

ANTONI PIOTR CIEPIELA, HUBERT SYTYKIEWICZ, MARIUSZ ŁUBKOWSKI

ZMIANY W ZAWARTOŚCI WYBRANYCH FRAKCJI BIAŁKA IZOLOWANEGO Z SIEWEK PSZENŻYTA JAREGO PODDANEGO DZIAŁANIU NISKIEJ TEMPERATURY

*Z Katedry Biologii Molekularnej i Biofizyki
Akademii Podlaskiej w Siedlcach*

ABSTRACT. The obtained results indicate that in analysed seed leaves of seedlings of spring triticale 'Kargo' cultivar exposed to low temperature occurs a statistically significant decrease in total protein content, comparing to the control. Similar results were showed by analysing the concentration of this protein fraction in propagation joints and roots of seedlings of spring triticale 'Kargo' (exception propagation joints after 24 h of exposition to low temperature). Simultaneously a statistically significant increase in soluble protein content in seed leaves was found (exception 12 h of exposition to low temperature) and propagation joints after 12 h of their exposition, comparing to the control plants. Moreover, statistical analysis showed a significant increase in concentration of this protein fraction in roots of seedlings exposed to coldness after 1 and 12 h, comparing to the control.

Key words: spring triticale, low temperature stress, protein

Wstęp

W ostatnich latach obserwuje się dynamiczny rozwój badań biochemicznych, fizjologicznych i genetycznych nad odpornością roślin na czynniki stresowe. W wyniku obniżania się temperatury środowiska poniżej punktu krystalizacji wody w tkankach roślinnych następuje przechłodzenie komórek i dochodzi do tworzenia się kryształów lodu (**Kacperska** 1986). Powstawanie lodu w obrębie komórki jest zawsze dla niej śmiertelne, gdy spadek temperatury otoczenia jest bardzo gwałtowny (**Steponkus** i **Webb** 1992). Prace nad identyfikacją genów i białek związanych z procesem nabywania przez rośliny odporności na niską temperaturę są prowadzone z dużą intensywnością. Gatunki lub odmiany roślin odporne na chłód charakteryzują się zdolnością doko-

nywania szybszych zmian w składzie chemicznym membran komórkowych oraz biosyntezą białek funkcjonujących w warunkach chłodu (Skrabka 1992, Kacperska 1997, Skoczkowski 1997).

Ze względu na niewielkie wymagania wodno-glebowe i dużą wartość odżywczą, pszenżyto jare budzi obecnie znaczne zainteresowanie wśród rolników i skłania do podejmowania prac nad zagadnieniem odporności tego zboża na niekorzystne warunki klimatyczne, jakie panują wczesną wiosną. Zmiany w zawartości białek w pszenicy jarej indukowane niską temperaturą były przedmiotem badań Guya (1990) i Rapacza (1997), którzy wykazali, że niska temperatura powoduje wzrost stężenia tych substancji w siewkach. Grzesiuk i Login (1974) stwierdzili natomiast, iż największy związek z mrozoodpornością pszenicy jarej mają białka rozpuszczalne, których poziom wyraźnie wzrasta w warunkach działania chłodu.

Material i metody

Doświadczenia przeprowadzono w warunkach laboratoryjnych w Katedrze Biologii Molekularnej i Biofizyki Akademii Podlaskiej w Siedlcach. Badaniami objęto tygodniowe siewki pszenżyta jarego odmiany 'Kargo' wyhodowane w temperaturze $20 \pm 3^\circ\text{C}$ i wilgotności względnej $65 \pm 5\%$. Rośliny umieszczono w komorze chłodniczej o temperaturze -2°C i pozostawiono na: 1, 6, 12 i 24 godz. Czas ekspozycji siewek na obniżoną temperaturę został tak dobrany, aby dokonać oceny reakcji stresowej pszenżyta jarego, wywołanej krótkotrwałymi przymrozkami, które występują w okresie wczesnej wiosny. Kontrolę stanowiły siewki nie poddane wpływowi stresu niskotemperaturowego.

