

Olesia GUMNICKA, Lucjan JANSON, Andrzej ZAŁĘSKI  
Instytut Badawczy Leśnictwa  
Zakład Genetyki i Fizjologii Drzew Leśnych  
Sękocin-Las, 05-900 Raszyn  
e-mail: olesia@ibles.waw.pl

## ZAWARTOŚĆ BIAŁEK ROZPUSZCZALNYCH W WODZIE W NASIONACH ŚWIERKA POSPOLITEGO (*PICEA ABIES* L. KARST) O RÓŻNEJ ODPORNOŚCI NA TEST PRZYSPIESZONEGO POSTARZANIA

CONTENTS OF PROTEINS SOLUBLE IN WATER IN NORWAY SPRUCE  
SEEDS (*PICEA ABIES* L. KARST) OF DIFFERENT RESISTANCE  
IN ACCELERATED AGEING TESTS

**Abstract.** Analysis of water soluble proteins in seed samples representing 13 chosen provenances of Norway spruces originating from Sudety of different resistance in accelerated ageing tests was carried out. Negative correlation for accelerated ageing test and contents of water soluble proteins was stated.

**Key words:** *Picea abies*, seeds, proteins soluble in water.

## 1. WSTĘP

Odporność nasion danego gatunku drzewa na przechowywanie długookresowe cechuje się dużą zmiennością, występującą zarówno pomiędzy różnymi populacjami drzew, jak i pomiędzy poszczególnymi genotypami w drzewostanie. Zmienność ta związana jest z biochemicznymi właściwościami nasion, które z kolei w dużej mierze zależą od zmiennych warunków środowiska, jakie mają miejsce w czasie zawiązywania, wykształcania i dojrzewania nasion.

Skład chemiczny nasion i związana z tym ich żywotność zależą od pochodzenia nasion oraz miejsc ich formowania się w koronie drzewa. Nagromadzenie w nasionach różnych ilości substancji odżywczych i z tym związanej odmiennej witalności stwierdzono dla wielu gatunków roślin (GRZESIUK, KULKA 1981). Również nasiona pochodzące z różnych regionów klimatycznych i glebowych cechuje różna zawartość białek, kwasów tłuszczowych i węglowodanów oraz poszczególnych enzymów, regulatorów wzrostu i witamin (GRZESIUK, KULKA 1981). SKRE (1988) analizując zmiany biochemiczne i fizjologiczne w nasionach świerka pospolitego (*Picea abies* L. Karst), wiąże je z dojrzewaniem i adaptacją do klimatu.

Przyrostowi masy nasion towarzyszy rozwój zarodków i bardzo wysoka aktywność enzymatyczna. Faza ta wiąże się z gromadzeniem białek. SKRE i GJELSVIK (1981) podkreślają dużą zmienność między poszczególnymi populacjami świerka pospolitego. Stwierdzają, że zjawisko to jest związane z adaptacją drzew do warunków środowiska. Według nich, oprócz środowiska zmienność tę może kształtować również zróżnicowanie genetyczne poszczególnych genotypów. Sugerują to także prace VINCENTA (1965), MACHANIČEKA (1981) i HATTEMERA (1982). Vincent podaje, że przyczyną zmienności są równocześnie czynniki genetyczne i środowiskowe. Podobne zależności w zróżnicowanym nagromadzaniu substancji odżywczych i związanej z tym różnej witalności nasion stwierdzano u różnych gatunków roślin zielnych (ROBERTS, OSBORNE 1973; OVCZAROV 1976; TRZEBIŃSKI 1976).

Do oceny predyspozycji nasion do długookresowego przechowywania stosuje się w praktyce nasiennej testy przyspieszonego postarzania. Polegają one na określaniu spadku żywotności nasion po poddaniu ich sztucznie stworzonym warunkom stresowym (MACHANIČEK 1981).

Celem prezentowanych badań\* było określenie zależności pomiędzy odpornością nasion świerka pospolitego na test przyspieszonego postarzania, a zawartością w nich białek rozpuszczalnych w wodzie.

