

AKUMULACJA α -D-GALAKTOZYDÓW SACHAROZY I D-PINITOLU W ROZWIJAJĄCYCH SIĘ NASIONACH WYKI DROBNOKWIATOWEJ (*Vicia hirsuta* (L.) S. F. GRAY) PODDANYCH DESYKACJI¹

Lesław B. Lahuta, Ewa Gojło, Ryszard J. Górecki

Katedra Fizjologii i Biotechnologii Roślin, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Wstęp

Nasiona roślin strączkowych podczas rozwoju i dojrzewania gromadzą znaczne ilości oligosacharydów, reprezentowanych powszechnie przez cukry rodziny rafinozy (RFO), a u niektórych gatunków również galaktozylocyklitole [HORBOWICZ, OBENDORF 1994]. Obie grupy α -D-galaktozydów oprócz funkcji zapasowych mogą uczestniczyć w ochronie tkanek przed szkodliwymi następstwami odwodnienia [OBENDORF 1997]. Działanie ochronne tłumaczy się zarówno stabilizującym wpływem na strukturę błon komórkowych [CROWE i in. 1984] jak i wytwarzaniem się w komórkach fazy „ciekłego szkła”. Pojęcie to określa roztwór o stopniu nasycenia tak wysokim, że migracja cząsteczek jest silnie ograniczona lub niemożliwa [LEOPOLD i in. 1994].

W naturalnych warunkach intensywne akumulacja α -D-galaktozydów zachodzi pod koniec dojrzewania nasion i zbiega się z uzyskiwaniem przez nasiona tolerancji na desykcję [BLACKMAN i in. 1992; GÓRECKI i in. 2000a]. W nasionach roślin strączkowych galaktozylocyklitole (Gal-C) są gromadzone w wielokrotnie mniejszych ilościach niż RFO [HORBOWICZ, OBENDORF 1994]. Z tego powodu ich funkcje fizjologiczne nie są wyjaśnione. Najnowsze doniesienia wskazują, że Gal-C mogą zastępować cukry rodziny rafinozy w ich funkcjach fizjologicznych [HORBOWICZ i in. 1998]. W badaniach własnych podjęto więc próbę porównania akumulacji obu grup α -D-galaktozydów w dojrzewających nasionach wyki drobnokwiatowej poddawanych desykcji.

Materiał i metody

Na podstawie wyników badań składu węglowodanów rozpuszczalnych w ekstraktach z dojrzałych nasion kilkunastu gatunków wyki [LAHUTA i in. 2001] do doświadczeń wybrano dziko rosnącą wykę drobnokwiatową (*Vicia hirsuta* (L.)

¹ Praca finansowana z grantu Komitetu Badań Naukowych 3P04C 03622.

S. F. GRAY), charakteryzującą się wysoką zawartością RFO i Gal-C w nasionach oraz krótkim okresem dojrzewania nasion. Rośliny uprawiano w kontrolowanych warunkach szklarniowych (16–18°C/dzień, 12–14°C/noc, 14 godzinny fotoperiod). Oznaczano daty zakwitania poszczególnych kwiatostanów. Dojrzewające nasiona zbierano z dwóch pierwszych kwiatostanów w odstępach 2–4-dniowych od 14 do 36 dnia po kwitnieniu (DPK). Bezpośrednio po zbiorze oznaczano zawartość świeżej i suchej masy [ISTA 1996] oraz cukrowców rozpuszczalnych (metodą chromatografii gazowej wg GÓRECKIEGO i in. [1997]). W celu określenia zdolności nasion do kiełkowania nasiona poddawano ręcznej skaryfikacji (przy użyciu igły preparacyjnej, w warunkach sterylnych) i umieszczano w szalkach Petriego na wilgotnych krążkach z bibuły filtracyjnej. Po 14 dniach inkubacji (w temperaturze 22°C) liczono ilość kiełkujących nasion.

