

Odmienne kształtowała się także średnia długość korzonków u siewek ziaren o dojrzałości woskowej w porównaniu z siewkami ziaren o dojrzałości pełnej (rys. 2). W analizowanym okresie rozwoju większy wzrost korzonków u siewek ziaren pszenicy o dojrzałości woskowej przewyższał od 17% do 35% długość korzonków u siewek o dojrzałości pełnej. Z kolei długość korzonków u siewek ziaren żyta o dojrzałości woskowej była większa niż u siewek wyrosłych z ziaren o dojrzałości pełnej tylko do 5 dni kiełkowania (rys. 2).



Rys. 1. Wzrost łodyżek u siewek kiełkujących ziaren pszenicy i żyta z dojrzałości woskowej (a) i pełnej (b)



Rys. 2. Wzrost korzonków u siewek kiełkujących ziaren pszenicy i żyta z dojrzałości woskowej (a) i pełnej (b)

W dalszych etapach wzrostu długość korzonków u siewek ziaren żyta pochodzących z materiału reprezentującego oba stadia dojrzałości, układała się odwrotnie.

Kiełkowanie oraz test tetrazolinowy i aktywność ogólna dehydrogenaz ziaren pszenicy i żyta o różnej dojrzałości

Przeprowadzone analizy żywotności wykazały, że ziarna pszenicy i żyta zebrane w dojrzałości woskowej kiełkowały szybciej i le-

T a b e l a 4

Wskaźniki kiełkowania ziaren pszenicy i żyta o dojrzałości woskowej i pełnej (wyniki są średnimi z 8 oznaczeń)

Gatunek ziaren i stopień dojrzałości	Energia kiełkowania w %	Zdolność kiełkowania w %	Średni czas kiełkowania dni/1 ziarno
Pszenica:			
z doj. woskowej	97	99	2,1
z doj. pełnej	82	96	2,6
Żyto:			
z doj. woskowej	95	98	1,4
z doj. pełnej	90	95	1,7

T a b e l a 5

Żywotność ziaren pszenicy i żyta z dojrzałości woskowej i pełnej określanej testem tetrazolinowym (wyniki są średnimi z 8 oznaczeń)

Gatunek ziaren i stopień dojrzałości	Ziarna żywe w %	Ziarna martwe w %
Pszenica:		
z doj. woskowej	99	1
z doj. pełnej	96	4
Żyto		
z doj. woskowej	98	2
z doj. pełnej	96	4

piej niż ziarna o pełnej dojrzałości (tab. 4). Ziarna pszenicy i żyta o dojrzałości woskowej miały wyższą energię kiełkowania o 15%. Różnice w zdolności kiełkowania między ziarnami obu zbóż o dojrzałości woskowej i pełnej były już znacznie mniejsze i wynosiły około 3% (tab. 4). Czas kiełkowania ziaren pszenicy i żyta o dojrzałości woskowej był odpowiednio o 12 i 7 godzin krótszy niż dla ziaren o dojrzałości pełnej (tab. 4).

Oznaczenia testem tetrazolinowym potencjalnej żywotności ziaren zbóż obu gatunków i z obu etapów dojrzałości były zbliżone do zdolności kiełkowania tych ziaren (tab. 4 i 5). Populacje ziaren pszenicy i żyta o dojrzałości woskowej posiadały średnio od 2-3% więcej żywych i mniej martwych ziaren w porównaniu z ziarnami o dojrzałości pełnej (tab. 5).

Dokonane oznaczenia żywotności ziaren pszenicy i żyta zmodyfikowanym testem tetrazolinowym zwanym aktywnością ogólną dehydrogenaz [21, 23], wykazały przewagę tej właściwości u ziaren o dojrzałości woskowej w odniesieniu do ziaren o dojrzałości pełnej (tab. 6). W spęczniałych zarodkach ziaren pszenicy i żyta o dojrzałości woskowej wytwarzało się o 8 i 9% więcej fenyloformazanu niż w zarodkach ziaren o dojrzałości pełnej.