---

\* Badania wykonano w ramach projektu celowego nr 49-00 finansowanego przez Komitet Badań Naukowych

## 2. METODYKA BADAŃ

### 2.1. Materiał badawczy

Nasiona świerka pospolitego, reprezentujące 48 pochodzeń z Sudetów, przechowywane są w czterech różnych temperaturach (+3°C, -15°C, -20°C i -25°C) w chłodniach Zakładu Genetyki i Fizjologii Drzew Leśnych IBL. Zostały one pozyskane w zimie 1992/93, z szyszek zebranych w dziewięciu nadleśnictwach, w drzewostanach położonych na różnej wysokości — od 400 do 1250 m n.p.m. Przed złożeniem do długookresowego przechowywania, właściwości nasion wszystkich pochodzeń zostały przebadane z zastosowaniem testów: rentgenograficznych, kiełkowania i przyspieszonego postarzenia.

Do zbadania odporności nasion świerka różnych pochodzeń na przyspieszone postarzenie zastosowano test opracowany w Czechach przez MACHANIČEKA (1981). Próbkę nasion przetrzymywane były w laboratorium przez 95 godzin w temperaturze 40-41°C i w warunkach wilgotności powietrza 90-100%. Jako miarę wrażliwości przyjęto różnicę udziału skiełkowanych nasion po 14 dniach pomiędzy nasionami poddanymi testowi postarzenia i nie poddanymi temu testowi. Według opinii Machaničeka, jeśli u tak traktowanej próbki nasion następuje spadek zdolności kiełkowania większy niż 10% w porównaniu do równoległej próbki nasion nie poddanych warunkom stresowym, to nie nadają się one do przechowywania długookresowego.

Istotność różnic w zakresie obniżenia zdolności kiełkowania ustalono za pomocą analizy wariancyjnej. Do badania zawartości białek wybrano 6 próbek nie reagujących istotnym zmniejszeniem żywotności na test przyspieszonego postarzenia (wolno starzejących się) i 7 próbek silnie reagujących na ten test (szybko starzejących się). Badania zawartości białek przeprowadzono w nasionach nie postarzanych sztucznie.

Dodatkowo, dla określenia zawartości białka w nasionach świerka już po długookresowym przechowywaniu, do badań użyto dodatkowo próbek z dwóch zapasów nasion przechowywanych w chłodniach IBL przez 20 i 15 lat. Pochodziły one ze zbioru z lat 1976/77, dokonanego w Nadleśnictwie Białowieża (obręb Zwierzyniec) i ze zbioru z lat 1980/81, dokonanego w Nadleśnictwie Wisła (obręb Istebna). Nasiona tych dwóch pochodzeń przetrzymywane były w stałej temperaturze -2°C, w próbkach o zawartości wody 6-7% w stosunku do suchej masy. Wyjątek stanowiły okresy rozmrażania chłodni, trwające od 24 do 36 godzin, które powtarzane były co 2 tygodnie. W czasie rozmrażania temperatura pomieszczenia z ujemnej (-2°C) wzrastała do temperatury dodatniej, w zakresie od +8 do +10°C, w zależności od pory roku.

## 2.2. Metoda analizy białek

Białka w nasionach świerka oznaczano metodą Lowry'ego w modyfikacji PETERSONA (1977), w której wykorzystuje się dwie cechy białek: obecność wiązań peptydowych i reszt tyrozyny. Pod wpływem odczynnika węglanowego zawierającego jony  $\text{Cu}^{2+}$  i odczynnika Folina powstaje barwny produkt, który nadaje roztworowi białka zabarwienie o intensywności proporcjonalnej (w zakresie pewnych stężeń) do ilości białka. Ilość wytworzonego barwnego produktu mierzona jest fotometrycznie. Ta metoda pozwala na wykrywanie nawet niewielkich ilości białka.