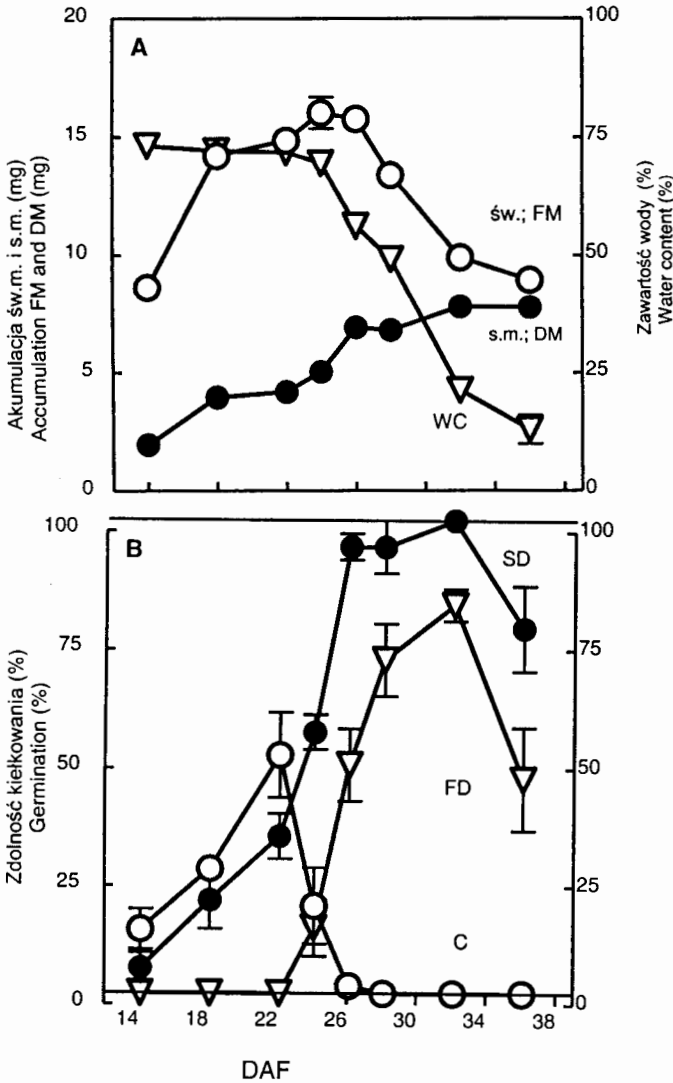
Stres desykacyjny indukowano poprzez umieszczenie nasion w ekzykatorach o kontrolowanej wilgotności względnej powietrza (RH). Wykonano dwa eksperymenty różniące się szybkością odwadniania tkanek. Szybkie odwadnianie (ang. fast drying, FD) polegało na umieszczaniu nasion nad nasyconym roztworem chlorku litu (12% RH) w temperaturze 22°C przez 6 dni. W teście powolnej desykacji (ang. slow drying, SD) nasiona odwadniano w atmosferze o stopniowo malejącej wilgotności względnej (od 95 do 12% RH, nad nasyconymi roztworami odpowiednich soli, wg GÓRECKIEGO i in. [1997]). Po wysuszeniu nasion (do wilgotności 6% świeżej masy) analizowano w nich zawartość cukrowców oraz określano zdolność nasion do kiełkowania, której wartość przyjęto za wskaźnik odporności tkanek na odwodnienie.

Wyniki i dyskusja

Rozwój i dojrzewanie nasion

Pierwszą próbę nasion pobrano w 14 dniu po kwitnieniu (DPK), gdy zarodek wykazywał zróżnicowanie na oś zarodkową i liścienie. W dynamice wzrostu obserwowano trzy etapy (rys. 1A). W pierwszym, do 22 DPK wzrost nasion polegał na równoczesnej akumulacji suchej masy i pobieraniu wody. W drugim etapie (do 26 DPK) intensywnej akumulacji suchej masy towarzyszyło stopniowe obniżanie się zawartości wody, nasiona osiągały największe rozmiary. Etap trzeci, od 28 do 36 DPK – to okres zahamowania wzrostu zarodka, charakteryzujący się szybką utratą wody. Obserwowana etapowość wzrostu wyki drobnokwiatowej odpowiadała schematowi dynamiki wzrostu nasion większości uprawnych gatunków roślin strączkowych [GÓRECKI i in. 2000a].