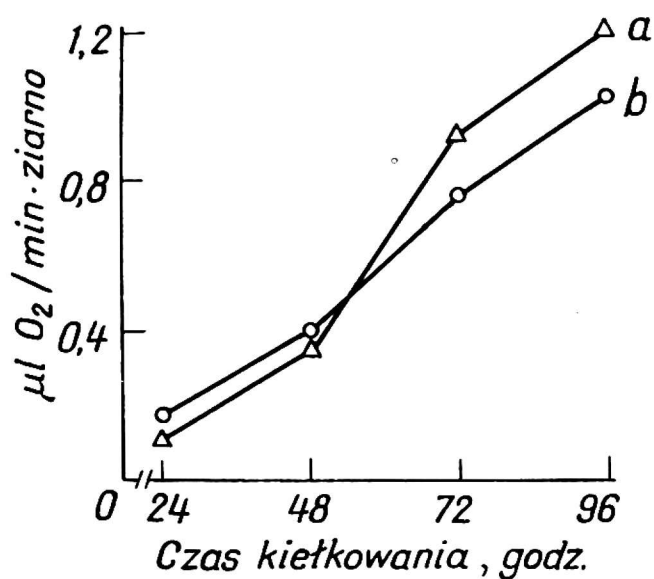
T a b e l a 6

Aktywność ogólna dehydrogenaz w zarodkach pęczniejących ziaren pszenicy i żyta z dojrzałości woskowej i pełnej (wyniki są średnimi z 4 oznaczeń)

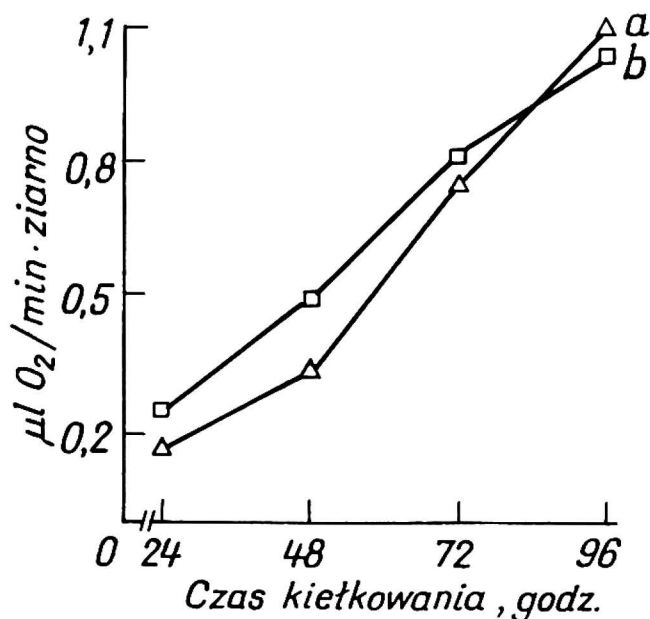
Gatunek ziaren	mg fenyloformazanu (100 zarodków)	
	z dojrzałości woskowej	z dojrzałości pełnej
Pszenica	2,20	2,03
Żyto	1,75	1,60

Intensywność oddychania oraz zawartość białka mitochondrialnego w zarodkach i siewkach ziaren pszenicy i żyta o różnej dojrzałości

Intensywność oddychania różnie dojrzałych ziaren mierzono podczas kiełkowania oddzielnie w całych ziarnach oraz ich rosnących



Rys. 3. Intensywność oddychania kiełkujących ziaren pszenicy z dojrzałości woskowej (a) i pełnej (b)

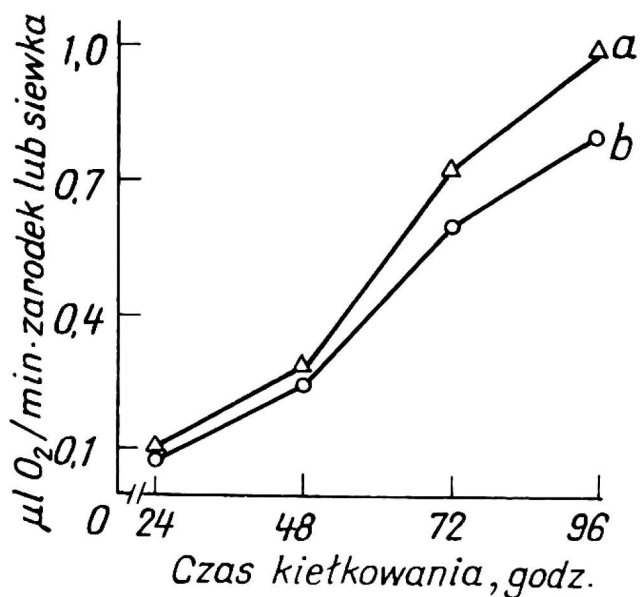


Rys. 4. Intensywność oddychania kiełkujących ziaren żyta z dojrzałości woskowej (a) i pełnej (b)