Nasiona świerka (10g) homogenizowano przez 2 minuty w 100 ml acetonu schłodzonego do temperatury  $-15^{\circ}\text{C}$ , po czym aceton odfiltrowano, a osad przepłukano jeszcze 400 ml acetonu, wysuszono, zważono i wykorzystano do analizy (proszek acetonowy). Przez godzinę ekstrahowano 0,25 g proszku acetonowego, używając 40 ml wody dejonizowanej, po czym roztwór odfiltrowano. Następnie 1,0 ml otrzymanego supernatantu przeniesiono do probówki, dodano 1,0 ml odczynnika Lowry (Sigma diagnostics, USA) i wymieszano. Po odczekaniu 20 minut dodano 0,5 ml odczynnika Folina (Sigma diagnostics) i ponownie wymieszano. Po upływie 30 minut (czas wytworzenia intensywnego niebieskiego koloru) mierzono absorbcję roztworu (spektrofotometr "Jenway" 6105 U.V./Vis., UK) przy długości fali  $\lambda = 750 \text{ nm}$ . Ogólną ilość białka oznaczono według krzywej standardowej, stosując jako standard albuminę (albumin bovine, Sigma diagnostics, Protein Assay Kit).

Próbki nasion dwóch pochodzeń świerka szybko starzejącego się (1620) i wolno starzejącego się (1618) analizowano również metodą wysokociśnieniowej chromatografii cieczowej (HPLC), na zasadzie filtracji żelowej. Warunki chromatografii były następujące:

- chromatograf cieczowy "Waters",
- kolumna Protein-Pak 300 SW, 7,8 mm×300 mm,
- bufor: 0,1 M  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , pH 7,0,
- szybkość przepływu rozpuszczalnika 1 ml/min,
- detektor U.V./Vis., detekcja przy 280 nm.

## 3. WYNIKI BADAŃ I DISKUSJA

Wyniki badań świerka sudeckiego przedstawione w tabeli 1 wskazują na to, że próbki nasion nieodpornych na test przyspieszonego postarzenia zawierały przeciętnie ok. 20% więcej białka rozpuszczalnego w wodzie niż próbki nasion odporne na ten test. Istotność różnicy w zawartości białka rozpuszczalnego w wodzie pomiędzy grupą nasion odpornych i nieodpornych na test przyspieszonego

