

WPLYW ZRÓŻNICOWANYCH WARUNKÓW TERMICZNYCH NA AKUMULACJĘ WĘGLOWODANÓW ROZPUSZCZALNYCH W DOJRZEWAJĄCYCH NASIONACH WYKI DROBNOKWIATOWEJ (*Vicia hirsuta* (L.) S. F. GRAY)¹

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

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

Wstęp

Skład chemiczny nasion, choć zdeterminowany genetycznie może ulegać silnym modyfikacjom pod wpływem różnorodnych czynników środowiskowych [HEDLEY 2001]. Stresy abiotyczne w pierwszej kolejności oddziałują na organy vegetatywne, w następstwie zaburzeniom ulega dystrybucja fotoasymilatów w obrębie całych roślin [ZAMSKI, SCHAFFER 1996]. Nie wiadomo, w jakim stopniu zmienia się zaopatrzenie zarodka w związki odżywcze. Niekorzystne czynniki środowiskowe, takie jak: susza, niskie lub wysokie temperatury powietrza prowadzą do zmian zarówno w plonie roślin, jak też w jakości fizjologicznej nasion i ich składzie chemicznym [LACHUTA i in. 1999; GÓRECKI 2001]. W nasionach roślin strączkowych powszechnie gromadzone są oligosacharydy rodziny rafinozy (RFO). Jako związki zapasowe są wykorzystywane w pierwszych godzinach kiełkowania [BAU i in. 1997; LAHUTA i in. 1998]. Zawartość RFO waha się od kilku do kilkunastu procent suchej masy nasion [HORBOWICZ, OBENDORF 1994]. Zwiększoną akumulację RFO obserwuje się w nasionach poddawanych naturalnej, lub wymuszonej desykcji [OBENDORF 1997]. RFO należą do związków antyżywniowych, ograniczających możliwości wykorzystania nasion w diecie człowieka i zwierząt gospodarskich [KOZŁOWSKA 2001]. Zrozumiałe jest więc dążenie hodowców do ich eliminacji z nasion. Z drugiej jednak strony mogą chronić tkanki nasion przed uszkodzeniami wywołwanymi stresami abiotycznymi, związanymi z dehydratacją komórek [OBENDORF 1997]. Dążenie więc do pełnego poznania ich fizjologicznych funkcji w nasionach wydaje się uzasadnione.

Celem przeprowadzonych badań było określenie wpływu zróżnicowanych warunków termicznych podczas wegetacji roślin na dynamikę akumulacji i końcową zawartość cukrowców rozpuszczalnych w nasionach wyki drobnokwiatowej *Vicia hirsuta* (L.) S. F. GRAY.

Materiał i metody

Dwuletnie (2000–2001) doświadczenia przeprowadzono na rozwijających się nasionach pobieranych z roślin uprawianych w 6-ciu wariantach temperaturo-

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

wych. Rośliny uprawiano w szklarni (przy 16-godzinnyim fotoperiodzie) w kontrolowanych warunkach temperaturowych: 14–18, 20–25, 25–30 i 30–35°C podczas dnia (temperatury nocą były niższe o 4–6°C). Przeprowadzono również dwa doświadczenia polowe. W pierwszym z nich rośliny wysiewano na poletkach doświadczalnych na początku maja, w drugim – na początku sierpnia. Średnie dzienne temperatury powietrza podczas rozwoju generatywnego wyki w tych doświadczeniach wynosiły odpowiednio: 18–20°C i 5–10°C. W tabeli 1 przedstawiono wpływ zróżnicowanych warunków termicznych na długość embriogenezy i końcową masę dojrzałych nasion wyki. Próby nasion pobierano w odstępach 2–4-dniowych, począwszy od 10 dnia po kwitnieniu (DPK), do pełnej dojrzałości nasion (zawartość suchej masy > 90%). W każdej próbie oznaczano świeżą i suchą masę nasion oraz zawartość wody. Trzy partie nasion (po 20–30 sztuk każda) ważono bezpośrednio po izolacji ze strąków, poddawano 2-minutowemu działaniu mikrofal (moc 300 wat, w celu dezaktywacji enzymów), a następnie suszono w suszarce nawiewowej przez 24 godziny w temperaturze 80°C. Zawartość wody określano jako różnicę pomiędzy świeżą i suchą (po 24 godzinnym suszeniu) masą nasion. W wysuszonych nasionach oznaczano zawartość cukrowców rozpuszczalnych metodą chromatografii gazowej [wg GÓRECKIEGO i in. 1997]. Zdolność nasion do kiełkowania oznaczano zgodnie z normami ISTA [1996]. Z każdego terminu zbioru wybierano losowo trzy partie nasion (po 30 sztuk każda). Nasiona poddawano skaryfikacji przy użyciu igły preparacyjnej i umieszczano na wilgotnej bibule w szalkach Petriego. Po 14 dniach inkubacji w temperaturze 20°C (w ciemności) liczono ilość skielkowanych nasion, przyjmując za kryterium kiełkowania przebiecie przez korzeń zarodkowy okrywy nasiennej.

