ANNALES
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA
LUBLIN-POLONIA
VOL. LVI, 22 SECTIO E 2001

Katedra Biochemii i Chemii Żywności Akademii Rolniczej w Lublinie

JADWIGA SZYNAL, DANUTA GORDON, ALFREDA ROGOWSKA

Nagromadzanie się cukrów redukujących w siewkach pszenicy i pszenżyta po stosowaniu CCC, etefonu i jonów wapniowych

Accumulation of Reducing Sugars in the Wheat and Triticale Seedlings After Application of CCC, Etephon and Calcium Ions

Inhibicja wzrostu roślin w następstwie stosowania retardantów pociąga za sobą szereg zmian w przemianach metabolicznych, a także w aktywności wielu enzymów. W badaniach z tego zakresu wiele uwagi poświęcono działaniu retardantów na nagromadzanie się barwników plastydowych oraz intensywność fotosyntezy (Bode i wsp. 1984, Cliquet i wsp. 1989, Karpov i Bielozerova 1985, Kuriata i wsp. 1988, Sykut i Szynal 1990). Na ogół syntetyczne i naturalne inhibitory hamowały tworzenie się barwników fotosyntetycznych, natomiast wpływ tych związków na intensywność fotosyntezy zależał od specyficzności gatunkowej roślin, stanu fizjologicznego oraz fazy rozwoju. O intensywności fotosyntezy świadczyć może m.in. dynamika zmian w nagromadzaniu się cukrów redukujących w roślinach. Przedstawione w niniejszej pracy wyniki oznaczeń zawartości cukrów redukujących stanowią fragment badań, których celem była próba wyjaśnienia mechanizmu retardacyjnego działania chlorku 2-chloroetylotrimetyloamoniowego (chlorek chlorocholiny, CCC) należącego do grupy czwartorzędowych związków amoniowych oraz etefonu (kwas 2-chloroetylofosfoniowy, Ethrel) z grupy połączeń etylenogennych. Obiektem badań nad CCC były siewki pszenicy odm. Panda i odm. Alfa, natomiast badania nad działaniem etefonu prowadzono na siewkach pszenżyta odm. Grado. Biorąc pod uwagę teorię o istnieniu wtórnych pośredników w reakcjach komórek roślinnych na fitohormony, w prezentowanych badaniach podjęto również próbę wyjaśnienia roli wapnia

w regulacji przemian metabolicznych cukrowców, wywołanych stosowaniem CCC i etefonu. W tym celu we wszystkich doświadczeniach wazonowych retardanty były aplikowane oddzielnie oraz łącznie z chlorkiem wapniowym.

MATERIAŁ I METODY

Obiektem badań nad wpływem CCC na metabolizm cukrowców były liście 9- i 15-dniowych siewek pszenicy ozimej odm. Panda oraz jarej odm. Alfa, traktowane roztworami CCC, $CaCl_2$ oraz ich mieszaninami. Doświadczenie wazonowe założono w 5 replikacjach i prowadzono w ściśle kontrolowanych warunkach. W doświadczeniu stosowano roztwory CCC i $CaCl_2$ o stężeniach 10^{-2} i 10^{-3} M. Otrzymano 7 wariantów doświadczenia, z których 2 stanowiły próby kontrolne, w tym jedna z wodą, a druga z samym $CaCl_2$. Szczegółowy opis metodyki doświadczeń oraz warunków wegetacji zamieszczono we wcześniejszej publikacji (S z y n a l 1993).

Do badań zbierano liście po 9 oraz 15 dniach wzrostu (wiek siewek liczono od chwili pęcznienia ziarniaków), następnie suszono w temp. $60^{o}C$ i rozdrabniano.