Tabela 1

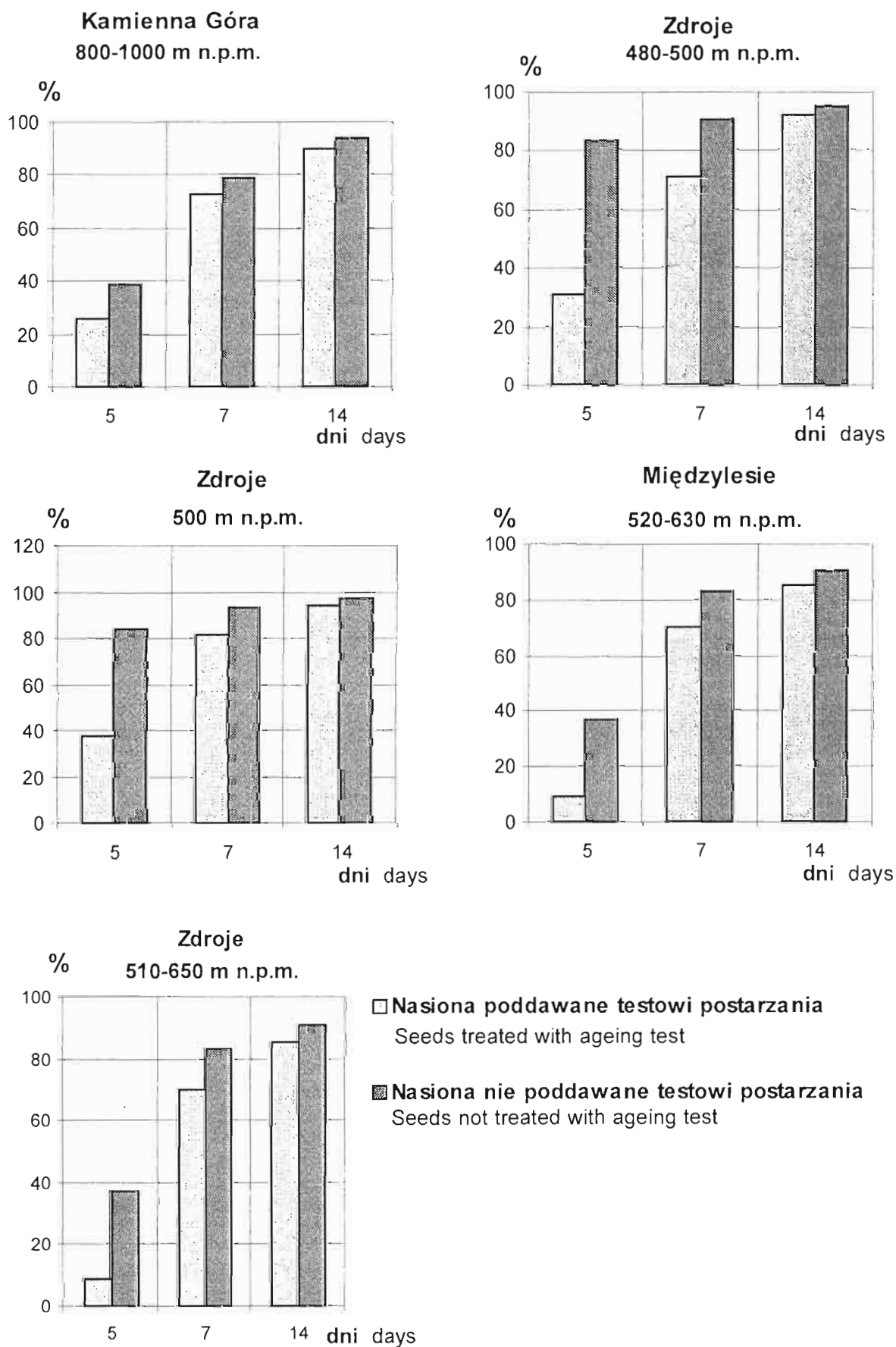
Table 1

**Zawartość wodorozpuszczalnego białka w wybranych próbkach nasion świerka pospolitego z Sudetów**

Contents of water soluble proteins in chosen samples of Norway spruce seeds originating from Sudety

