

WPLYW TEMPERATURY NA ZAWARTOŚĆ CUKRÓW ROZPUSZCZALNYCH I JAKOŚĆ FIZJOLOGICZNĄ NASION ŁUBINU ŻÓŁTEGO

Agnieszka I. Piotrowicz-Cieślak

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

Wstęp

Temperatura należy do podstawowych czynników warunkujących wzrost i rozwój roślin. Wymagania termiczne roślin są bardzo różnorodne, zależą od organu, fazy rozwojowej i wieku rośliny. Rośliny większości stref klimatycznych są przystosowane do wzrostu w warunkach periodycznych zmian temperatury wywołanych różnicami temperatury nocy i dnia. Zakres temperatur, które rośliny tolerują jest zwykle ograniczony przez temperaturę górną, w której zachodzi koagulacja białek i dolną, w której komórki ulegają przeschłodzeniu. Wysoka temperatura jest czynnikiem wyraźnie ograniczającym uprawę łubinów, szczególnie w basenie morza śródziemnego [GLADSTONES 1998]. Wymagania termiczne łubinów uprawianych w Polsce nie są duże. Łubin żółty kiełkuje w temperaturze 4–5°C i znosi przymrozki do –8°C [JASIŃSKA, KOTECKI 1999].

Wszystkie organizmy, zarówno roślinne jak i zwierzęce reagują na wzrost temperatur uszkodzeniem błon biologicznych i niekorzystnymi zmianami w obrębie struktury białek. Następuje synteza zestawu specyficznych białek (HSP), równocześnie rośliny ograniczają poziom białek typowych [PARSELL, LINDQUIST 1993; PORANKIWICZ, GWÓZDŹ 1995]. Szczególnie dużą termowrażliwością cechuje się plazmalemma, cytoskielet i jądro komórkowe [CZARNECKA-VERNER i in. 1995]. Wpływ temperatury na akumulację oligosacharydów, cyklitolu i galaktozylocyklitolu nie jest poznany. Skład chemiczny nasion jest regulowany przez czynniki genetyczne, w dużej mierze jednak jest modyfikowany przez klimat [BOYER 1982]. Węglowodany uważane są za składniki komórki, które podlegają najmniejszym zmianom ilościowym i jakościowym pod wpływem czynników środowiska [SZARAPOW 1989].

Celem pracy było określenie wpływu temperatury na zawartość oligosacharydów, cyklitolu i galaktozylocyklitolu w nasionach łubinu żółtego odmiany Teo.

Material i metody

Doświadczenie przeprowadzono w Katedrze Fizjologii i Biotechnologii Roślin Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie. Rośliny łubinu żółte-

go (*Lupinus luteus* L.) odmiany Teo uprawiano w komorach klimatycznych w wazonach zawierających 4 kg ziemi średniozwięzłej. Do każdego wazonu wysiewano 7 nasion. Do momentu zakwitnięcia roślin w komorze klimatycznej zastosowano temperaturę w ciągu dnia 22°C i w ciągu nocy 15°C. Długość dnia wynosiła 12 godzin. Po zakwitnięciu roślin zastosowano temperaturę 15, 20 i 28°C w ciągu dnia i nocy. Długość dnia i nocy pozostawała niezmienną. Nasiona zbierano w fazie pełnej dojrzałości fizjologicznej i określono w nich zawartość cukrów rozpuszczalnych oraz ich wigor i żywotność [AOSA 1993].