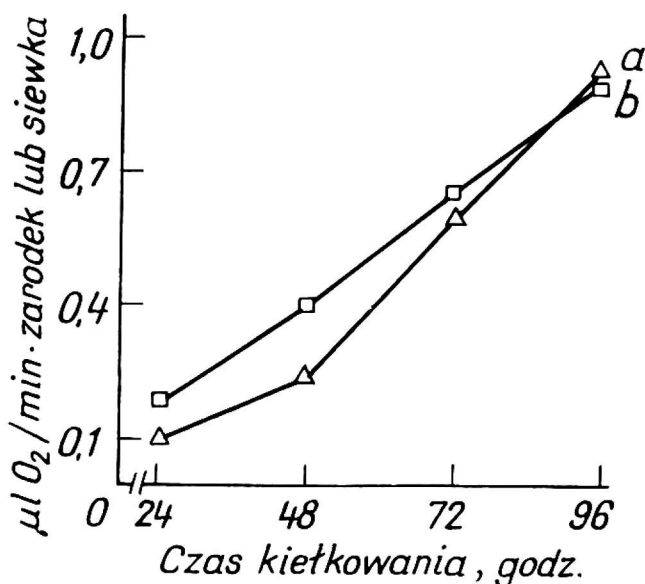
siewkach (rys. 3, 4, 5 i 6). Intensywność pobierania tlenu przez całe (siewki z bielkami) ziarna pszenicy o dojrzałości woskowej w porównaniu z ziarnami o dojrzałości pełnej była nieco niższa w początkowych etapach kiełkowania (rys. 3). Po 2 dobie kiełkowania oddychanie ziaren pszenicy o dojrzałości woskowej przebiegało z wyraźnie większym natężeniem niż u ziaren o dojrzałości pełnej. Pobieranie tlenu przez kiełkujące ziarna żyta o dojrzałości woskowej było niższe przez pierwsze 3 dni kiełkowania, jak przez ziarna o dojrzałości pełnej (rys. 4). Jednak po 4 dobach kiełkowania ziarniaki o dojrzałości woskowej zużywały szybciej tlen niż ziarniaki o dojrzałości pełnej.

Badania intensywności oddychania wydzielonych siewek pszenicy wykazały, że była ona wyższa dla siewek z ziaren o dojrzałości woskowej niż pełnej przez cały okres kiełkowania (rys. 5). Natomiast zużycie tlenu przez zarodki i siewki ziaren żyta o dojrzałości woskowej było niższe do trzeciego dnia kiełkowania. Dalej pobierały one nieco więcej tlenu niż siewki z ziaren w pełni dojrzałych (rys. 6).

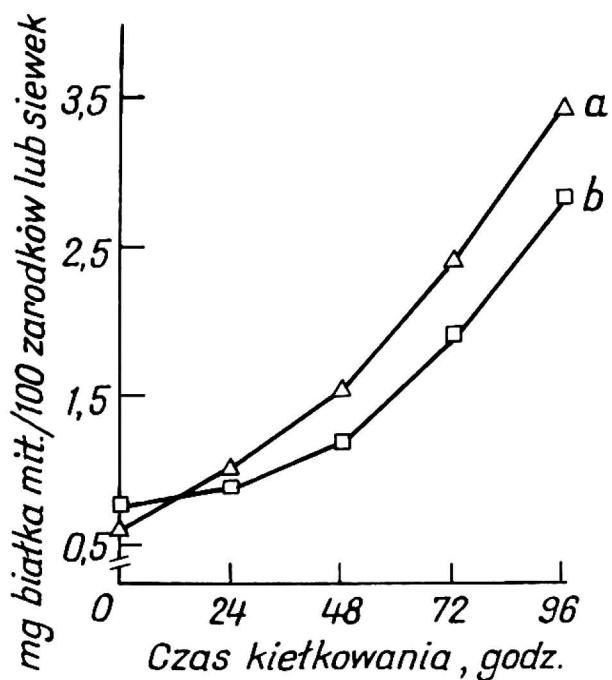
W siewkach pszenicy i żyta wyrosłych z ziaren o dojrzałości woskowej przebiegał bardziej dynamicznie wzrost białka mitochondriów niż w siewkach ziaren o dojrzałości pełnej (rys. 7 i 8). Siewki pszenicy z ziaren o dojrzałości woskowej przewyższały te o doj-



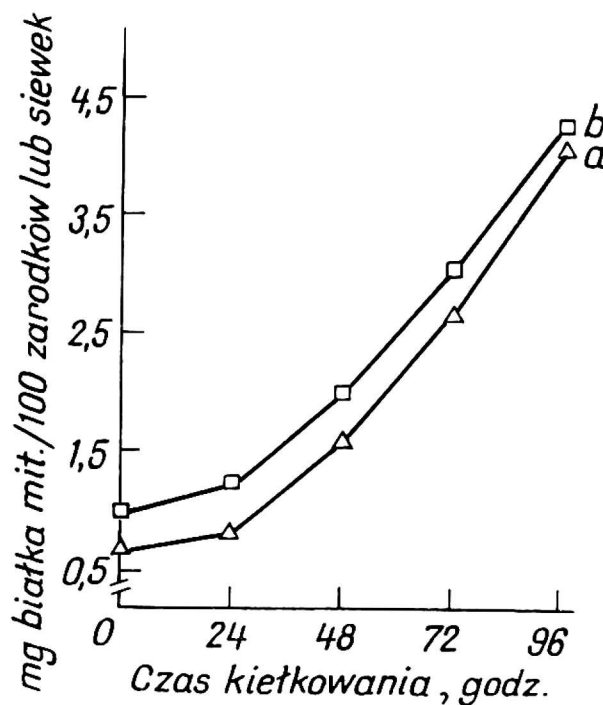
Rys. 5. Intensywność oddychania siewek kiełkujących ziaren pszenicy z dojrzałości woskowej (a) i pełnej (b)