Wyniki

Zróżnicowane warunki termiczne zmodyfikowały długość rozwoju i dojrzewania nasion. Na roślinach rosnących w temperaturach 18–20 i 20–25°C nasiona osiągały pełną dojrzałość w 22–24 DPK. Temperatury 25–30°C skróciły dojrzewanie nasion do 20 dni, natomiast 30–35°C – do 18 dni (tab. 1).

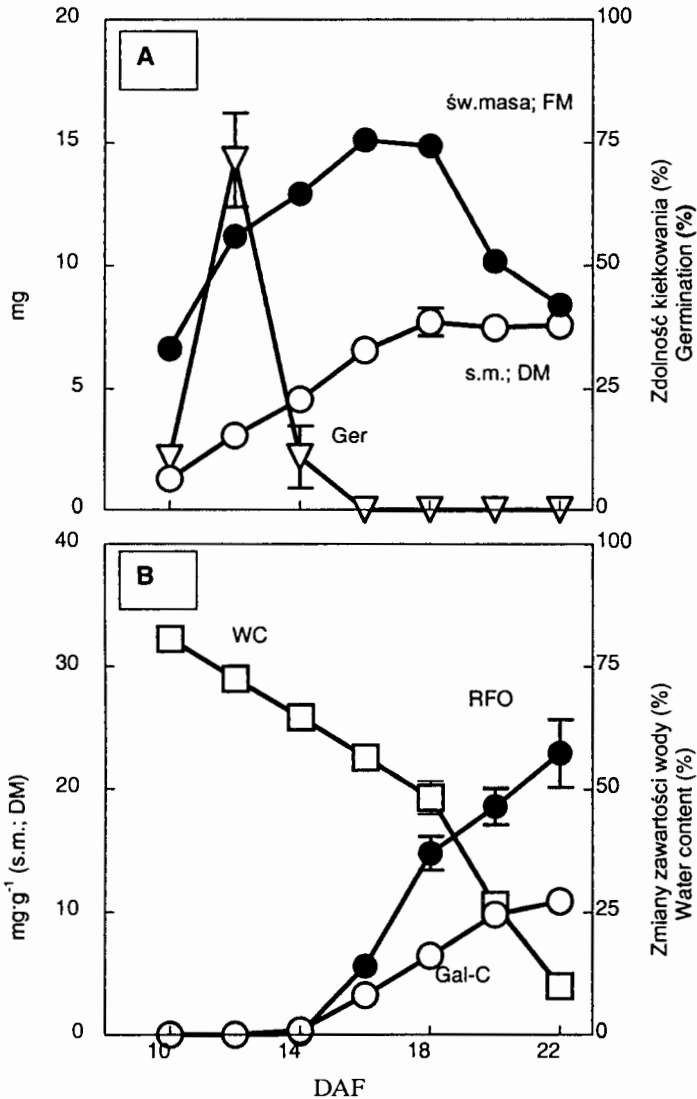
Tabela 1; Table 1

Wpływ zróżnicowanych warunków temperaturowych na długość embriogenezy i końcową masę dojrzałych nasion wyki drobnokwiatowej (*Vicia hirsuta* (L.) S. F. GRAY)

The effect of different temperatures on duration of embryogenesis and final fresh mass of mature seeds of *Vicia hirsuta* (L.) S. F. GRAY