Zawartość cukrów rozpuszczalnych oznaczano w całych nasionach. Do materiału roślinnego stanowiącego ok. 30 mg tkanki dodawano 2 ml etanolu 50% (v/v) oraz 100 µg standardu wewnętrznego – fenylo- α -D-glukopiranozydu (1 mg fenylo- α -D-glukopiranozydu w 1 ml 50% etanolu). Całość homogenizowano w móżdzierzu porcelanowym i przenoszono do probówek Eppendorfa (2,5 ml). Próby ogrzewano w temp. 75°C celem dezaktywacji białek enzymatycznych. Ekstrakty schładzano do temperatury pokojowej i wirowano w mikrowirówce (typ MPW-365, 16 000 g, 20 min). Około 500 µl supernatantu przenoszono do filtrów Micro-Spin (0,2 µm, Nylon, 10 000 WM) firmy Lida (Kenosha, USA) i ponownie wirowano jak wyżej. Klarowny przesącz (około 200 µl) przenoszono do naczyń silylacyjnych i zagęszczano do sucha w strumieniu azotu. Wolną od wody próbę silylanizowano 200 µl mieszaniny silylacyjnej, składającej się z trimetyloimidazol : pirydyna (1 : 1, v/v) w temperaturze 70°C przez 40 min. Analizy cukrów rozpuszczalnych (w 1 µl próby) przeprowadzano drogą chromatografii gazowej. Chromatograf (GC-14A Shimadzu) wyposażony był w kolumnę SPB-1 (15 m x 0,53 mm, 0,5 µm film: firma Supelco) i detektor płomieniowo-jonizacyjny. Rozdział pochodnych cukrów prowadzono stosując następujące parametry: temperatura początkowa 150°C, wzrost temperatury do 200°C (wzrost o 3°C w czasie 1 min), wzrost temperatury do 325°C (wzrost o 7°C w czasie 1 min), temperatura końcowa 325°C utrzymująca się przez 40 min, temperatura iniektora 335°C, detektora 350°C, gaz nośny (hel) o prędkości przepływu 3 ml w ciągu 1 min, detektor zaopatrywany w wodór o prędkości przepływu 20 ml w ciągu 1 min, powietrze o prędkości przepływu 200 ml w ciągu 1 min.

Identyfikację oligosacharydów rodziny rafinozy, cyklitolu i glaktozylocyklitolu przeprowadzono na podstawie standardów, zaś ich zawartości obliczano ze stosunku powierzchni piku badanego związku do powierzchni standardu wewnętrznego, uwzględniając równania regresji wyznaczone dla każdego wzorca.

Wyniki i dyskusja

Zdolność kiełkowania oraz niektóre parametry wigoru (elektroprzewodnictwo eksudatów nasiennych, szybkość kiełkowania i długość korzenia zarodkowego) nasion łubinu żółtego przedstawiono w tabeli 1. Nasiona bez względu na temperaturę w której były uprawiane charakteryzowały się dużą zdolnością do kiełkowania. Temperatura również nie wpływała na wigor nasion, jedynie nieco wyższe elektroprzewodnictwo wykazywały nasiona pochodzące z roślin uprawianych w temperaturze 28°C. Zaobserwowano ogólną tendencję skracania czasu uzyskiwania przez nasiona dojrzałości fizjologicznej przy temperaturach najwyższych. Rośliny wyrosłe w temperaturze 15°C, potrzebowały na uzyskanie pełnej dojrzałości fizjologicznej około 90 dni. Rośliny uprawiane w temperaturze 28°C

od chwili zakwitnięcia do wykształcenia nasion o pełnej dojrzałości fizjologicznej potrzebowały 35 dni. Temperatura jest czynnikiem wyraźnie regulującym długość wegetacji roślin łąbinu [PERRY i in. 1998]. Rośliny dojrzewające w temperaturze 15°C charakteryzowały się dużo większą masą nasion niż nasiona roślin uprawianych w temperaturze 28°C (świeża masa tych nasion wynosiła odpowiednio 230, 193 mg – tab. 2). Podobne tendencje wpływu temperatury na akumulację suchej masy nasion były obserwowane w nasionach łąbinu białego [CLAPHAM, WILLCOTT 1994].

Tabela 1; Table 1

Zdolność kiełkowania, szybkość kiełkowania, długość korzenia zarodkowego i elektroprowadnictwa nasion łąbinu żółtego (średnia z trzech powtórzeń ± SD)

Germination capacity, germination rate, radicle length and conductivity in yellow lupin seeds (data are the means of three replicates ± standard deviation)

Temperatura; Temperature	15°C	20°C	28°C
Zdolność kiełkowania; Germination capacity (%)	96 ± 2	96 ± 2	95 ± 2
Szybkość kiełkowania; Germination rate (%)	76 ± 4	88 ± 2	71 ± 2
Długość korzenia zarodkowego; Radicle length (mm)	86 ± 6	120 ± 11	58 ± 9
Elektroprowadnictwo; Conductivity (µS x100 seeds)	242 ± 23	241 ± 32	267 ± 29