Materiał do badań nad wpływem etefonu stanowiły 15- i 21-dniowe siewki pszenżyta ozimego odm. Grado, traktowane różnymi dawkami etefonu oddzielnie lub łącznie z $CaCl_2$. W doświadczeniu wazonowym prowadzonym w warunkach kontrolowanych stosowano Flordimex firmy VEB Chemiekombinat Bitterfeld, zawierający 42% etefonu. Preparat stosowano w formie oprysku po 7 dniach wzrostu (od chwili pęcznienia ziarniaków), stosując w każdej serii doświadczenia inne stężenie retardanta. W pierwszej serii stosowano wodny roztwór preparatu w dawce dwukrotnie niższej od polowej (0,1% roztwór), przyjmując dla uprawy żyta 3 dm^3 preparatu technicznego na hektar, w następnych seriach zwiększano stopniowo stężenie Flordimexu aż do osiągnięcia dawki dwukrotnie wyższej niż polowa (0,4% roztwór). W ten sposób otrzymano 8 wariantów doświadczenia, z których dwa stanowiły próby kontrolne (jedna z H_2O, a druga z samym $CaCl_2$). Warunki wegetacji były identyczne jak w doświadczeniu z CCC, a szczegółowy opis metodyki doświadczeń wazonowych był już wcześniej publikowany (S z y n a l 1991).

Do badań zbierano rośliny po 8 i 14 dniach od aplikacji Flordimexu (siewki 15- i 21-dniowe), suszono w $60^{o}C$ i rozdrabniano.

Zawartość cukrów redukujących w materiale doświadczalnym określano mikrometodą Hagedorna-Jensena w modyfikacji Fujita i Iwatake (3). Zamieszczone w tabelach 1 i 2 wyniki stanowią wartości średnie z 3 niezależnych oznaczeń.

OMÓWIENIE WYNIKÓW I DYSKUSJA

Poziom cukrów redukujących w siewkach pszenicy był zróżnicowany i zależny od ich stanu fizjologicznego (tab. 1). Porównując rośliny pochodzące z obiektów kontrolnych z wodą (próby 1), w odmianie Alfa obserwowano nagromadzanie się tych składników w miarę wzrostu roślin, podczas gdy w siewkach pszenicy Panda wyższą koncentracją cukrów charakteryzowały się rośliny młodsze. Reakcja analizowanych odmian na aplikację CCC była uzależniona od czasu działania retardanta oraz jego dawki. W odniesieniu do próby kontrolnej z wodą (próba 1) w

Tab. 1. Zawartość cukrów redukujących (% w s.m.) w siewkach pszenicy odm. Alfa i Panda po stosowaniu CCC i chlorku wapniowego
Content of reducing sugars (% in dry matter) in the wheat seedlings var. Alfa and Panda after application of CCC and calcium chloride

Wiek siewek	Próba	Wariant doświadczenia		Cukry redukujące	
		stężenie CCC (M)	stężenie $CaCl_2$ (M)	odm. Alfa	odm. Panda
9-dniowe	1	0	0	2,11	2,66
	2	0	10^{-2}	1,99	2,58
	3	10^{-2}	0	2,34	2,38
	4	10^{-2}	10^{-2}	1,64	2,23
	5	0	10^{-3}	1,86	2,25
	6	10^{-3}	0	2,42	2,73
	7	10^{-3}	10^{-3}	1,75	2,03
15-dniowe	1	0	0	2,65	2,25
	2	0	10^{-2}	2,86	2,78
	3	10^{-2}	0	2,06	2,10
	4	10^{-2}	10^{-2}	2,20	2,47
	5	0	10^{-3}	2,59	2,88
	6	10^{-3}	0	2,36	2,60
	7	10^{-3}	10^{-3}	2,25	2,68