Wyszczególnienie Specification	Doświadczenia szklarniowe Experiments in greenhouse				Doświadczenia polowe Field experiments	
	14–18	20–25	25–30	30–35	18–20	5–10
Temperatura (°C) Temperature (°C)						
Masa nasienia (mg)* Seed fresh mass (mg)*	7,78±0,11	7,57±0,03	7,17±0,09	7,16±0,02	7,27±0,07	5,02±0,01
Długość embriogenezy (dni); Duration of embryogenesis (days)	36	22	20	18	24	72

* – wartości średnie z trzech powtórzeń ± średni błąd standardowy; means ± SE (n = 3)



Rys 1. A. Akumulacja świeżej (św.m.) i suchej masy (s.m.) oraz zmiany zdolności do kiełkowania (Ger) dojrzewających nasion wyki drobnokwiatowej (*Vicia hirsuta* (L.) S. F. GRAY) począwszy od 10 dnia po kwitnieniu (DAF). Wartości średnie z trzech powtórzeń \pm błąd standardowy (SE); B. Akumulacja RFO i Gal-C i zmiany zawartości wody (WC) w dojrzewających nasionach wyki drobnokwiatowej (*Vicia hirsuta* (L.) S. F. GRAY). Wartości średnie z trzech powtórzeń \pm błąd standardowy (SE)

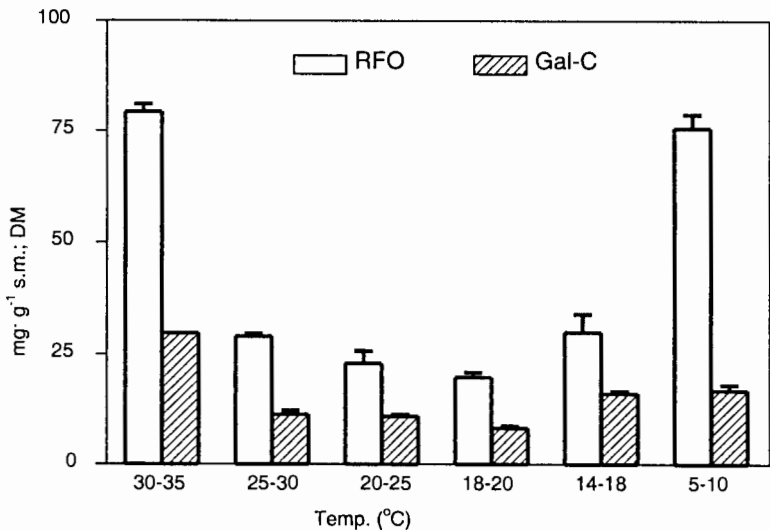
Fig. 1. A. Accumulation of fresh matter (FM) and dry matter (DM) and changes in germinability (Ger) of developing *Vicia hirsuta* seeds, beginning from the 10th day after flowering (DAF). Means \pm SE (n = 3); B. Changes in RFO, Gal-C and water content (WC) in developing *Vicia hirsuta* seeds. Means \pm SE (n = 3)

Niskie temperatury powietrza sprzyjały wydłużonej wegetacji roślin, nasiona dojrzewały od 36 do 72 dni (w 14–18 i 5–10°C, odpowiednio). W konsekwencji

dojrzałe nasiona różniły się końcową masą: od 5,02 mg/nasienie (nasiona z roślin rosnących w 5–10°C) do 7,78 mg (w 14–18°C). Średnia masa nasion dojrzewających w temperaturach 18–20 i 20–25°C wynosiła 7,42 mg, natomiast w warunkach wysokich temperatur (25–30 i 30–35°C) – 7,16 mg.

Niezależnie od warunków termicznych obserwowano jednakowy przebieg akumulacji świeżej i suchej masy, kształtowania się zdolności nasion do kiełkowania oraz kolejności akumulacji RFO i galaktozylocyklitolu (Gal-C). Przy 22–24 dniowej embriogenezie (w temp. 20–25°C) faza histodyferencjacji zarodka kończyła się ok. 10 DPK, przez kolejne 6–8 dni dominował intensywny wzrost liścieni i akumulacja suchej masy. Od 18–20 DPK nasiona zaczynały tracić wodę (rys. 1A). Temperatury niskie (14–18, 5–10°C) wydłużały okres wzrostu nasion i opóźniały ich naturalne odwadnianie. Temperatury wysokie (25–30 i 30–35°C) przeciwnie – skracaly okres wzrostu zarodka i przyspieszały desykcję nasion.