Tabela 2; Table 2

Zawartość cukrów rozpuszczalnych w nasionach łąbinu żółtego (średnia z trzech powtórzeń ± SD)

The content of soluble carbohydrates in yellow lupin seeds (Data are the means of three replicates ± standard deviation)

Cukry rozpuszczalne Soluble carbohydrates (mg·g ⁻¹)	15°C	20°C	28°C
Fruktoza; Fructose	0,63 ± 0,07	0,73 ± 0,19	0,52 ± 0,28
Sacharoza; Sucrose	23,25 ± 4,25	21,48 ± 1,73	24,29 ± 2,35
Cyklitole; Cyclitols			
D-pinitol; D-pinitol	0,23 ± 0,06	0,73 ± 0,20	0,75 ± 0,22
D-chiro-inozytol; D-chiro-inozytol	2,45 ± 0,56	4,02 ± 0,52	4,23 ± 0,29
Myo-inozytol; Myo-inozytol	2,76 ± 0,87	6,11 ± 0,51	7,23 ± 1,39
Galaktozylocyklitole; Galactosyl cyclitols			
Fagopyrytol B1; Fagopyrytol B1	5,64 ± 0,74	7,03 ± 1,13	7,86 ± 0,97
Galaktinol; Galactinol	7,75 ± 1,04	7,56 ± 0,34	8,93 ± 1,24
Ciceritol; Ciceritol	12,45 ± 2,06	14,89 ± 0,45	16,35 ± 0,87
Fagopyrytol B2; Fagopyrytol B2	7,34 ± 1,45	8,77 ± 1,98	9,46 ± 2,24
Digalacto-myo-inozytol; Digalacto-myo-inozytol	3,87 ± 4,25	3,57 ± 1,26	4,76 ± 0,18
Trigalaktopinitol; Trigalactopinitol	0 ± 0	2,56 ± 1,05	4,37 ± 1,24
Oligosacharydy rodziny rafinozy; Raffinose family oligosaccharides			
Rafinoza; Raffinose	10,67 ± 0,57	10,60 ± 1,48	9,42 ± 2,43
Stachioza; Stachyose	67,34 ± 4,22	59,4 ± 1,60	52,63 ± 1,98
Werbaskoza; Verbascose	52,3 ± 0,37	50,8 ± 2,94	43,89 ± 5,53
Suma RFO; Sum of RFO	130,3	120,8	105,9
Suma cukrów rozpuszcz.; Sum of soluble carbohydrates	196,6	198,2	194,6
Suma galaktozylocyklitol; Sum of galactosyl cyclitols	36,99	44,3	51,7
Masa nasienia; Fresh mass (mg)	230	210	192

W nasionach łubinów dojrzewających w temperaturze 15, 20 i 28°C stwierdzono obecność następujących cukrów rozpuszczalnych (tab. 2):

I. polioli: D-pinitol (3-*l*-metyl D-*chiro*-inositol), D-*chiro*-inositol, *myo*-inositol

II. galaktozylocyklitolii:

1. **seria *myo*-inositolu** – galactinol (*l*- α -D-galaktopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-D-*myo*-inositol), digalacto-*myo*-inositol (*l*- α -D-galaktopyranosyl-(1 \rightarrow 6)-*l*- α -D-galaktopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-D-*myo*-inositol)
2. **seria pinitolu A** – ciceritol (*l*- α -D-galaktopyranosyl-(1 \rightarrow 6)-*l*- α -D-galaktopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-4-*l*-metyl-D-*chiro*-inositol), trigalactopinitol (*l*- α -D-galaktopyranosyl-(1 \rightarrow 6)-*l*- α -D-galaktopyranosyl-(1 \rightarrow 6)-*l*- α -D-galaktopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-4-*l*-metyl-D-*chiro*-inositol)
3. **seria *chiro*-inositolu** – galacto-*chiro*-inositol (fagopyrytol B1, *l*- α -D-galaktopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-D-*chiro*-inositol), digalacto-*chiro*-inositol (fagopyrytol B2, *l*- α -D-galaktopyranosyl-(1 \rightarrow 6)-*l*- α -D-galaktopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-D-*chiro*-inositol), trigalactopinitol B (*l*- α -D-galaktopyranosyl-(1 \rightarrow 6)-*l*- α -D-galaktopyranosyl-(1 \rightarrow 6)-*l*- α -D-galaktopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-3-*l*-metyl-D-*chiro*-inositol).