Rys. 6. Intensywność oddychania siewek kiełkujących ziaren żyta z dojrzałości woskowej (a) i pełnej (b)



Rys. 7. Dynamika zmian zawartości białka mitochondriów w siewkach kiełkujących ziaren pszenicy z dojrzałości woskowej (a) i pełnej (b)



Rys. 8. Dynamika zmian zawartości białka mitochondriów w siewkach kiełkujących ziaren żyta z dojrzałości woskowej (a) i pełnej (b)

rzności pełnej zawartości białka mitochondrialnego już po 1 dobie kiełkowania. W porównaniu do ilości wyjściowej (w zarodkach) zawartość białka mitochondriów po 4 dobach kiełkowania zwiększyła

się około 6 razy u siewek wyrosłych z ziaren o dojrzałości woskowej i tylko 4 razy u siewek z ziaren o dojrzałości pełnej (rys. 7). W tym okresie kiełkowania siewki żyta z ziaren o dojrzałości woskowej i pełnej zwiększały ilość białka mitochondriów około 6,5 i 5 razy odpowiednio (rys. 8). Jednak w siewkach ziaren żyta z dojrzałości woskowej w porównaniu z dojrzałością pełną zawartość białka mitochondriów była niższa przez cały okres kiełkowania.

Aktywność oddechowa mitochondriów izolowanych z siewek ziaren pszenicy i żyta o różnej dojrzałości

Dla pełniejszego określenia zależności między oddychaniem a żywotnością ziaren pszenicy i żyta z różnej dojrzałości przesłano także aktywność oddechową mitochondriów z 2-dniowych sie-

T a b e l a 7

Charakterystyka aktywności oddechowej mitochondriów izolowanych z 2-dniowych siewek ziaren pszenicy o dojrzałości woskowej i pełnej (dane są średnimi z 3 izolacji mitochondriów i 3-4 cykli utleniania w stanie 3 i 4 dla każdego substratu)

Dojrzałość ziaren	Substrat	nmole O ₂ /min mg białka mit.		Kontrola oddechowa	ADP : O
		stan 3	stan 4		
Z doj. woskowej	α - ketoglutaran	98	28	3,50	2,54
Z doj. pełnej		82	27	3,03	2,50
Z doj. woskowej	L - jabłczan	170	47	3,54	2,39
Z doj. pełnej		154	53	2,96	2,35
Z doj. woskowej	bursztynian	208	98	2,12	1,7
Z doj. pełnej		171	94	1,82	1,7

wek tych ziaren (tab. 7 i 8). Aktywność oddechową mitochondriów charakteryzowano przy utlenianiu α -ketoglutaranu, L-jabłczanu i bursztynianu. Generalnie mitochondria siewek pszenicy i żyta pobierały szybciej tlen w stanie 3 (po dodaniu ADP) i w stanie 4 (po zużyciu ADP) przy utlenianiu bursztynianu i L-jabłczanu niż α -ketoglutaranu (tab. 7 i 8).

Mitochondria siewek pszenicy i żyta z ziaren o dojrzałości wo-

T a b e l a 8

Charakterystyka aktywności oddechowej mitochondriów izolowanych z 2-dniowych siewek ziaren żyta z dojrzałości woskowej i pełnej (dane są średnimi z 4 izolacji mitochondriów i 3-4 cykli utleniania w stanie 3 i 4 dla każdego substratu)

Dojrzałość	Substrat	nmole O ₂ /min mg białka mit.		Kontrola oddechowa	ADP : O
		stan 3	stan 4		
Z doj. woskowej	α - ketoglu- taran	88	26	3,38	2,40
Z doj. pełnej		74	25	2,96	2,42
Z doj. woskowej	L - jabłczan	146	45	3,24	2,27
Z doj. pełnej		124	55	2,25	2,21
Z doj. woskowej	bursztynian	178	89	2,00	1,67
Z doj. pełnej		149	17	1,71	1,68

skowej w porównaniu z mitochondriami siewek z ziaren o dojrzałości pełnej charakteryzowały się szybszym zużyciem tlenu w stanie 3 dla wszystkich podawanych substratów. Różnice w pobieraniu tlenu w stanie 3 dla mitochondriów siewek pszenicy wynosiły dla α-ketoglutaranu 16%, dla L-jabłczanu 10% i dla bursztynianu 18% (tab. 7). U mitochondriów siewek żyta z obu dojrzałości dysproporcje w pobieraniu tlenu w stanie 3 dla α-ketoglutaranu, L-jabłczanu i bursztynianu dochodziły do 16, 15 i 16% odpowiednio (tab. 8).