Rozwijające się nasiona wyki uzyskiwały 50% zdolność do kiełkowania w 22 DPK (rys. 1B). Przez następne 4 dni traciły tę zdolność i do końca dojrzewania wykazywały cechy nasion spoczynkowych (twardych). Tak głęboki spoczynek może być cechą gatunkową, związaną z wytwarzaniem nieprzepuszczalnych dla wody i gazów okryw nasiennych. U niektórych gatunków wyki spoczynek może być przerywany przez niskie [ISTA 1996] lub wysokie temperatury [MOSIDIS, ZHANG 1995], bądź zabieg chemicznej, lub mechanicznej skaryfikacji [TOMER, SINGH 1993]. W badaniach własnych zabieg skaryfikacji nie przerywał spoczynku nasion, natomiast zaskakująco, powolne i szybkie odwadnianie nasion zebranych po 24 DPK stymulowało ich kiełkowanie.



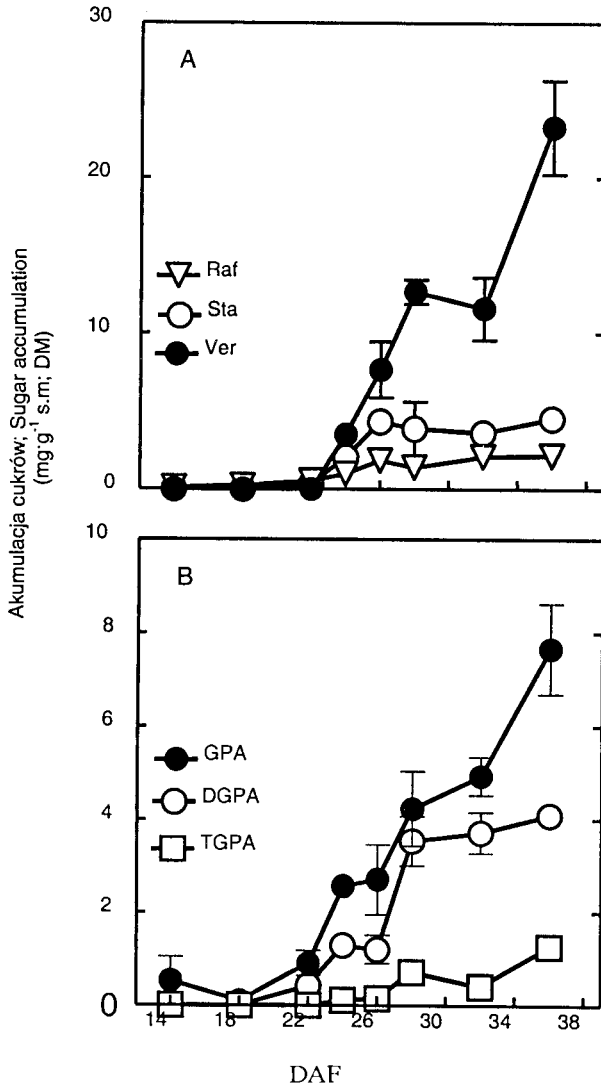
Rys. 1. A. Akumulacja świeżej (św.m.) i suchej masy (s.m.) oraz zmiany zawartości wody (WC) w dojrzewających nasionach wyki drobnokwiatowej. Wartości średnie \pm średni błąd standardowy (SEM) z czterech powtórzeń; B. Zdolność nasion do kiełkowania przed (C) i po: szybkiej (FD) lub powolnej desykcacji (SD). Wartości średnie \pm średni błąd standardowy (SEM) z trzech powtórzeń

Fig. 1. A. Accumulation of fresh weight (FM), dry weight (DM) and changes in water content (WC) in developing *Vicia hirsuta* seeds. Vertical bars represent \pm SE; B. Seed germinability before (C) and after fast (FD) or slow drying (SD). Vertical bars represent \pm SE

Gromadzenie α -D-galaktozydów

W 14 DPK nie stwierdzono w nasionach obecności RFO i Gal-C. Nasiona zawierały sacharozę, cukry proste, maltozę, *myo*-inozytol, D-pinitol i galaktinol.