Zawartość azotu ogólnego oznaczono metodą Kjeldahla, a stężenie białka ogólnego w badanych organach siewek obliczono, mnożąc zawartość azotu ogólnego przez współczynnik 5,7 (Sikka i in. 1978). Białko rozpuszczalne izolowano według procedury opisanej przez Lasheena i in. (1970), a jego zawartość określono metodą Layne'a (1957). Wszystkie analizy biochemiczne wykonano w trzech powtórzeniach. Zmiany w zawartości badanych frakcji białkowych w siewkach pszenżyta 'Kargo', wywołane różnym czasem działania niskiej temperatury, szacowano testem wielokrotnego rozstępu Duncana, przyjmując poziom istotności $P \leq 0,05$.

Wyniki

Stwierdzono, że ekspozycja na chłód powoduje istotny statystycznie spadek zawartości białka ogólnego w liścieniach badanych siewek pszenżyta jarego odmiany 'Kargo' w porównaniu z kontrolą. W węzłach krzewienia analizowanych siewek w ciągu trzech badanych okresów chłodzenia (1, 12 i 24 godz.) zaobserwowano również mniejszą zawartość białka ogólnego niż w roślinach kontrolnych. Natomiast 6-godzinne chłodzenie spowodowało statystycznie istotny wzrost zawartości tej frakcji białka, w porówna-

niu z węzłami kontrolnymi. Analizując korzenie testowanych siewek, odnotowano, że tylko podczas 24-godzinnej chłodzenia poziom białka ogólnego w badanych organach był istotnie wyższy niż w roślinach kontrolnych (tab. 1, ryc. 1).

W badaniach dotyczących wpływu działania chłodu na zawartość białka rozpuszczalnego w organach siewek pszenżyta jarego odmiany 'Kargo' wykazano istotny statystycznie wzrost jego zawartości w liścieniach (z wyjątkiem 12 godz. działania niskiej temperatury) i korzeniach (wyjątek 6 i 24 godz.) oraz spadek w węzłach krzewienia (wyjątek 12 godz.) w stosunku do roślin kontrolnych (tab. 2, ryc. 2).

Dyskusja i wnioski

Analizowane organy siewek pszenżyta jarego odmiany 'Kargo' wykazują zróżnicowaną reakcję na stres niskotemperaturowy. Największe zmiany w zawartości białka ogólnego zachodzą w liścieniach, gdzie zawartość spada o 1/3 w stosunku do roślin kontrolnych. Odwrotne zjawisko obserwuje się w korzeniach, w których począwszy od 1 godz. chłodzenia, obserwuje się stopniowy wzrost poziomu tej frakcji białka. Zmiany w stężeniu białka ogólnego w siewkach testowanej odmiany pszenżyta jarego są prawdopodobnie spowodowane zróżnicowaną reakcją badanych organów na chłód. Liścienie najbardziej reagują na zmiany warunków środowiskowych, co potwierdzają wyniki badań uzyskane przez **Grzesiuka i Łogina** (1974), którzy stwierdzili spadek zawartości całkowitej puli białek w tych organach pod wpływem hartowania roślin.