Oddychanie w stanie 4 mitochondriów siewek pszenicy i żyta z obu dojrzałości przebiegało bez większych różnic przy utlenianiu α-ketoglutaranu i bursztynianu (tab. 7 i 8). Natomiast utlenianie L-jabłczanu w stanie 4 przez mitochondria siewek pszenicy i żyta z ziaren o dojrzałości pełnej było o 12 i 22% wyższe niż u wydzielonych z siewek ziaren o dojrzałości woskowej (tab. 7 i 8).

Do charakterystyki aktywności oddechowej mitochondriów obok właściwości oksydacyjnych zalicza się również aktywność bioenergetyczną. Jednym ze wskaźników obrazujących tę aktywność jest kontrola oddechowa określana stosunkiem szybkości pobierania tlenu w stanie 3 do szybkości jego pobierania w stanie 4. Jej wielkość wskazuje ile razy wzrasta zużycie tlenu przez mitochondria, kiedy przebiega oksydacyjna fosforylacja, w obecności akceptora energii jakim jest ADP, w porównaniu do tego, które jest energetycznie nieefektywne (stan 4).

Wielkość kontroli oddechowej u mitochondriów siewek pszenicy i żyta wyrosłych z ziaren o dojrzałości woskowej była mniejsza niż z siewek wyrosłych z ziaren o dojrzałości pełnej (tab. 7 i 8). Przeciętnie osiągnięte wielkości kontroli oddechowej przez mitochondria siewek ziaren pszenicy i żyta o dojrzałości pełnej były obniżone o 13-14% dla α -ketoglutaranu i bursztynianu oraz o 20-31% dla L-jabłczanu (tab. 7 i 8).

Wydajność oksydacyjnej fosforylacji (określana wielkością stosunku ADP:O) w mitochondriach siewek pszenicy i żyta z ziaren obu dojrzałości kształtowała się na zbliżonym poziomie dla wszystkich utlenianych substratów (tab. 7 i 8).

DYSKUSJA

Zbierane ziarna pszenicy i żyta w stadium dojrzałości woskowej różniły się niektórymi właściwościami od ziaren w pełni dojrzałych. Mniejsza masa i wielkość ziaren o dojrzałości woskowej wskazują, że końcowy etap ontogenezy ziarniaków związany jest głównie z gromadzeniem substancji zapasowych [2, 10, 11] i wpływa w zasadniczy sposób na ich wykształcenie. Uzyskane wyniki są kontrowersyjne do innych danych [9, 25, 26], ponieważ masa nasion kukurydzy oraz ziaren pszenicy i żyta zbieranych w dojrzałości woskowej była wyższa niż z dojrzałości pełnej.

Niektórzy autorzy [18, 20, 22, 30] donoszą, że masa nasion koreluje z żywotnością i wzrostem siewek. Własne badania i inne dane [10] nie potwierdzają tej zależności. Należy sądzić, że zwiększenie masy nasion lub ziaren ma związek z żywotnością, gdy ten przyrost odbywa się równolegle z rozwojem zarodka [10, 11].

Znamiennym fizjologicznie zjawiskiem dla ziarniaków zbieranych w stadium dojrzałości woskowej są wyraźnie wyższe wskaźniki żywotności. Większa ilość i szybciej kiełkujących ziaren [7, 10, 16], wyższe wartości testu tetrazolinowego i aktywności ogólnej dehydrogenaz w zarodkach [3, 13, 16, 21, 23] oraz zdolność do szybkiego zwiększania masy i wielkości siewek [5, 14, 19, 22, 28, 29], podkreślają wyraźnie wyższą żywotność ziaren pszenicy i żyta zbieranych w dojrzałości woskowej niż pełnej. Ponadto ziarna obu zbóż zebrane w dojrzałości woskowej wykazują typowe właściwości jakimi charakteryzują się nasiona obdarzone wigorem [5, 20, 30]. Świadczy o tym także szybki rozpad substancji zapasowych białem oraz rap-

towne pszekształcanie ich w budulcowe i konstytucjonalne związki siewek [10, 14].