Stosunkowo wcześniej – w 12 DPK – rozwijające się nasiona uzyskiwały wysoką (75%) zdolność do kiełkowania (rys. 1A). Wraz z osiągnięciem maksymalnej świeżej masy nasiona wchodziły w stan głębokiego spoczynku. Identyczny przebieg we wczesnym uzyskiwaniu wysokiej zdolności do kiełkowania a następnie wykształcaniu się głębokiego spoczynku obserwowano w nasionach z wszystkich wariantów temperaturowych, za wyjątkiem temperatur najniższych (5–10°C). Nasiona pobierane z roślin rosnących w warunkach chłodu nie były zdolne do kiełkowania.



Rys 2. Zawartość RFO i Gal-C w nasionach wyki drobnokwiatowej dojrzewających w zróżnicowanych warunkach termicznych. Wartości średnie z trzech powtórzeń \pm błąd standardowy (SE)

Fig. 2. The content of RFO and Gal-C in mature seeds of *Vicia hirsuta* in relation to different temperature conditions during seed development and maturation. Means \pm SE (n = 3)

Głównymi cukrowcami rozpuszczalnymi dojrzałych nasion wyki były: sacharoza, oligosacharydy rodziny rafinozy (RFO) i galaktozylocyklitole (Gal-C). Aku-

mulacja oligosacharydów rozpoczynała się podczas uzyskiwania przez nasiona najwyższej świeżej masy, lecz najintensywniej przebiegała pod koniec dojrzwania – gdy nasiona zaczynały tracić wodę (rys. 1B). W akumulacji RFO dominowała synteza werbaskozy, poprzedzona okresowym zwiększeniem się zawartości rafinozy i stachiozy. W grupie galaktozylocyklitolu zidentyfikowano dwie serie α -D-galaktozydów D-pinitolu: mono-, di- i trigalaktopinitole serii A i serii B, przy czym dominowały galaktopinitole serii A. Zawartość tych związków podczas dojrzwania nasion była wielokrotnie niższa niż RFO. Zasadniczy wzrost poziomu galaktopinitoli, podobnie jak RFO, wiązał się z fazą naturalnej desykcji nasion (rys. 1A i B). Nasiona dojrzewające w skrajnych warunkach termicznych (5–10 i 30–35°C) gromadziły 3,5-krotnie więcej RFO, niż nasiona dojrzewające w temperaturach: 14–18, 18–20, 20–25 i 25–30°C. Wysoka temperatura (30–35°C) 3-krotnie zwiększała zawartość Gal-C (rys. 2). Wzrost poziomu RFO wiązał się z intensywną akumulacją werbaskozy, natomiast Gal-C – ze wzmożonym gromadzeniem mono- i digalaktopinitolu A.

Dyskusja

Nasiona roślin strączkowych w odpowiedzi na wysoką temperaturę, lub suszę glebową, reagują zwiększeniem zawartości RFO [GUO, OOSTERHUIS 1995; GÓRECKI i in. 2000; LAHUTA i in. 2000; ZALEWSKI i in. 2001] lub galaktozylocyklitolu [GÓRECKI i in. 1996]. Zwiększona zawartość RFO pozytywnie koreluje z odpornością tkanek na dchhydratację [OBENDORF 1997]. W badaniach własnych wysokie temperatury (30–35°C), a w konsekwencji przyspieszone i szybkie odwadnianie nasion sprzyjało ponad 3-krotnemu zwiększeniu się zawartości RFO i Gal-C, co wskazuje na potencjalne ochronne funkcje badanych galaktozydów. Z drugiej strony może wiązać się z unieczynnianiem dopływających do nasion związków odżywczych w formę oligosacharydów nieredukujących. Równie silny wzrost RFO w nasionach dojrzewających w warunkach chłodu (5–10°C) można tłumaczyć działaniem osmoprotekcyjnym RFO na tkanki [BACHMANN i in. 1994]. W tkankach wegetatywnych RFO uczestniczą w ich adaptacji do chłodu [HINESLEY i in. 1992; BACHMANN i in. 1994]. W nasionach chłód podwyższa aktywność syntazy galaktinowej (enzymu odpowiedzialnego za powstawanie galaktinolu i pierwsze etapy syntezy RFO), co może prowadzić do zwiększenia natężenia syntezy RFO [CASTILLO i in. 1990].