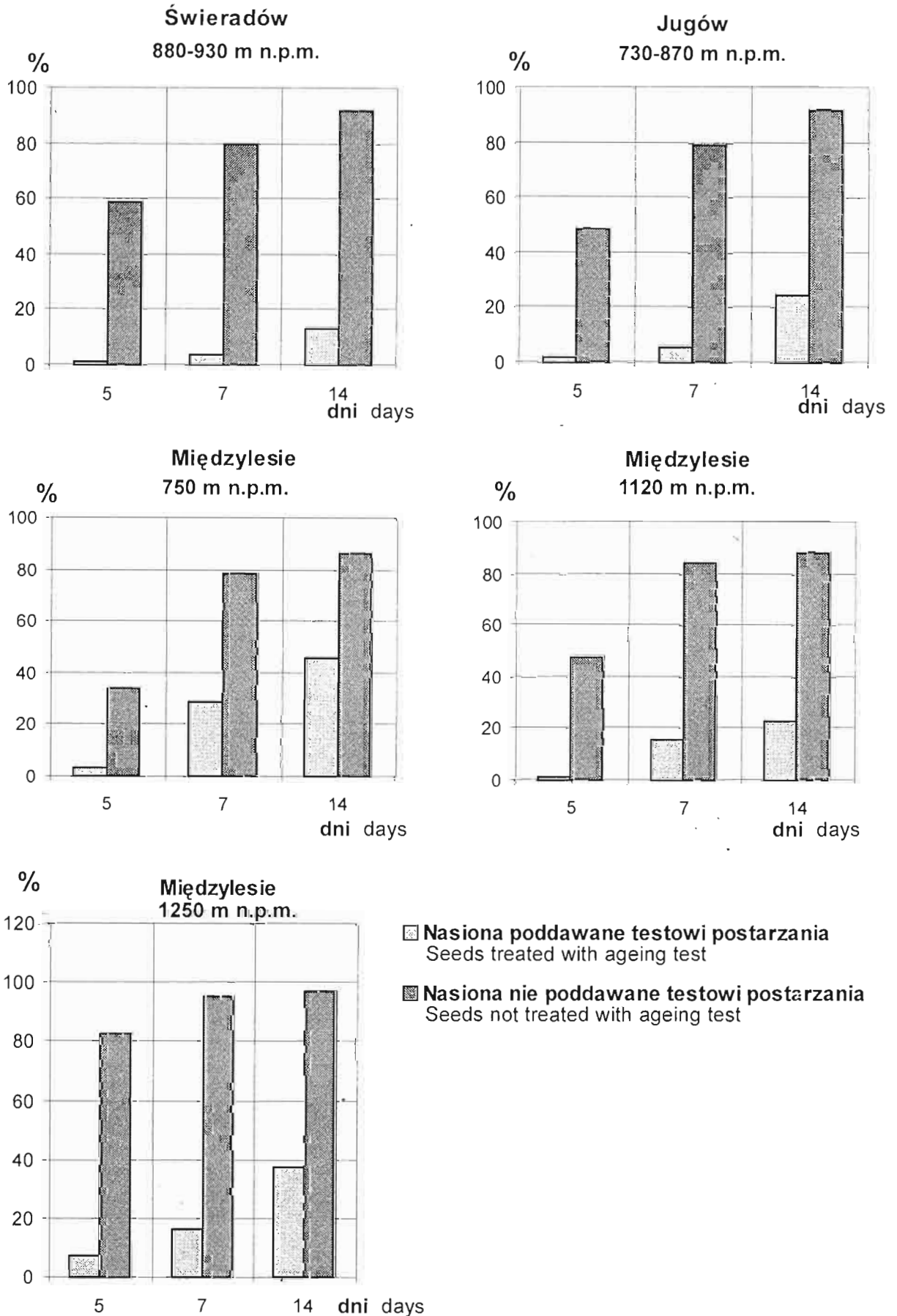
Pochodzenie nasion Origin of seeds			Obniżenie zdolności kiełkowania po teście przyspieszonego postarzenia Decreasing of germination ability after test of accelerating ageing (%)	Zawartość białka Contents of protein (%)
Numer próbki Number of sample	Nadleśnictwo Forest Division	Wysokość w m n.p.m. Altitude in m		
<b>Nasiona wolno starzejące się</b> Slowly ageing seeds				
1582	Kamienna Góra	800-1000	4	1.87
1586	Zdroje	510-650	5	1.84
1599	Zdroje	500	3	1.77
1600	Zdroje	480-500	3	2.55
1602	Wałbrzych	529-600	8	1.86
1618	Międzylesie	520-630	7	1.97
Średnia Average			5.0	1.93
<b>Nasiona szybko starzejące się</b> Quickly ageing seeds				
1588	Międzylesie	750	40	2.05
1604	Międzylesie	1120	65	2.27
1608	Międzylesie	1250	60	2.91
1620	Międzylesie	990-1020	42	2.94
1625	Szklarska Poręba	670-700	31	1.91
1627	Świeradów	880-930	78	2.58
1628	Jugów	730-870	67	2.58
Średnia Average			54.7	2,46

postarzenia została udowodniona za pomocą analizy wariancji, na poziomie istotności 0,01. Dla zbioru 13 przebadanych próbek świerka sudeckiego udowodniono również istnienie korelacji (przy poziomie istotności 0,01), o współczynniku  $R=0,74$ , pomiędzy obniżeniem zdolności kiełkowania próbek nasion po teście postarzenia a zawartością białek rozpuszczalnych w wodzie w nie postarzanych nasionach. Nasiona pochodzące z Sudetów charakteryzowały się wysoką, początkową zdolnością kiełkowania i dużą zmiennością pod względem odporności na test przyspieszonego postarzenia. Obniżenie zdolności kiełkowania w wyniku poddania nasion warunkom stresowym w stosunku do nasion nie postarzanych sztucznie, wahało się zależnie od pochodzenia od 3 do 78% (ryc. 1 i 2).



Ryc. 1. Przebieg kiełkowania wolno starzejących się pochodzeń nasion świerka z Sudetów

Fig. 1. Germination course of slowly ageing provenances of Norway spruce seeds from Sudety



**Ryc. 2. Przebieg kiełkowania szybko starzejących się pochodzeń nasion świerka z Sudetów**

Fig. 2. Germination course of quickly ageing provenances of Norway spruce seeds from Sudety

Tabela 2

Table 2

Zawartość poszczególnych białek w nasionach wolno starzejących się (próbka nr 1618) wyrażona w stosunku do zawartości białek w nasionach szybko starzejących się (próbka nr 1620).