Wysoką żywotność ziaren zbóż zbieranych przed końcem ontogenezy zaobserwowano już dosyć dawno [9, 25, 26]. Użyte jako materiał siewny nasiona kukurydzy oraz ziarna pszenicy i żyta ze zbioru wcześniejszego niż pod koniec dojrzewania, przewyższały te z dojrzałości pełnej wzrostem i rozwojem nie tylko w fazie siewek, uzyskane z nich rośliny rozwijały się bujniej i lepiej plonowały.

Wyniki niniejszych badań oraz innych autorów [1, 14, 17, 18, 19, 31] podkreślają związek między natężeniem oddychania a żywotnością ziaren i właściwością siewek do szybkiego wzrostu. Wysokiej żywotności i dynamicznemu wzrostowi siewek z ziaren o woskowej dojrzałości towarzyszyło intensywne pobieranie tlenu (rys. 3, 4, 5, 6). U nasion o wyraźnie zróżnicowanej żywotności obserwowano znaczne dysproporcje w natężeniu oddychania już w fazie imbibicji [1, 14, 31], a także w dalszych etapach kiełkowania [13, 17, 18, 19, 27]. Wskazuje to jednocześnie, że u nasion o obniżonej żywotności zachodzi wolniejsze aktywowanie aparatu oddechowego podczas kiełkowania.

Dane literatury wskazują również na wolniejszą biogenezę aparatu oddechowego w nasionach o zmniejszonej żywotności lub niższym wigorze [5, 18, 19, 20]. Zastosowanie oznaczeń zawartości białka mitochondrialnego w siewkach pszenicy i żyta, jako obiektywnego miernika biogenezy tych organelli, podkreśla bardziej dynamiczny charakter tego procesu u kiełkujących ziaren o dojrzałości woskowej niż pełnej (rys. 7 i 8). Przeliczenie zawartości białka mitochondriów na masę siewek jeszcze wyraźniej dokumentuje szybsze powstawanie i rozwój mitochondriów w siewkach ziaren o dojrzałości woskowej.

Istotną rolę w kształtowaniu się żywotności i wigoru nasion przypisuje się funkcjonowaniu mitochondriów podczas kiełkowania [5, 20, 30]. Mitochondria nasion o wysokiej żywotności lub wigorze charakteryzuje się szybkim utlenianiem substratów powiązanych ze sprawnym wiązaniem energii [5, 12, 18, 19]. Lepszą aktywność oksydacyjną i fosforylacyjną oraz wyższy stosunek P/O osiągały mitochondria zarodków jęczmienia z dojrzałości woskowej niż pełnej [28]. Stwierdzono również, że nasiona szybko kiełkujące i wydające siewki o przyspieszonym wzroście posiadają wyższy poziom ATP niż te, które wolno kiełkują [6, 17].

Mitochondria siewek pszenicy i żyta z ziaren o dojrzałości wo-

skowej w porównaniu z dojrzałością pełną cechowały się aktywniejszym pobieraniem tlenu i miały wyższy stopień sprzężenia reakcji utleniania i fosforylacji (wyższa wartość kontroli oddechowej). Jakkolwiek wydajność oksydacyjnej fosforylacji (stosunek P/O) nie różniła się u mitochondriów obu typów siewek (tab. 7 i 8). Wskazuje to jednak, że w mitochondriach siewek ziaren o dojrzałościwoskowej miało miejsce bardziej intensywne utlenianie substratów i wysokie jednocześnie wiązanie uwalnianej z nich energii, co dodatkowo wpływało na kiełkowanie tych ziaren i wzrost ich siewek.

Na podstawie własnych danych i literatury [5, 6, 12, 17, 18, 19, 27, 28, 30, 31] można sądzić, że obniżenie natężenia oddychania oraz mniej sprawne funkcjonowanie utleniania biologicznego w mitochondriach podczas pęcznienia i kiełkowania nasion wywołuje pewien deficyt metabolitów oraz energii i jest jedną z głównych przyczyn wolniejszego kiełkowania ziaren i wzrostu ich siewek.

W świetle przedstawionych badań aktywność oddechową tkanek i mitochondriów nasion można zaliczyć do wysoce obiektywnych wskaźników oceny żywotności nasion.