Zawartość galaktinolu (zasadniczego donora reszty galaktozowej do syntezy RFO i Gal-C) wzrastała do 26 DPK, po czym stopniowo obniżała się. Równocześnie malała zawartość wolnego *myo*-inozytoli. Pomiedzy 18–22 DPK rozpoczynała się akumulacja rafinozy, stachiozy, galaktopinitolu A i di-galaktopinitolu A (rys. 2).



Rys. 2. Akumulacja cukrów rodziny rafinozy (A) i galaktozylopinitoli A (B) w dojrzewających nasionach wyki drobnokwiatowej. Raf – rafinoza, Sta – stachioza, Ver – verbaskoza, GPA – galaktopinitol A, DGPA – di-galaktopinitol A, TGPA – tri-galaktopinitol A. Wartości średnie \pm średni błąd standardowy (SEM) z trzech powtórzeń

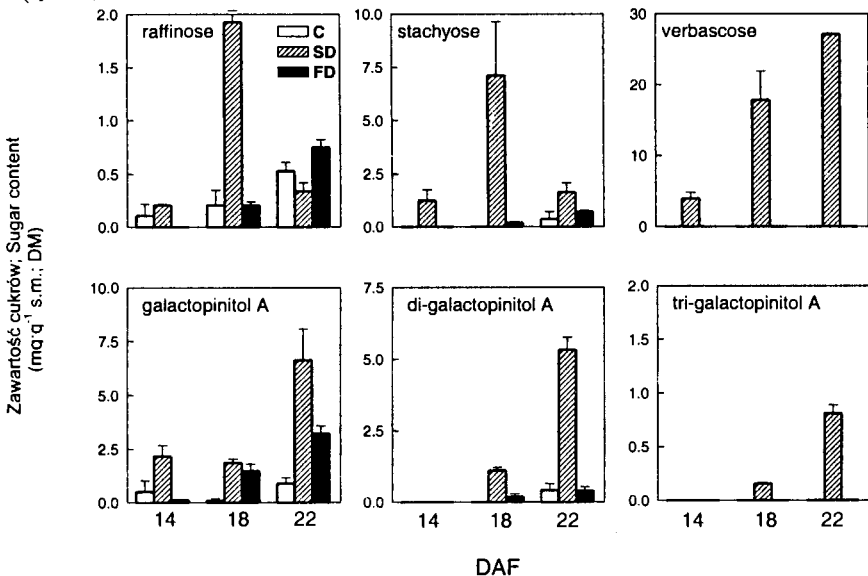
Fig. 2. Accumulation of raffinose family oligosaccharides (A) and galactosyl cyclitols (B) in developing *Vicia hirsuta* seeds. Raf – raffinose, Sta – stachyose, Ver – verbascose, GPA – galactopinitol A, DGPA – di-galactopinitol A, TGPA – tri-galactopinitol A. Vertical bars represent \pm SE

Werbaskoza i tri-galaktopinitol A pojawiły się w 24 DPK. Wraz z późniejszym odwadnianiem tkanek dominującym kierunkiem w akumulacji RFO było gromadzenie werbaskozy, natomiast wśród Gal-C – wzrastała zawartość mono- i di-galaktopinitolu A. Choć akumulacja obu grup galaktozydów rozpoczynała się w tym samym czasie, to jej intensywność i zmiany jakościowe wykazywały odmienny charakter. Przez cały okres dojrzewania nasion ilość RFO trzykrotnie przewyższała ilość gromadzonych Gal-C. Wśród RFO dominował kierunek biosyntezy werbaskozy, natomiast u Gal-C – galaktopinitolu A. Wydaje się, że dominująca akumulacja RFO w nasionach wyki drobnokwiatowej jest cechą gatunkową. Również w nasionach innych roślin strączkowych obserwuje się wielokrotnie wyższą zawartość RFO niż Gal-C [HORROWICZ, OBENDORF 1994]. Nie wiadomo, czy wysokie stężenia *myo*-inozytolu oraz D-pinitolu w nasionach niedojrzałych hamowały rozpoczęcie biosyntezy α -D-galaktozydów.