III. oligosacharydów rodziny rafinozy

IV. fruktozy

V. sacharozy

Oligosacharydy rodziny rafinozy (rafinoza, stachioza i werbaskoza) stanowiły zasadniczy komponent cukrów rozpuszczalnych w nasionach. Taka prawidłowość obserwowana była również w nasionach innych łubinów [PIOTROWICZ-CIEŚLAK i in. 1999]. Stachioza bez względu na temperaturę dojrzewania była dominującym węglowodanem rozpuszczalnym i jej zawartość wynosiła 67,3; 59,4 i 52,6 mg·g⁻¹ odpowiednio dla nasion wyrosłych w temperaturze 15, 20 i 28°C. Nasiona pochodzące z uprawy w temperaturze 15°C syntetyzowały 130 mg·g⁻¹ oligosacharydów rodziny rafinozy, suma zakumulowanych galaktozylocyklitolii w tych nasionach wynosiła 37 mg·g⁻¹. W nasionach uprawianych w temperaturze 28°C, poziom zawartości oligosacharydów rodziny rafinozy znacząco zmalał w odniesieniu do nasion dojrzewających w temp. 15°C i wynosił 106 mg·g⁻¹, istotnie wzrastała natomiast synteza galaktozylocyklitolii i ich zawartość była na poziomie 52 mg·g⁻¹. Wśród galaktozylocyklitolii wzmoczoną syntezą charakteryzowały się galaktozylocyklitole serii D- pinitolu. Zawartość tych składników wzrosła o 6% w porównaniu do nasion dojrzewających w temperaturze 15°C. Gromadzenie galaktozylocyklitolii serii D-pinitolu było obserwowane u roślin tropikalnych w odpowiedzi na stres cieplny [BEVERIDGE i in. 1977; GANTER i in. 1991]. Wzrost zawartości cyklitolii i ich galaktozylowych pochodnych był często obserwowany w warunkach odpowiedzi na stres wodny oraz wysokiej i niskiej temperatury [KELLER, LUDLOW 1993; BOHNER i in. 1995; POPP i in. 1997].

Literatura

AOSA 1993 (Association of Official Seed Analysts). *Seed Vigour Testing Handbook*. Contribution No 32 to the handbook on seed testing.