Zaobserwowana zbieżność w nasileniu akumulacji RFO i Gal-C w warunkach wysokich i niskich temperatur sugeruje istnienie wspólnego czynnika stymulującego akumulację α -D-galaktozydów. Rozpoczęcie syntezy RFO i Gal-C zbiegało się z wchodzeniem nasion w głęboki spoczynek. Zabieg skaryfikacji nasion przeprowadzany bezpośrednio po ich zbiorze umożliwiał wnikanie do nasion wody, lecz nie przerywał ich spoczynku. Przyczyn uśpienia nasion należałoby więc szukać w obecności inhibitorów wzrostu. Brak analiz poziomu endogennego kwasu abscyzynowego (ABA) w nasionach wyki, nie pozwala odpowiedzieć na pytanie, czy ten inhibitor stymulował syntezę RFO i Gal-C. W świetle doniesień z ostatnich lat [PERATA i in. 1990; SKRIVER, MUNDY 1990], potwierdzających współudział ABA w odpowiedzi tkanek na stresy abiotyczne, wydaje się to możliwe i wymaga przeprowadzenia dalszych badań.

Literatura

- BACHMANN M., MATILE P., KELLER F. 1994. *Metabolism of the raffinose family oligosaccharides in leaves of *Ajuga reptans* L.* Plant Physiology 105: 1335–1345.
- BAU H.M., VILLAUME C., NICOLAS J.P., MEJEAN L. 1997. *Effect of germination on chemical composition, biochemical constituents and antinutritional factors of soya bean (*Glycine max*) seeds.* Journal of Science of Food and Agriculture 73: 1–9.
- CASTILLO E.M., DE LUMEN B.O., REYES P.S., DE LUMEN H.Z. 1990. *Raffinose synthase and galactinol synthase in developing seeds and leaves of legumes.* Journal of Agricultural and Food Chemistry 38: 351–355.
- GÓRECKI R.J., BRENEAC P.B., CLAPHAM W.M., WILLCOTT J.B., OBENDORF R.L. 1996. *Soluble carbohydrates in white lupin seeds matured at 13 and 28°C.* Crop Science 36: 1277–1282.
- 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., LAHUTA L.B., HEDLEY C., JONES A. 2000. *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.
- GÓRECKI R.J. 2001. *Seed physiology and biochemistry*, in: *Carbohydrates in Legume Seeds*. CAB International, C.L. Hedley (Ed.): 117–144.
- GUO C., OOSTERHUIS D.M. 1995. *Pinitol occurrence in soybean plants as affected by temperature and plant growth regulators.* Journal of Experimental Botany 46: 249–253.
- HEDLEY C.L. 2001. *Introduction*, in: *Carbohydrates in Grain Legume Seeds*. CAB International, C.L. Hedley (Ed.): 1–14.
- HINESLEY L.E., PHARR D.M., SNELLING L.K., FUNDERBURK S.R. 1992. *Foliar raffinose and sucrose in four conifer species: relationship with seasonal temperature.* Journal of American Society of Horticulture Science 117: 852–855.
- 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.
- ISTA (International Seed Testing Association) 1996. *International rules for seed testing. Seed Science and Technology* 24, Supplement.
- KOZŁOWSKA H. 2001. *Nutrition*, in: *Carbohydrates in Grain Legume Seeds*. CAB International, C.L. Hedley (Ed.): 61–88.
- LAHUTA L.B., JAGIELSKA T., GÓRECKI R.J., JONES A., HEDLEY C. 1998. *Soluble sugars in desiccation tolerance of germinating pea seeds of different isolines.* AEP 3th European Conference on Grain Legumes, Valladolid, Spain: 40–41.
- LAHUTA L.B., GÓRECKI R.J., HEDLEY C., JAGIELSKA T. 1999. *Wpływ stresu suszy glebowej we wczesnej embriogenezie grochu na zawartość i skład cukrów rozpuszczalnych oraz jakość fizjologiczną nasion.* Zesz. Probl. Post. Nauk Rol. 469: 209–216.
- LAHUTA L.B., ŁOGIN A., REJOWSKI A., SOCHA A., ZALEWSKI K. 2000. *Influence of water deficit on the accumulation of sugars in developing field bean (*Vicia faba* var.*

minor) seeds. *Seed Science and Technology* 28: 93–100.