pszenicy Alfa po 8 dniach od wprowadzenia CCC (siewki 9-dniowe) niezależnie od jego dawki zawartość cukrów redukujących wzrastała (próby 3 i 6), podczas gdy po 14 dniach ekspozycji (siewki 15-dniowe) poziom tych składników ulegał obniżeniu, szczególnie przy wyższej dawce retardanta (próba 3). W odmianie Panda wyższe stężenie CCC powodowało spadek zawartości cukrów redukujących zarówno w 9-, jak i 15-dniowych roślinach, natomiast niższa dawka podwyższała ich poziom (próby 6). Zmiany w nagromadzaniu się cukrów redukujących obserwowano również po stosowaniu samego $CaCl_2$. Zależały one od czasu działania oraz stężenia tego związku. W porównaniu z materiałem kontrolnym z wodą (próby 1) w roślinach 9-dniowych poziom cukrów redukujących obniżył się o 12% w odmianie Alfa i o 15% w odmianie Panda w obecności 10^{-3}M roztworu $CaCl_2$. Odwrotny efekt działania chlorku wapniowego obserwowano w roślinach 15-dniowych. W siewkach pochodzących z tych wariantów doświadczenia (próby 2 i 5) zawartość cukrów redukujących wzrastała, przy czym w pszenicy Alfa tylko po aplikacji 10^{-2} M roztworu, a w odmianie Panda przy obydwu stężeniach $CaCl_2$.

W odróżnieniu od opisanych obserwacji stosowanie CCC w obecności $CaCl_2$ wywoływało zdecydowanie jednokierunkowe zmiany koncentracji cukrów redukujących w analizowanych roślinach. W materiale pochodzącym z tych wariantów

doświadczenia (próby 4 i 7) w odniesieniu do prób kontrolnych z samym $CaCl_2$ (próby 2 i 5) zawartość tych składników ulegała obniżeniu bez względu na wiek siewek. Efekt ten był szczególnie wyraźnie zaznaczony w pszenicy Alfa, gdzie przy łącznym stosowaniu 10^{-2}M CCC i $CaCl_2$ poziom cukrów redukujących obniżył się o 18% w siewkach 9-dniowych i o 23% w roślinach 15-dniowych.

Tab. 2. Zawartość cukrów redukujących (% w s.m.) w siewkach pszenżyta odm. Grado po stosowaniu Flordimexu i chlorku wapniowego

Content of reducing sugars (% in dry matter) in the triticale seedlings var. Grado after application of Flordimex and calcium chloride

Próba	Wariant doświadczenia		Cukry redukujące	
	stężenie Flordimexu (%)	stężenie $CaCl_2$ (M)	siewki 15-dniowe	siewki 21-dniowe
1	0	0	2,59	2,79
2	0	10^{-2}	2,70	2,92
3	0,1	0	2,97	2,84
4	0,1	10^{-2}	2,95	2,68
5	0,2	0	3,38	2,87
6	0,2	10^{-2}	2,88	2,52
7	0,4	0	3,30	3,49
8	0,4	10^{-2}	3,28	3,27

Z danych przedstawionych w tab. 2 wynika, że koncentracja cukrów redukujących w analizowanych siewkach pszenżyta zmieniała się w zakresie 2,52-3,49/100g s.m. i była uzależniona od wszystkich kontrolowanych w doświadczeniu czynników. Flordimex bez względu na dawkę wywoływał tendencje do podwyższania poziomu tych składników, przy czym istotny wzrost w stosunku do prób kontrolnych z wodą (próby 1) wykazano w siewkach 15-dniowych po aplikacji 0,2 i 0,4% roztworów (próby 5 i 7), a w przypadku siewek starszych jedynie przy wyższej dawce retardanta (próba 7). Zmiany w zawartości cukrów redukujących w roślinach pochodzących z obiektów, gdzie stosowano sam $CaCl_2$, były niewielkie, natomiast w roślinach pochodzących z tych wariantów doświadczenia, w których Flordimex stosowano łącznie z chlorkiem wapniowym, poziom cukrów redukujących był zróżnicowany i zależał od czasu działania tych dwóch czynników. W porównaniu z próbami kontrolnymi z $CaCl_2$ (próby 2) w roślinach 15-dniowych (po 8 dniach ekspozycji) obserwowano wzrost zawartości tych składników przy wszystkich dawkach Flordimexu, sięgający 22% w przypadku najwyższego stężenia retardanta (próba 8). W siewkach 21-dniowych podobny efekt wykazano już tylko przy najwyższej dawce Flordimexu (próba 8). Porównując siewki pszenżyta pochodzącego z obiektów 3, 5 i 7 z roślinami z wariantów 4, 6 i 8, można stwierdzić,

ze jony wapnia hamowały stymulujący efekt działania etefonu na nagromadzanie się cukrów redukujących. Na ogół podobne zmiany wykazano w siewkach pszenicy przy łącznym stosowaniu CCC i chlorku wapniowego (tab. 1).