WNIOSKI

1. Ziarna pszenicy i żyta z dojrzałościwoskowej w porównaniu z ziarnami w pełni dojrzałymi mają mniejszą masę i wielkość.
2. Ziarna pszenicy i żyta zebrane w dojrzałościwoskowej osiągają lepsze wskaźniki kiełkowania i testu tetrazolinowego oraz cechują się wyższą aktywnością ogólną dehydrogenaz niż ziarna o pełnej dojrzałości.
3. Ziarna pszenicy i żyta zebrane w dojrzałościwoskowej w porównaniu z ziarnami o pełnej dojrzałości wydają siewki szybciej rosnące i o sprawniejszym wykorzystaniu substancji zapasowych białm.
4. W siewkach pszenicy i żyta uzyskanych z ziaren o dojrzałościwoskowej dynamiczniej wzrasta natężenie oddychania i poziom białka mitochondrialnego niż w siewkach z ziaren o dojrzałościpełnej.
5. W siewkach uzyskanych z ziaren zbóż o dojrzałościwoskowej w porównaniu do siewek ziaren o dojrzałościpełnej, funkcjonują mitochondria, które szybciej utleniają substraty oddechowe i wytwarzają więcej energii biologicznie użytecznej.

6. Natężenie procesów oddychania i bioenergetyki przebiegających w siewkach może być czułym i obiektywnym testem żywotności u zbieranych ziaren zbóż.

LITERATURA

1. Abdul-Baki A. A.: Relationship of glucose metabolism to germinability and vigor in barley and wheat seeds. *Crop Sci.* 9: 1969, 732-737.
2. Austenson H. M., Walton P. D.: Relationships between initial seed weight and mature plant characters in spring wheat. *Can. J. Plant Sci.* 1970, 50: 53-58.
3. Budzyńska J.: Ocena potencjalnej zdolności kiełkowania nasion zbóż metodą tetrazolinową Lakona. Instrukcja IHAR Radzików, 1965.
4. Chance B., Williams G. R.: The respiratory chain and oxidative phosphorylation. *Advan. In Enzymol.* 1956, 17: 65-134.
5. Ching T. M.: Biochemical aspects of seeds vigor. *Seed Sci. and Technol.* 1973, 1: 73-88.
6. Ching T. M.: Adenosine triphosphate content and seed vigor. *Plant Physiol.* 1973, 51: 400-402.
7. Dorywalski J., Wojciechowicz M., Bartz J.: Metodyka oceny nasion. PWRiL, Warszawa 1964.
8. Estabrook R. W.: Mitochondrial respiratory control and the polarographic measurement of ADP:O ratios. W: S. P., Colowick N. O., Kaplan, ed. *Methods in Enzymology*. Acad. Press, New York 1967, vol. 10: 41-47.
9. Grzesiuk S.: Studia nad fizjologią dojrzewającego ziarna zbóż. *Zesz. nauk. WSR Olsztyn* 1961, 11: 3-82.
10. Grzesiuk S.: *Fizjologia nasion*. PWRiL, Warszawa, 1967.
11. Grzesiuk S.: Fizjologiczne i biochemiczne przemiany w dojrzewających nasionach. *Zesz. probl. Post. Nauk rol.* 1971, 113: 29-67.
12. Hanson O., Moreland O. G., Shriner C. R.: Corelation of mitochondrial activities and plant vigor with genotype backgrounds in maize and soybean. *Crop Sci.* 1975, 15: 62-66.
13. Kittock D. L., Law A. G.: Relationship of seedling vigor to respiration and tetrazolium chloride reduction by germinating wheat seeds. *Agron. J.* 1968, 60: 286-288.
14. Kulka K.: Oddychanie i sucha masa kiełkującego ziarna owsa i jęczmienia o różnym wieku. *Zesz. probl. Post. Nauk rol.* 1971, 113: 134-140.
15. Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randall R. J.: Protein measurement with the Folin reagent. *J. Biol. Chem.* 1951, 193: 265-275.
16. Mac Kay D. B.: The measurement of viability. W: E. H. Roberts ed. *Viability of Seeds*, Chapman and Hall LTD London, chapter 1972, 7: 172-208.
17. Marre F., Forti J.: Metabolic responses to auxin. III. The effects of auxin on ATP level as related to the auxin induced respiration increase. *Physiol. Plant.* 1958, 11: 36-47.
18. McDaniel R. G.: Relationship of seed weight, seedling vigor and mitochondrial metabolism in barley. *Crop Sci.* 1969, 9: 823-827.
19. McDaniel R. G.: Genetic factors in fluencing seed vigor: biochemistry of heterosis. *Seed Sci. and Technol.* 1973, 1: 25-50.