Wpływ desykcacji na skład i zawartość oligosacharydów

Niedojrzałe nasiona (14-22DPK) wykazywały najwyższą wrażliwość na odwodnienie (rys. 1B). Nie były zdolne do przeżycia stresu szybkiego odwadniania, natomiast po powolnym wysuszeniu ich zdolność do kiełkowania obniżyła się o 5–10% w stosunku do nasion przed suszeniem. Nasiona starsze (26–32DPK) wykazywały blisko 100% odporność na powolne odwadnianie. Szybkie suszenie obniżało ich zdolność do kiełkowania do 50–80%.

Nie stwierdzono większego wpływu suszenia dojrzewających nasion (po 24DPK) na zmiany zawartości RFO i Gal-C. Nasiona młodsze (14-22DPK) reagowały na desykcację rozpoczęciem i intensywną akumulacją obu grup galaktozydów (rys. 3).



Rys. 3. Zawartość RFO i Gal-C w rozwijających się nasionach wyki drobnokwiatowej przed desykcacją (C), po szybkiej (FD) i po powolnej desykcacji (SD). Wartości średnie \pm średni błąd standardowy (SEM) z trzech powtórzeń

Fig. 3. The content of RFO and Gal-C in developing *Vicia hirsuta* seeds before drying (C), after fast (FD) and slow drying (SD). Vertical bars represent \pm SE

Znacznie silniejszą akumulację RFO i galaktopinitoli obserwowano w nasionach poddawanych powolnemu wysychaniu, niż w nasionach odwadnianych szybko. W reakcji na szybką dehydratację tkanki gromadziły więcej D-pinitolu i galaktopinitolu A, niż po powolnej desykcji. Podobne zmiany w składzie cukrowców rozpuszczalnych wywoływane odwodnieniem obserwuje się w nasionach soi [OBENDORF i in. 1998], łubinu [GÓRECKI i in. 1997], grochu [GÓRECKI i in. 2000b]. Pojawianie się, lub wzrost zawartości RFO i galaktopinitoli w odpowiedzi na odwodnienie sugeruje, że pełnią one funkcje ochronne. Intensywniejsze gromadzenie RFO wskazuje, że ta grupa związków w większym stopniu, niż Gal-C może być związana z ochroną tkanek. Obserwowany wzrost zawartości D-pinitolu w odpowiedzi na szybką desykcję potwierdza osmoprotekcyjną rolę tego związku w tkankach nasiennych [KUO i in. 1997]. Powyższe wyniki przemawiają za istotnym udziałem RFO w ochronie tkanek nasiennych przed odwodnieniem oraz potencjalnym współuczestnictwem cyklitolu i Gal-C w tym działaniu.

Literatura

- BLACKMAN S.A., OBENDORF R.L., LEOPOLD A.C. 1992. *Maturation proteins and sugars in desiccation tolerance of developing soybean seeds*. Plant Physiology 100: 225–230.
- CROWE L.M., MOURADIAN R., CROWE J.H., JACKSON S.A., WOMERSLEY C. 1984. *Effects of carbohydrates on membrane stability at low water activities*. Biochim. Biophys. Acta 769: 141–150.
- GÓRECKI R.J., PIOTROWICZ-CIEŚLAK A.I., LAHUTA L.B., OBENDORF R.L. 1997. *Soluble carbohydrates in desiccation tolerance of yellow lupin seeds during maturation and germination*. Seed Science Research 7: 107–115.
- GÓRECKI R.J., FORDOŃSKI G., HALMAJAN H., HORBOWICZ M., JONES R., LAHUTA L.B., 2000a. *Seed physiology and biochemistry*, in: *Carbohydrates in Legume Seeds*. C. Hedley (Ed.). CAB International: 117–144.
- GÓRECKI R.J., LAHUTA L.B., HEDLEY C., JONES A. 2000b. *Soluble sugars in maturing pea seeds of different lines in relation to desiccation tolerance*, in: *Seed Biology: Advances and Applications*. CAB International, M. Black, K.J. Bradford, J. Vasquez-Ramos (Eds): 67–74.
- HORBOWICZ M., OBENDORF R.L. 1994. *Seed desiccation tolerance and storability: Dependence on flatulence-producing oligosaccharides and cyclitols – review and survey*. Seed Science Research 4: 385–405.
- HORBOWICZ M., BRENAC P., OBENDORF R.L. 1998. *Fagopyritol B1, O- α -D-galactosylpyranosyl-(1 \rightarrow 2)-D-chiro-inositol, a galactosyl cyclitol in maturing buckwheat seeds associated with desiccation tolerance*. Planta 205: 1–11.
- ISTA (International Seed Testing Association) 1996. *International rules for seed testing*. Seed Science and Technology 24, Supplement.
- KUO T.M., LOWELL C.A., NESLEN T. 1997. *Occurrence of pinitol in developing soybean seed tissues*. Phytochemistry 45(1): 29–35.
- LAHUTA L., GÓRECKI R.J., HOLDYŃSKI C., HORBOWICZ M. 2001. *The seeds of genus Vicia (Leguminosae) as an object for study on metabolism of raffinose series of oligosaccharides and galactosyl cyclitols*. 4th European Conference on Grain Legumes, Cracow: 366–367.