Reasumując uzyskane wyniki, można stwierdzić, że obserwowana różnorodność w dynamice nagromadzania się cukrów redukujących pod wpływem CCC i etefonu obecnego w preparacie Flordimex była uzależniona od dawek i czasu ekspozycji tych retardantów. Chlorek chlorocholiny stosowany w niższej dawce na ogół podwyższał poziom cukrów redukujących w siewkach pszenicy, a wyższe jego stężenie, zwłaszcza po dłuższym czasie działania, powodowało spadek koncentracji tych składników. Flordimex natomiast bez względu na dawkę wywoływał wzrost poziomu cukrów redukujących w siewkach pszenżyta wkrótce po aplikacji, a po dłuższym działaniu tendencje te były zachowane tylko przy maksymalnej dawce retardanta.

Na modyfikacje w nagromadzaniu się cukrów rozpuszczalnych w organach różnych roślin, indukowane stosowaniem CCC, a także retardantów etylenogennych zwracali też uwagę inni autorzy (Bode i wsp. 1984, Grinberg i Osipova 1988, Knapp i wsp. 1987, Majewski 1987, Naik i Mohapatra 1999, Przeszlakowska 1979, Rossi-Jaume i Goleniowski 1986). Obserwowany w przedstawionej pracy kierunek zmian w koncentracji tych związków po aplikacji CCC znalazł potwierdzenie w badaniach z tego zakresu prowadzonych na siewkach pszenicy przez Bode'a i Wilda (1) oraz na częściach nadziemnych zbóż w pracy Przeszlakowskiej (17) i Knappa i wsp. (8). Wykazany w prezentowanych tu badaniach spadek zawartości cukrów redukujących przy wyższym stężeniu CCC może wiązać się z inhibicją systemów enzymatycznych odpowiedzialnych za biosyntezę barwników fotosyntetycznych, na co wskazują badania Kuriaty i wsp. (9) prowadzone na liściach roślin jagodowych. Przedstawiona przez Sykorową i wsp. (cyt. za 12) analiza przemian metabolicznych zachodzących podczas ontogenezy roślin pszenicy, słonecznika i grochu, których nasiona były moczone w roztworze Ethrelu, doprowadziła do stwierdzenia, że zawartość glukozy, fruktozy i sacharozy wzrastała pod wpływem niższych dawek preparatu po 14 dniach od jego zastosowania; w miarę zwiększania dawek retardanta i czasu ekspozycji zawartość tych związków ulegała obniżeniu. W przedstawionych tu badaniach w siewkach pszenżyta etefon wywoływał wzrost zawartości cukrów redukujących wkrótce po dolistnej aplikacji i podobnie jak w badaniach Sykorowej efekt ten stopniowo zanikał po dłuższym czasie od zastosowania preparatu. Podwyższenie poziomu cukrów redukujących pod wpływem etefonu w częściach nadziemnych jęczmienia wykazał również Majewski (11). W badaniach nad działaniem Flordimexu T w uprawach zbóż Mikos (12) wykazała spadek zawartości cukrów redukujących w źdźbłach żyta zebranych w fazie kwitnienia i dojrzałości mlecznej, w pszenicy kierunek zmian zależał od dawki

retardanta, a w pszenżycie w obu fazach autorka zanotowała spadek zawartości cukrów redukujących.

Uzyskane w tej pracy wyniki nad wpływem samych jonów wapnia na nagromadzanie się cukrów redukujących w analizowanych roślinach, z uwagi na brak danych z tego zakresu, można przedyskutować jedynie opierając się na badaniach nad wpływem tego pierwiastka na reakcje fotosyntezy. Brand i Becker (2) uważają, że wapń uczestniczy w reakcjach fotosyntezy poprzez wpływ na aktywność enzymów cyklu Calvina oraz na reakcje centrum fotosystemu II. Również Paul i Yeoh (15) w swoich badaniach wykazali, że aktywacja karboksylazy RuBP liści kasawy przez jony Mn i HCO_3 może być zastąpiona jonami wapnia. Na udział wapnia w charakterze ważniejszego jonu regulującego liczne procesy metaboliczne w roślinach wskazują też inni autorzy (Hetheringhton i Trewavas 1984, Mondal 1975, Preusser i wsp. 1988, Szweykowska 1987).