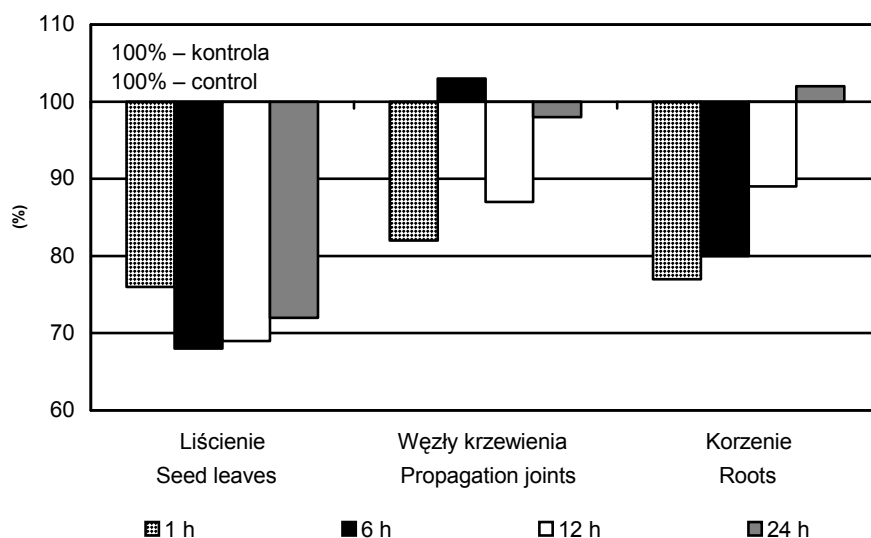
Stężenie białka rozpuszczalnego w badanych organach siewek pszenżyta 'Kargo' zmienia się w zależności od czasu działania niskiej temperatury. W liścieniach zawartość tej frakcji białka wzrasta po 1, 6 i 24 godz. ekspozycji na mróz. Węzły krzewienia reagują wzrostem ilości białka rozpuszczalnego tylko po 12 godz. działania niskiej temperatury, a korzenie po 1 i 12 godz. Wykazany wzrost stężenia tej frakcji białka w poszczególnych organach siewek pszenżyta jarego nie jest jednak tak wysoki, jak podaje to **Rapacz** (1997). Stwierdził on bowiem pięciokrotny wzrost zawartości białka rozpuszczalnego w siewkach rzepaku poddanych działaniu niskiej temperatury. Do wytłumaczenia tego zjawiska może posłużyć hipoteza **Lina** (1992, za **Solecką** 1994), zgodnie z którą wzrost poziomu białka rozpuszczalnego jest wynikiem jego transportu do stromy chloroplastów, gdzie chroni ono błony tylakoidów przed uszkodzeniami wywołanymi niską temperaturą. **Picket** (1994, za **Solecką** 1994) twierdzi natomiast, że białka te mogą wiązać na swojej powierzchni kryształy lodu. Do innych wniosków dochodzi **Kacperska-Palacz** (1970), która uważa, że na kształtowanie mrozoodporności roślin nie ma tak dużego wpływu zawartość białek rozpuszczalnych, lecz jakość tych frakcji. **Chen i in.** (1994, za **Solecką** 1994) w hodowli komórkowej stokłosa wykazali syntezę siedmiu nowych frakcji białek rozpuszczalnych pod wpływem chłodzenia. Natomiast **Solecka** (1994) stwierdziła u *Solanum communi* (L.) poddanemu działaniu niskiej temperatury pojawienie się od 11 do 14 nowych peptydów.

Tabela 1
Zawartość białka ogólnego w badanych organach siewek pszenżyta jarego odmiany ‘Kargo’
poddanych działaniu niskiej temperatury (mg/g s.m.)
Total protein content in studied organs of seedlings of spring triticale ‘Kargo’ cultivar
exposed to low temperature (mg/g d.m.)

Działanie niskiej temperatury Exposition on low temperature	Liścienie Seed leaves	Węzły krzewienia Propagation joints	Korzenie Roots
Kontrola Control	34,56 a	20,06 b	18,93 b
1 h	26,58 b	16,51 e	14,73 e
6 h	23,74 e	20,89 a	15,19 d
12 h	24,11 d	17,47 d	16,90 c
24 h	24,87 c	19,49 c	19,55 a

Wartości w kolumnach oznaczone innymi literami różnią się istotnie statystycznie przy $P \leq 0,05$ (test Duncana).

Values in the same columns followed by different letters are significantly different at $P \leq 0.05$ (Duncan's test).