- LEOPOLD A.C., SUN W.Q., I. BERNAL-LUGO 1994. *The glassy state in seeds: analysis and function*. Seed Science Research 4: 267–274.
- MOSJIDIS J.A., ZHANG X. 1995. *Seed germination and root growth of several Vicia species at different temperatures*. Seed Sci. Technol. 23: 749–759.
- OBENDORF R.L., DICKERMAN A.M., PFLUM M., KACALANOS M.A., SMITH M.E. 1998. *Drying rate alters soluble carbohydrates, desiccation tolerance and subsequent seedling growth of soybean (Glycine max L. Merr.) zygotic embryos during in vitro maturation*. Plant Science 132: 1–12.
- OBENDORF R.L. 1997. *Oligosaccharides and galactosyl cyclitols in seed desiccation tolerance (Review Update)*. Seed Science Research 7: 63–74.
- TOMER R.P.S., SINGH K. 1993. *Hard seed studies in rice bean (Vigna umbellata)*. Seed Sci. Technol. 21: 679–683.

Słowa kluczowe: wyka drobnokwiatowa, nasiona, rafinoza, galaktozylocyklitole, desykcja

Streszczenie

Akumulacja cukrów rodziny rafinozy i galaktozylocyklitoli w rozwijających się nasionach wyki drobnokwiatowej (*Vicia hirsuta* (L.) S. F. GRAY) rozpoczęła się na początku fazy intensywnego wzrostu liścieni i gromadzenia suchej masy. Intensywniej przebiegała w okresie odwadniania nasion. Zasadniczym kierunkiem w biosyntezie cukrów rodziny rafinozy była akumulacja werbaskozy, natomiast wśród galaktozylocyklitoli dominowała synteza mono- i di-galaktopinitolu A. Nie-dojrzałe nasiona w odpowiedzi na wymuszoną dehydratację reagowały rozpoczęciem i bardzo intensywną biosyntezą wszystkich cukrów rodziny rafinozy, a także wzrostem zawartości D-pinitolu i galaktopinitolu A. Wraz ze wzrostem zawartości obu grup α -D-galaktozydów wzrastała odporność nasion na odwodnienie.

ACCUMULATION OF α -D-GALACTOSIDES OF SUCROSE AND D-PINITOL IN DEVELOPING SEEDS OF *Vicia hirsuta* (L.) S. F. GRAY DURING DESICCATION

Lesław B. Lahuta, Ewa Gojło, Ryszard J. Górecki
Department of Plant Physiology and Biotechnology,
University of Warmia and Mazury, Olsztyn

Key words: *Vicia hirsuta*, seed, raffinose, galactosyl cyclitols, desiccation

Summary

Accumulation of raffinose family oligosaccharides (RFO) and galactosyl cyclitols in developing *Vicia hirsuta* seeds began in the phase of intensive seed growth. The most intensive biosynthesis of both groups of α -D-galactosides occurred in the maturation phase, when seeds undergo dehydration. Desiccation

of unripe seeds resulted in accumulation of raffinose, stachyose, and verbascose. The higher accumulation of D-pinitol and galactopinitol A was associated with fast drying. The presence of RFO in unripe seed after seed drying coincides with seed desiccation tolerance.

Dr Lesław B. Lahuta
Katedra Fizjologii i Biotechnologii Roślin
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski
Plac Łódzki 3/308
10-718 OLSZTYN
e-mail: lahuta@uwm.edu.pl