Contents of particular proteins in slowly ageing seeds (sample No 1618) expressed in percentage contents of proteins in quickly ageing seeds (sample No 1620)

Czas retencji białka Protein retention time (min.)	Zawartość białka Contents of protein (%)
9.07	0,00
11.80	46,48
12.46	95,97
13.08	36,55

W analizach statystycznych zastosowano przekształcenie wartości procentowych za pomocą wzoru:  $y = \arcsin \sqrt{\%}$ .

Analiza chromatograficzna (HPLC) w próbce nasion nieodpornych na test przyspieszonego postarzenia (nr 1620) wykazała zawartość czterech rodzajów białek z czasem retencji: 9,07; 11,78; 12,45 i 13,08 minut (tab. 2). W próbce nasion nieodpornych na test przyspieszonego postarzenia (np. 1618) wykryto tylko trzy rodzaje białka o czasie retencji: 11,82; 12,47 i 13,08 min. Porównanie powierzchni pików jakie otrzymano na wykresach w wyniku chromatografii, potwierdziło spostrzeżenie, że próbka nasion odpornych na test przyspieszonego postarzenia zawierała ogółem mniej białek rozpuszczalnych w wodzie, w porównaniu do próbki nieodpornej na ten test. Dla poszczególnych rodzajów białek wartość ta zawierała się w przedziale od 0% (białka o czasie retencji 9,07) do 96% (białka o czasie retencji 12,46) (tab. 2).

Istnieją więc podstawy, aby sądzić, że odporność nasion na test przyspieszonego postarzenia zastosowany w tym doświadczeniu jest związana z ich składem biochemicznym i wzrasta wraz ze zmniejszaniem się w nasionach białek rozpuszczalnych w wodzie. Innymi słowy, duży udział białek rozpuszczalnych w wodzie może powodować, że nasiona będą się gorzej przechowywać. Jak twierdzą niektórzy badacze (KATSUTA 1961), w nasionach dojrzałych fizjologicznie zwiększony jest udział białek rozpuszczalnych w roztworach soli kosztem zmniejszonego udziału białek rozpuszczalnych w wodzie. O pełnej przydatności testu przyspieszonego postarzenia do określania predyspozycji nasion do przechowywania długookresowego (MACHANIČEK 1981) można będzie się przekonać jednak dopiero w przyszłości, po przechowaniu nasion wszystkich testowanych pochodzeń przez okres co najmniej 20 lat i ponownym zbadaniu ich żywotności.

Badania przeprowadzone dla dwóch zapasów nasion świerka po długookresowym przechowywaniu w chłodniach IBL dały niejednoznaczne wyniki (tab. 3).



Tabela 3

Table 3

**Zawartość wodorozpuszczalnego białka w nasionach świerka pospolitego przechowywanych przez 15 i 20 lat w temperaturze -2°C.**

Contents of water soluble protein in Norway spruce stored for 15 and 20 years in the temperature of -2°C

Pochodzenie nasion (Nadleśnictwo) Origin of seeds (Forest Division)	Okres przechowywania Period of storage	Zdolność kiełkowania po przechowaniu Germination ability after storage (%)	Zawartość ogólna białka Total contents of proteins (%)
Obręb Istebna (Wisła)	15 lat	70%	2,11
Obręb Zwierzyniec (Białowieża)	20 lat	30%	1,33

Jedna z próbek, pochodząca z Nadleśnictwa Białowieża i przechowywana przez 20 lat, charakteryzowała się bardzo małą zawartością białek rozpuszczalnych w wodzie (1,33%) — najmniejszą w porównaniu do wszystkich przebadanych w tym doświadczeniu próbek, a mimo to zdolność kiełkowania obniżyła się do 30%. W drugiej natomiast, pochodzącej z Nadleśnictwa Wisła i przechowywanej przez 15 lat, udział białek rozpuszczalnych w wodzie kształtował się na przeciętnym poziomie, a zdolność kiełkowania obniżyła się do 70%. W tym przypadku nie wiadomo więc, jaki związek z obniżeniem żywotności w wyniku długiego okresu przechowywania miała zawartość białka. Nie jest wykluczone, że nasiona te miały od samego początku różne zawartości białka i różną wrażliwość na przechowywanie.