Z uzyskanych w niniejszej pracy danych wynika, że zmiany w koncentracji cukrów redukujących w siewkach pszenicy po aplikacji CCC oraz w siewkach pszenżyta po stosowaniu etefonu były wyraźnie modyfikowane w obecności jonów wapnia. Na ogół hamowały one stymulujące działanie testowanych retardantów na biosyntezę cukrów redukujących.

Cukry redukujące zajmują ważne miejsce w formowaniu się ścian komórkowych. Są one bowiem prekursorami składników strukturalnych tej części komórki, między innymi substancji pektynowych. W prowadzonych wcześniej badaniach nad wpływem CCC i jonów wapnia na metabolizm substancji pektynowych w siewkach pszenicy obserwowano odwrotną zależność (Szynal 1993). Na ogół w roślinach pochodzących z tych wariantów doświadczenia, w których poziom cukrów redukujących był niższy, ogólna zawartość związków pektynowych wzrastała. W badaniach nad wpływem Flordimexu na poziom różnych frakcji substancji pektynowych w siewkach pszenżyta nie wykazano istotnych zmian w ogólnej zawartości tych połączeń, natomiast znacząco podwyższał się poziom frakcji protopektyn związanych z kationami biwaletnymi (Szynal 1991). Uzyskane w niniejszej pracy dane oraz wyniki poprzednich prac sugerują, że jony wapnia stosowane łącznie z CCC czy też etefonem powodują przesunięcie przemian metabolicznych cukrowców w kierunku intensywniejszej biosyntezy polisacharydów ścian komórkowych, w tym głównie frakcji związków pektynowych.

PIŚMIENNICTWO

1. Bode J., Wild A.: The Influence of (2-chloroethyl)-trimethyl-ammonium chloride (CCC) on Growth and Photosynthetic Metabolism of Young Wheat Platns (*Triticum aestivum* L.). J. Plant Physiol., 116, 435-446, 1984.