OBENDORF R.L. 1997. *Oligosaccharides and galactosyl cyclitols in seed desiccation tolerance (Review Update)*. *Seed Science Research* 7: 63–74.

PERATA P., PICCARELLI P., ALPI A. 1990. *Pattern of variations in abscisic acid content in suspensors, embryos, and integuments of developing Phaseolus coccineus seeds*. *Plant Physiology* 94: 1776–1780.

SKRIVER K., MUNDY J. 1990. *Gene expression in response to abscisic acid and osmotic stress*. *The Plant Cell* 2: 503–512.

ZALEWSKI K., LAHUTA L.B., HORBOWICZ M. 2001. *The effect of soil drought on the composition of carbohydrates in yellow lupin seeds and triticale kernels*. *Acta Physiologiae Plantarum* 23: 73–78.

ZAMSKI E., SCHAFFER A.A. 1996. *Photoassimilate Distribution in Plants and Crops. Source-Sink Relationships*. Marcel Dekker. Inc. (Ed), New York, Basel, Hong Kong.

Słowa kluczowe: *Vicia hirsuta* (L.) S. F. GRAY, nasiona, oligosacharydy, galaktozylocyklitole, temperatura

Streszczenie

Przeprowadzono badania nad wpływem różnych temperatur powietrza (5–10, 14–18, 18–20, 20–25, 30–35°C) podczas rozwoju i dojrzewania nasion wyki drobnokwiatowej (*Vicia hirsuta* (L.) S. F. GRAY) na zawartość cukrowców rozpuszczalnych i ich skład jakościowy w dojrzałych nasionach. Przy temperaturach 18–20 i 20–25°C nasiona osiągały pełną dojrzałość po 22–24 dniach od zapylenia. Temperatury niższe wydłużały dojrzewanie (do 36 i 72 dni przy 14–18 i 5–10°C, odpowiednio), natomiast temperatury 30–35°C skróciły dojrzewanie nasion do 18 dni. W warunkach wydłużonej (do 72 dni) i skróconej (do 18 dni) embriogenezy nasiona akumulowały 3-krotnie więcej oligosacharydów rodziny rafinozy (RFO), niż nasiona dojrzewające w przedziale temperatur 14–25°C. Wysoka temperatura (30–35°C) powodowała równie intensywne gromadzenie galaktozylocyklitoli (Gal-C), głównie mono- i digalaktopinitolu A. Zwiększona zawartość RFO i Gal-C sugeruje, że związki te mogą chronić tkanki nasion przed szkodliwymi następstwami przyspieszonego odwadniania (wywołanego wysoką temperaturą), bądź długotrwałego działania chłodu.

THE EFFECT OF DIFFERENT TEMPERATURES ON THE SOLUBLE SUGARS ACCUMULATION IN DEVELOPING *Vicia hirsuta* (L.) S. F. GRAY SEEDS

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

Key words: *Vicia hirsuta* (L.) S. F. GRAY, seeds, oligosaccharides, galactosyl cyclitols, temperature

Summary

The paper provides an analysis of the effect of various air temperatures (5–10°C, 14–18°C, 18–20°C, 20–25°C, 30–35°C) during development and maturation of *V. hirsuta* seeds on soluble carbohydrates content in mature seeds.

At temperatures 18–20°C and 20–25°C seeds achieved full maturity in 22–24 days after pollination. Lower temperatures prolonged maturation to 36 and 72 days (at 14–18°C and 5–10°C, respectively). During shortened (18 days) and prolonged (72 days) embryogenesis, seeds accumulated 3-fold more of the raffinose family oligosaccharides than seeds maturing at temperature range 14–25°C. High temperature (30–35°C) resulted in intensive accumulation of galactosyl cyclitols, mainly mono- and digalactopinitol A. Increased contents of RFO and Gal-C suggest that these compounds can be involved in tissue protection against damages caused by accelerated dehydration (due to high temperature) or by exposure to prolonged low temperature.

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