- BEVERIDGE R.J., FORD C.W., RICHARDS G.N. 1977. *Polysaccharides of tropical pasture herbage*. Aust. J. Chem. 30: 1583–1590.
- BOHNERT H.J., NELSON D.E., JENSEN R.G. 1995. *Adaptations to environmental stresses*. The Plant Cell 7: 1099–1111.
- BOYER J.S. 1982. *Plant productivity and environment*. Science 218: 443–448.
- CLAPHAM W.M., WILLCOTT J.B. 1994. *Effect of temperature at maturation on yield, phenological development, and subsequent generations of lupins*. Agron. Abs. 1994: 174.
- CZARNECKA-VERNER E., YUAN C.X., FOX P.C., GURLEY W.B. 1995. *Isolation and characterization of six heat shock transcription factor cDNA clones from soybean*. Plant Mol. Biol. 29: 37–51.
- GANTER J.L.M.S., CORREA J., REICHER F., HEYRAUD A., RINAUDO M. 1991. *Low molecular weight carbohydrates from Mimosa scabrella seeds*. Plant Physiol. Biochem. 29: 139–146.
- GLADSTONES J.S. 1998. *Distribution, Origin, Taxonomy, History and Importance, in: Lupin as Crop Plants: Biology, Production, Utilisation*. J.S. Gladstones, C.A. Atkins, J. Hamblin (Eds.): 1–41.
- JASIŃSKA Z., KOTECKI A. 1999. *Łubin, w: Szczegółowa Uprawa Roślin*. Z. Jasińska, K. Kotecki (red.): 23–44.
- KELLER F., LUDLOW M.M. 1993. *Carbohydrates metabolism in drought-stressed leaves of pigeonpea (Cajanus cajan)*. J. Exp. Bot. 44: 1351–1359.
- PARSELL D.A., LINDQUIST S. 1993. *The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of proteins*. Annu. Rev. Genet. 27: 437–496.
- PERRY W.M., DRACUP M., NELSON P., JARVIS R., ROWLAND I., FRENCH R.J. 1998. *Agronomy and Farming System, in: Lupin as Crop Plants: Biology, Production, Utilisation*. J.S. Gladstones, C.A. Atkins, J. Hamblin (Eds.): 291–338.
- PIOTROWICZ-CIEŚLAK A.I., GÓRECKI R.J., ADOMAS B. 1999. *The content and composition of soluble carbohydrates in lupin seeds of different species and cultivars*. Plant Breed. Seed Sci. 43: 29–37.
- POPP M., LIED W., BIERBAUM U., GROSS M., GROSE-SCHULTE T., HAMS S., OLDENNETTEL J., SCHULER S., WIESE J. 1997. *Cyclitols-stable osmotica in trees, in: Trees – Contributions to Modern Tree Physiology*: 257–270.
- PORANKIWICZ J., GWÓZDŹ E.A. 1995. *Protein synthesis in lupin roots exposed to heat shock*. Acta Physiol. Plant. 17: 47–54.
- SZARAPOW N. 1989. *Chemizm roślin a klimat*. PWRiL Warszawa.

Słowa kluczowe: nasiona, łubin żółty, temperatura, cukry rozpuszczalne

Streszczenie

Rośliny uprawiano w fitotronie w temperaturach 15°C, 20°C i 28°C przy 12 godzinnej długości dnia. W pełnej dojrzałości fizjologicznej nasiona były zebrane i określono w nich zawartość oligosacharydów rodziny rafinozy, galaktozylocykli-

toli i cyklitoli. Stachioza była cukrem dominującym bez względu na temperaturę dojrzewania. Nasiona dojrzewające temp. 15°C miały większą masę, niż nasiona uprawiane w temp. 28°C. Temperatura modyfikowała gromadzenie oligosacharydów rodziny rafinozy. Nasiona uprawiane w temp. 28°C gromadziły znaczące ilości galaktozylocyklitoli serii D-pinitolu. Nasiona dojrzewające w temp. 28°C charakteryzowały się wzmożoną syntezą wyższych galaktozylooligomerów, tj. ciceritolu, digalacto-*myo*-inositolu.

THE EFFECT OF TEMPERATURE STRESS ON THE CONTENT OF SOLUBLE SUGARS AND PHYSIOLOGICAL QUALITY OF MATURE YELLOW LUPIN SEEDS

Agnieszka I. Piotrowicz-Cieślak

Department of Plant Physiology and Biotechnology,
University of Warmia and Mazuria, Olsztyn

Key words: seeds, yellow lupin, temperature, soluble sugars

Summary

The plants were cultivated in phytotrone at 15°C, 20°C and 28°C with 12 hour illumination. Seeds being in full physiological maturity were collected and the levels of oligosaccharides of raffinose family, galactosyl cyclitols and cyclitols were estimated. Stachyose was a dominant oligosaccharide regardless the ripening temperature of the seeds. The seeds ripening at 15°C had a much bigger mass of the seed than the plants grown at 28°C. The temperature also modified the accumulation of raffinose family oligosaccharides. The seeds grown at 28°C accumulated significant amounts of galactosyl cyclitols of D-pinitol series. Seeds maturation at 28°C also favored accumulation of higher galactosyl oligomers (ciceritol, digalacto-*myo*-inositol).

Dr Agnieszka **Piotrowicz-Cieślak**
Katedra Fizjologii i Biotechnologii Roślin
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski
ul. Plac Łódzki 3
10-718 OLSZTYN