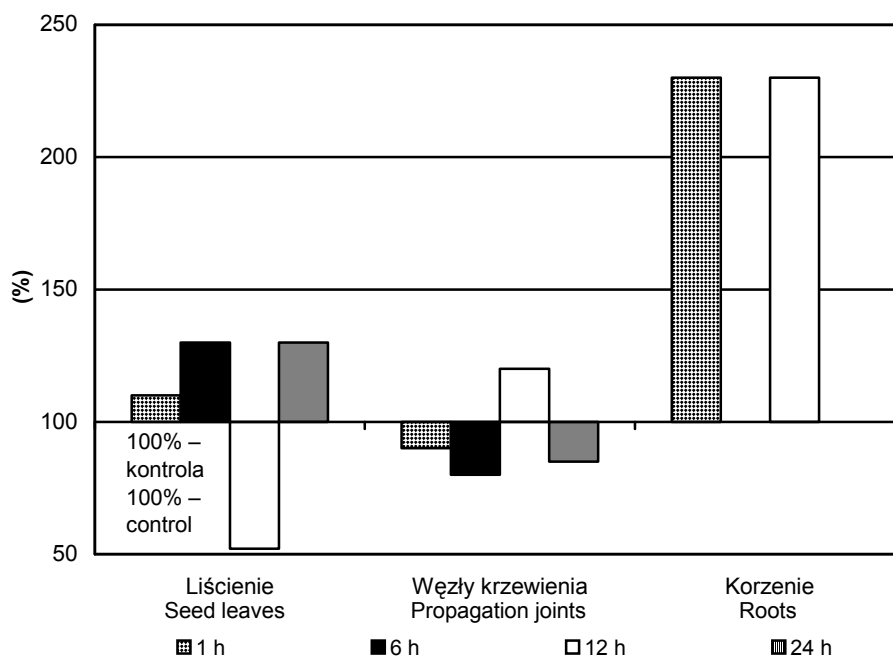


Ryc. 1. Wpływ czasu działania niskiej temperatury na zawartość białka ogólnego w badanych organach siewek pszenżyta jarego odmiany ‘Kargo’

Fig. 1. Influence of the time of low temperature exposition on total protein content in examined organs of spring triticale ‘Kargo’ cultivar

Tabela 2
Zawartość białka rozpuszczalnego w badanych organach siewek pszenżyta jarego odmiany ‘Kargo’ poddanych działaniu niskiej temperatury (mg/g s.m.)
Soluble protein content in studied organs of seedlings of spring triticale ‘Kargo’ cultivar exposed to low temperature (mg/g d.m.)

Działanie niskiej temperatury Exposition on low temperature	Liścienie Seed leaves	Węzły krzewienia Propagation joints	Korzenie Roots
Kontrola Control	9,70 d	11,10 b	5,50 b
1 h	10,20 c	10,20 c	12,60 a
6 h	12,50 b	9,20 e	5,50 b
12 h	5,10 e	13,90 a	12,60 a
24 h	12,60 a	9,70 d	5,50 b



Ryc. 2. Wpływ czasu działania niskiej temperatury na zawartość białka rozpuszczalnego w badanych organach siewek pszenżyta jarego odmiany ‘Kargo’
 Fig. 2. Influence of the time of low temperature exposition on soluble protein content in examined organs of spring triticale ‘Kargo’ cultivar

Wnioski

1. Długość trwania stresu niskotemperaturowego wpływa na zmiany w zawartości białka ogólnego i rozpuszczalnego w testowanych organach siewek pszenżyta jarego odmiany 'Kargo'.

2. W analizowanych organach siewek poddanych działaniu niskiej temperatury występuje istotny statystycznie spadek poziomu białka ogólnego po działaniu chłodu (węzłak – węzły krzewienia po 6 godz. i korzenie po 24 godz.) w stosunku do kontroli.

3. Działanie 12-godzinne chłodu na pszenżyto jare odmiany 'Kargo' powoduje istotny statystycznie spadek stężenia białka rozpuszczalnego w liścieniach, a w węzłach krzewienia jego wzrost w porównaniu z analogicznymi organami roślin kontrolnych. W korzeniach analizowanych siewek istotny wzrost zawartości tej frakcji białka w stosunku do kontroli nastąpił po 1 i 12 godz. chłodzenia.