20. McDonald M. B.: A review and evaluation of seed vigor tests. Proc. Assoc. Off. Seed Anal. 1975, 65: 109-139.
21. Moore R. P.: Tetrazolium testing for assessing seed quality. [W:] W. Heydecker, ed. Seed Ecology. Butterworths, London, parts, 1972, 18: 347-366.
22. Oelke E. A., Ball R. B., Wick C. M., Miller M. D.: Influence of grain moisture at harvest on seed yield, quality and seedling vigor of rice. Crop Sci. 1969, 9: 144-147.
23. Piat J. R., Springfield H. W.: Tetrazolium staining of clifrose embryos. Proc. Assoc. Off. Seed Anal. 1973, 63: 67-75.
24. Pomeroy M. K.: Studies on the respiratory properties of mitochondria isolated from developing winter wheat seedlings. Plant Physiol. 1974, 53: 653-657.
25. Rejowski A.: Fizjologia i biochemia dojrzewającego ziarna pszenicy. Cz. III. Właściwości fizjologiczne pszenicy wyrosłej z ziaren różnej dojrzałości. Roczn. Nauk rol. 1962, 84: 555-572.
26. Sójka E.: Badania nad fizjologią i biochemią rozwijającego się ziarna żyta (*Secale cereale* L.). Cz. III. Wpływ dojrzałości ziarna siewnego na plonowanie roślin oraz ich odporność na suszę i niskie temperatury. Hod. Rośl. Aklim. i Nasien. 1962, 6: 1-19.
27. Throneberry G. O., Smith F. G.: Relation of respiratory and enzymatic activity to corn viability. Plant Physiol. 1955, 30: 337-343.
28. Tłuczkiwicz J.: Influence of Simazin 50 and Dicuran on oxidative phosphorylation in the mitochondria of spring barley (*Damazy*) embryos. Acta Agrobot. 1974, 27: 61-69.
29. Woodstock L. W.: Seedling growth as a measure of seed vigor. Proc. Int. Seed Test. Ass. 1969, 34: 274-280.
30. Woodstock L. W.: Physiological and biochemical tests for seed vigor. Seed Sci. and Technol. 1973, 1: 127-157.
31. Woodstock L. W., Grabe D. E.: Relationship between seed respiration during imbibition and subsequent seedling growth in *Zea mays* L. Plant Physiol. 1967, 42: 1071-1076.

Януш Тлучкевич

ОЦЕНКА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ ЗЕРНА В РАЗНОЙ ФАЗЕ
СПЕЛОСТИ С ПОМОЩЬЮ ФИЗИОЛОГО-БИОЛОГИЧЕСКИХ ТЕСТОВ

Р е з ю м е

В труде анализировали жизнеспособность зерна и рост сеянцев у прорастающих зерен пшеницы и ржи собранных в фазе восковой и полной спелости. Жизнеспособность зерна и рост органов сеянцев сравнивали с интенсивностью дыхания, содержанием белка митохондрий и их дыхательную активность. Зерно пшеницы и ржи собранное в фазе восковой спелости прорастало быстрее и лучше, а также характеризовалось высшим количеством живых зерен определяемых тетразолиновым тестом и обдеи высшей активностью дегидрогеназ в зародышах, чем зерно собранное в фазе полной спелости. Рост сеянцев из обоих видов зерна соб-

ранного в фазе восковой спелости был также более быстрым. Прорастающее зерно пшеницы и ржи собранное в фазе восковой спелости характеризовалось более динамическим усваиванием кислорода всем зерном и выросшем из него сеянцем, а также более быстрым ростом содержания белка митохондрий в сеянцах. Митохондрии этих сеянцев потребляли также более высокие количества кислорода в фазе 3 и характеризовались высшей величиной контроля дыхания. Представленные зависимости свидетельствуют об объективном характере проводимых измерений интенсивности дыхания зерна и дихательной активности их митохондрий в тестовании жизнеспособности зерна.

Janusz Tłuczkiewicz

ESTIMATION OF VITALITY OF CEREAL GRAIN OF DIFFERENT
RIPENESS DEGREE BY MEANS OF PHYSIOLOGO-BIOCHEMICAL TEST

S u m m a r y

The vitality of grain and growth of seedlings in germinating wheat and rye grain harvested at the wax ripeness stage was analyzed in the work. The vitality of grains and the growth of seedling organs were compared with the transpiration intensity, protein content in mitochondriae and their transpiration activity. The wheat and rye grain harvested at the wax ripeness stage germinated quicker and better and were characterized by a great number of living grains (determined by the tetrazoline test) and higher general activity of dehydrogenases in germs than in grains harvested in full ripeness. The growth of seedlings of both grain kinds harvested at the wax ripeness stage, ran also quicker. Germinating wheat and rye grains, harvested at the stage of wax ripeness, were characterized by a more dynamical oxygen assimilation by whole grains and seedlings and by quicker growth of the protein content in mitochondriae in seedlings as compared with grain in full ripeness. Mitochondriae of these seedlings assimilated more oxygen at the stage 3 and showed higher value of the transpiration control. The relationships as presented above prove an objective character of applied measurements of the transpiration intensity of grain and of transpiration activity of their mitochondriae in testing of the vitality of grain.