#### 4. WNIOSKI

Dotychczasowe badania wskazują, że odporność nasion świerka pospolitego na test przyspieszonego postarzenia wzrasta wraz ze zmniejszaniem się zawartości w nich białek rozpuszczalnych w wodzie. Należy przeprowadzić dalsze badania żywotności testowanych nasion po ich przechowaniu przez okres co najmniej 20 lat w celu potwierdzenia zaobserwowanych prawidłowości i sprawdzenia przydatności testu sztucznego postarzenia do wykrywania rzeczywistych predyspozycji nasion do starzenia się w trakcie długotrwałego przechowywania.

## CONTENTS OF PROTEINS IN NORWAY SPRUCE SEEDS (*PICEA ABIES* L. KARST) OF DIFFERENT RESISTANCE IN ACCELERATED AGEING TESTS

### Summary

Spruce seeds stored in the cooling chambers were divided for 4 temperature variants which represent 48 provenances from Sudety. The research showed that the seeds before long-lasting storage characterised with large variability of resistance to accelerated ageing test. The test relied on determination of germination ability decrease after stress treatment - there were kept for 95 hours in temperature up to 40–41°C and fully saturated air atmosphere (humidity 90–100%). Six samples of resistant provenances to accelerated ageing test in the group of seeds where decrease of their vitality after stress treatment was little (average 5%) and 7 samples of not resistant seeds to this test, in the group where average vitality decrease equalled about 55%, were chosen for the analysis of water soluble protein contents. Content of proteins soluble in water was determined with Lowry's method in modification of Peterson (1977), and in addition for two samples (one of each seed group) the protein analysis with HPLC based on molecular filtration was carried out. It was found that seed samples not resistant to the test of accelerated ageing contained more water soluble proteins (in average about 20%) than samples resistant to this test. The significance of this difference was proved statistically with analysis of variance ( $p=99$ ), Strong correlation ( $R=0,74$ ) between germination decrease ability after accelerated ageing test and the contents of water soluble proteins was stated.

Transl. T. O.

## PIŚMIENICTWO

- GRZESIUK S., KULKA K. 1981: Fizjologia i biochemia nasion. PWRL Warszawa.
- HATTEMER H.-H. 1982: Genetische Untersuchungen an Forstsaatgut. Allg Forstztg., 93, 7: 177-179.
- KATSUTA M. 1961: The synthesis of reserve in ripening pine seeds. J. Jap. For. Soc., 43: 157-161.
- MACHANIČEK J. 1981: Vyzskum kritérii uróujcich vhodnost lestního osiva pro dlouhodobé skladování. Prace VÚLHM, 59: 49-64.
- OVČAROV K. E. 1976: Fizjologija formirovanija i prorastanija semjan. Izd. Kolos, Moskva.
- PETERSEN G. L. 1977: A Simplification of the Protein Assay Method of Lowry et. al. Which is More Generally Applicable. Analytical Biochemistry, 83: 346-356.
- ROBERTS E. H., OSBORNE J. D. 1973: Protein synthesis and viability in rye grains. [W:] Seed ecology (eds. W. Heydecker). Butterworths, London: 99-114.
- SKRE O., GJELSVIK S. 1981: Physiological changes in seeds of Norway Spruce [*Picea abies* (L.) Karst] during ripening and their ecological importance. [W:] Tree-line ecology (eds. S. Payette, P. Marisset). Proceedings of the Northern Quebec Tree-line Conference. Presses de l'université Laval (Quebec, Canada): 123-131.
- SKRE O. 1988: Biochemical and physiological changes in seeds of Norway Spruce [*Picea abies* (L.) Karst] during ripening and ecological adaptation to climate. I. Changes in protein content and enzyme activity. Medd. Nor Inst. Skogforsk, 40, 15: 1-51.
- TRZEBIŃSKI J. 1976: Analiza chemicznych przyczyn niskiej zdolności kiełkowania buraków jednosiennych. Hod. Rośl. Aklim. i Nasien., 20: 305-313.
- VINCENT G. 1965: Lesní semenarství. Statní Zem. Nakl., Praha.