Literatura

- Grzesiuk S., Login A.** (1974): Mrozoodporność pszenic i jej związek z jakością białek w węzłach krzewienia. *Hod. Rośl. Aklim. Nasienn.* 1: 1-8.
- Guy C.L.** (1990): Cold acclimation and freezing stress tolerance: role of protein metabolism. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 41: 187-223.
- Kacperska A.** (1986): Molekularne podstawy uszkodzeń mrozowych w komórkach roślinnych. *Post. Biol. Komórki* 4: 479-482.
- Kacperska A.** (1997): Odpowiedzi roślin na niską temperaturę: percepcja i translokacja sygnału. Międzynarodowa Konferencja Naukowa: „Ekofizjologiczne aspekty reakcji roślin na działanie czynników stresowych”. Kraków, 12-14 czerwca 1997: 45.
- Kacperska-Palacz A.** (1970): Mrozoodporność roślin – współczesne poglądy na istotę tego zjawiska. *Post. Nauk Roln.* 1/2: 107-119.
- Lasheen A.J., Chaplin C.E., Harmon R.N., Hobbs W.E.** (1970): Biochemical comparison of fruit buds in five peach cultivars of varying degrees of cold hardiness. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 2: 177-181.
- Layne E.** (1957): Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins. *Meth. Enzymol.* 3: 448-450.
- Rapacz M.** (1997): Porównanie ekspresji termostabilnych białek rozpuszczalnych w liściach siewek rzepaku ozimego odmiany Górczański, rosnących w różnych warunkach temperaturowych przed hartowaniem. Międzynarodowa Konferencja Naukowa: „Ekofizjologiczne aspekty reakcji roślin na działanie czynników stresowych”. Kraków, 12-14 czerwca 1997: 102.
- Sikka K.C., Duggal S.K., Sigh R., Gupta D.P., Joshi M.G.** (1978): Comparative nutritive value and amino acid content of triticale, wheat and rye. *J. Agricult. Food Chem.* 4: 788-791.
- Skoczkowski A.** (1997): Zmiany lipidów plazmolemy w nadziemnych częściach roślin pszenicy ozimej rosnących w 5°C oraz podczas aklimatyzacji do 20°C po różnych okresach chłodzenia. Międzynarodowa Konferencja Naukowa: „Ekofizjologiczne aspekty reakcji roślin na działanie czynników stresowych”. Kraków, 12-14 czerwca 1997: 124.
- Skrabka H.** (1992): Sposoby przystosowania się roślin do warunków stresowych. *Roślina a środowisko.* PWN, Warszawa: 26-27.

- Solecka D.** (1994): Udział białek w procesie aklimatyzacji roślin do niskiej temperatury. *Post. Biochem.* 2: 121-124.
- Steponkus P.L., Webb M.S.** (1992): *Water and life. W: Comparative analysis of water relationships at the organismic, cellular and molecular level.* Red. G.N. Somero, C.B. Osmond, C.L. Bdis, Springer, Berlin: 338-362.

CHANGES IN THE CONTENT OF CHOSEN PROTEIN FRACTIONS ISOLATED FROM SPRING TRITICALE SEEDLINGS EXPOSED TO LOW TEMPERATURE

S u m m a r y

The aim of taken research was to determine changes in the content of chosen protein fractions (total protein, soluble protein) isolated from seedlings of spring triticale, exposed to low temperature.

It was shown that in analysed seed leaves of spring triticale 'Kargo' cultivar exposed to low temperature occurs a statistically significant decrease in total protein content, comparing to the control. Similar results were showed by analysing the content of this protein fraction in propagation joints and roots of spring triticale seedlings (exception for propagation joints after 6 h and roots after 24 h of exposition to cold).

Simultaneously a statistically significant increase in soluble protein level in seedlings (exception for 12 h) and propagation joints after 12 h of exposition on low temperature was found, comparing to the control plants. Moreover statistical analysis showed a significant increase in the concentration of this protein fraction in roots of seedlings exposed to coldness after 1 and 12 h, comparing to the control.