2. Brand J. J., Becker D.: Evidence for Direct roles of Calcium in Photosynthesis. J. Bioenerg. Biomembr., 16, 239-249, 1984.
3. Ciszewska R., Przeszlakowska M., Sykut A., Szynal J.: Przewodnik do ćwiczeń z biochemii. AR Lublin, 1999.
4. Cliquet J. B., Morot-Gaudry J. F.: The Effect of Ethylene on Photosynthesis in Maize. Compt. Rend. Acad. Sci., III. Science de la Vie, 309, 317-322, 1989.
5. Grinberg J. P., Osipova R. A.: Vlijanie etrela, gidrela i GMK na chmičeskij sostav listev tabaka. Fizjol. Bioch. Kult. Rast., 20, 488-493, 1988.
6. Hetheringhton A. M., Trewavas A.: Activation of Pea Membrane Protein Kinase by Calcium Ions. Planta, 161, 409-417, 1984.
7. Karpov J. A., Bieloze rova O. L.: Vlijanije regulatorov rosta na fotosintez i ottok C-14 produktov iz listev rastienij soi v reproduktivnyj period. Fizjol. Rast., 32, 539-544, 1985.
8. Knapp J. S., Harms C. L., Volenec J. J.: Growth Regulators Effects on Wheat Culm Nonstructural and Structural Carbohydrates and Lignin. Crop Sci., 27, 1201-1205, 1987.
9. Kuriata V.G., Remeniuk G. L., Sogur L. N.: Izmenienie v sodieržanii plastidnych pigmentov i elementov mineralnogo pitanija v listiach jagodnych kultur pod diejstviem chlorcholinchlorida. Fizjol. Bioch. Kult. Rast., 20, 303-309, 1988.
10. Kuriata V. G., Sogur L. N., Dabižuk T. M.: Fizjologičeskoje obosnovanie kompleksnogo primenienija chlorcholinchlorida i Kampozana M v nasažđenijach maliny. Fizjol. Bioch. Kult. Rast., 20, 296-302, 1988.
11. Majewski K.: Wpływ wybranych regulatorów wzrostu na skład chemiczny roślin i ziarna jęczmienia jarego. Rozprawa doktorska, AR Lublin, 1987.
12. Mikos M.: Zmiany składu chemicznego i właściwości sprężystych źdźbła zbóż pod wpływem różnych dawek Flordimexu T i NPK. Rozprawa habilitacyjna, AR Lublin, 1988.
13. Mondal M. H.: Effect of Gibberellic Acid, Calcium, Kinetin and Ethylene on Growth and Cell Gibberellic Wall Composition of Pea Epicotyls. Plant Physiol., 56, 622-625, 1975.
14. Naik P. K., Mohapatra P. K.: Ethylene Inhibitors Promote Male Gametophyte Survival in Rice. Plant Growth Regul., 28, 29-39, 1999.
15. Paul K., Yeoh H. H.: Activation of RuBP Carboxylase of Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) Leaves. Acta Physiol. Plant., 11, 31-38, 1989.
16. Preusser E., Chudy M., Grundel M., Khalil F. A.: Influence of Ca^{++} and Other Bivalent Cations on the Acivity of Granule-bound Starch Synthetase. Acta Physiol. Plant., 10, 133-142, 1988.
17. Przeszlakowska M.: Wpływ chlorku chlorocholiny (CCC) na niektóre cechy morfologiczne i chemiczne źdźbła Triticale, pszenicy i żyta w okresie wegetacji. Wyniki badań nad *Triticale* w latach 1977-1978, IHAR, cz. II, 161-165, Radzików 1979.
18. Rossi-Jaume A., Goleniowski M., Tizio R.: Interaction of CCC [(2-chloroethyl)-trimethylammonium chloride] with a Foliar Nutrient Solution on Sucrose Content in Leaves and Roots of Red Beet (*Beta vulgaris* L.). J. Plant. Physiol., 124, 171-175, 1986.
19. Sykut A., Szynal J.: The effect of Flordimex on the Metabolism of Carotenoids in Triticale var. Grado and Malno. Proc. of the 20th Meeting of the Federation of European Biochemical Societies, 333, Budapeszt 1990.
20. Szweykowska A.: Mechanizmy działania hormonów roślinnych. Badania i hipotezy. Ser. Biol., 32, UAM w Poznaniu, 1987.
21. Szynal J.: Wpływ łącznego stosowania etefonu (Flordimexu) i chlorku wapniowego na zawartość frakcji substancji pektynowych w siewkach pszenżyta (*Triticale*). Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska, sectio E, vol. 46, Lublin 1991.
22. Szynal J.: The Effect of Simultaneous Application of Chlorcholine Chloride (CCC) and Calcium Ions on Accumulation of Pectic Substances Fractions in the Seedlings of Winter Wheat. App. Biol. Comm., 3, 129-136, 1993.

SUMMARY

The effect of CCC [(2-chloroethyl)-trimehylammonium chloride] and calcium ions on the content of reducing sugars in the wheat seedlings and accumulation of reducing sugars in the triticale seedlings after application Flordimex (42% of etephon) and calcium ions was investigated. The seedlings came from a pot experiment conducted in controlled conditions.

It was shown that an increase of the reducing sugars content in the wheat seedlings took place after application of a lower dose of CCC and decrease of its concentration in the plants with greater retardant dose. All doses of etephon on the other hand, caused an increase of the reducing sugars content in the triticale seedlings soon after its application, and after a longer time this tendency was observed only at maximum dose of retardant.

Changes of reducing sugars concentration in wheat seedlings after application of CCC and in triticale plants of etephon treated were significantly modified in the presence of calcium ions. Generally, they inhibited the stimulating effect of the analysed retardants on the biosynthesis of reducing sugars.