

Katedra i Zakład Botaniki Farmaceutycznej. Wydział Farmaceutyczny. Akademia Medyczna w Lublinie

Kierownik: doc. dr n. przyr. Tadeusz Szynal

Katedra i Zakład Histologii i Embriologii. Wydział Lekarski. Akademia Medyczna w Lublinie

Kierownik: prof. dr med. Stanisław Grzycki

Jadwiga MIŁKOWSKA i Zbigniew FRELEK

Zastosowanie metody chromatografii skrawkowej do wykrywania aminokwasów w tkankach roślinnych

Применение метода срезовой хроматографии для определения аминокислот в растительных
тканях

Application of Tissue Paper Chromatography to the Detection of Aminoacids in Plant Tissues

Przy użyciu metody chromatografii bibulowej wykryto i wykazano ważną rolę niektórych aminokwasów wpływających na rozwój organizmów roślinnych. Zmiany zawartości aminokwasów, zachodzące już w nasionach, i ilościowe zmniejszanie się ich w miarę dojrzewania nasion stwierdzili Grzesiuk i Kulka (4) oraz Pinagina i Klimentko (12). Zaobserwowano też zmiany w nasileniu występowania aminokwasów w różnych stadiach kiełkowania nasion i wzrostu kiełków [Korohoda, Waksmundzki, Wolter (7), Jiraček (5), Lawrence i Grant (8) i inni]. Wykazano także różnice w zależności od długości dnia [Mokronosow (12), Kazarian (6) oraz inni].

Praca nasza jest próbą zastosowania metody chromatografii skrawkowej dla przebadania aminokwasów w młodym korzeniu, łodydze oraz liścienu fasoli. Na podstawie dostępnej nam literatury metodę tę stosowali jedynie do tkanek zwierzęcych Lindner (9), George (3), Ackerman i wsp. (1), (2) i inni.

MATERIAŁ I METODY BADAŃ

Do badań użyto młodych korzeni, łodyg oraz liścieni fasoli (*Phaseolus vulgaris* L.). Nasiona fasoli poddano pęcznieniu przez 1 dobę, a następnie kiełkowaniu na wilgotnej bibule na szalkach Petriego na świetle i w ciemni w temperaturze pokojowej. Do analizy pobierano odcinki 3-dniowych korzonków, łodyżek oraz fragmenty liścieni o tej samej masie.

Badania przeprowadziliśmy stosując metodę chromatografii jednokierunkowej wstępującej oraz chromatografii dwukierunkowej. Na paski bibuły Whatmana nr 3 długości 43 cm i szerokości 11 cm nakładano preparaty na wysokości 7 cm, a następnie rozcierano je na bibule. Chromatogramy umieszczano na przeciąg około 20 godzin w komorach Chropa w parach cieczy rozwijającej o składzie: butanol — kwas octowy lodowaty — woda, w stosunku objętościowym 4 : 1 : 1. Następnie paski bibuły zanurzano w tej cieczy na okres 36 godzin. Po tym czasie paski bibuły suszono, zdejmując uprzednio przyklejone preparaty. Po jednorazowym rozwinięciu rozdział aminokwasów był

tylko częściowy, gdyż współczynniki R_f nie przekraczały wartości 0,5, po powtórnym zaś rozwinięciu plamy rozsunęły się do wysokości 0,7 — 0,75 R_f . Wysuszone paski wywoływano w 0,2% roztworze ninhydryny w absolutnym alkoholu, pozostawiając w ciemni na okres 18—20 godzin. Ponadto do rozdziału aminokwasów znajdujących się w korzeniach zastosowano chromatografię dwukierunkową, ponieważ aminokwasy występujące w nich tworzyły duże, ciemne i zlewające się plamy. W pierwszym rozwijaniu chromatogramu postępowaliśmy podobnie jak w chromatografii jednokierunkowej, stosując arkusz bibuły o wymiarach 47×47 cm. W drugim rozwijaniu chromatogramu w kierunku prostopadłym zastosowaliśmy rozpuszczalnik o składzie: fenol — woda, w stosunku objętościowym 7 : 3.

W badaniach naszych zastosowaliśmy bibułę Whatmana nr 3, ponieważ bibuła ta jest grubsza niż nr 1, a plamy zabarwiają się intensywniej przy mniejszych powierzchniach. Zmiana więc bibuły była konieczna, ponieważ różne aminokwasy występują w nierównych ilościach. Przy użyciu bibuły Whatmana nr 1 plamy odpowiadające dużym stężeniom aminokwasów zajmowały znaczne powierzchnie i następowało ich zlewanie się. Przez zastosowanie bibuły Whatmana nr 3 uzyskano mniejsze powierzchnie plam, jednak znaczne stężenie aminokwasów powodowały zlewanie się ich.

Intensywność zabarwienia poszczególnych aminokwasów podano w tabeli według następującej skali: +, ++, +++, +++++, ++++++. Przy oznakowaniu aminokwasów użyto powszechnie przyjętych skrótów.

WYNIKI BADAŃ

Zastosowanie przez nas metody chromatografii skrawkowej było próbą użycia tej metody do tkanek roślinnych w nieco zmodyfikowanej formie. Otrzymane w naszym doświadczeniu wyniki zostały przedstawione na chromatogramach (ryc. 1 i 2) oraz tabeli 1. W badanych liścieniach, łodyżkach i korzonkach wykiełkowanych na świetle i w ciemni otrzymano różnice w zawartości oraz ilości poszczególnych aminokwasów wolnych i łatwo odszczepiających się. Największą intensywność zabarwienia plam zaobserwowano w korzeniu. W wyhodowanych korzonkach na świetle i w ciemni nie stwierdzono zasadniczych różnic. W łodyżce wykiełkowanej na świetle obserwowano słabsze wybarwienie plam niż w ciemni. Wystąpiły też różnice w zawartości aminokwasów w liścieniu pozostającym na świetle i w ciemni. Ryc. 3 i 4 przedstawia rozdział aminokwasów uzyskanych metodą chromatografii dwukierunkowej w badanych korzonkach. Na chromatogramach widać wyraźny rozdział aminokwasów i intensywność zabarwienia poszczególnych plam ze światła i ciemni taką jak na ryc. 1 i 2.

OMÓWIENIE WYNIKÓW BADAŃ

Do analiz chemicznych czy też biochemicznych używa się badanej substancji najczęściej w ilościach gramowych. Nie zawsze jednak można uzyskać tak dużo materiału wyjściowego. Analiza biochemiczna związana jest również z większą liczbą operacji wymagających długiego czasu oznaczania oraz dużej ilości odczynników. Dlatego — jak podaje w swoich pracach Ackerman (1), (2) — bardzo duże możliwości wykazuje chromatografia skrawkowa, szczególnie w badaniach porównawczych, wymagająca miligramowych ilości substancji wyjściowej (np. Rzeszowska, Frelek, 13). Uzyskane przez nas obserwacje przy użyciu metody

chromatografii skrawkowej do rozdzielenia aminokwasów podobne są do wyników przedstawionych przez Jiračka (5) oraz Lawrence i Granta (8), otrzymanych innymi metodami.

Intensywniejsze plamy na chromatogramie korzonka ze światła, który wcześniej kiełkuje, wskazywałyoby na bardziej wzmożoną translokację aminokwasów z bielma do kiełkującego zarodka. Mocniej zabarwione plamy odpowiadające kwasowi glutaminowemu i treoninie oraz prolinie w korzonku rosnącym na świetle można by tłumaczyć przyspieszoną hydrolizą białek w bielmie. Do kiełkującego korzonka przechodzą z bielma głównie wyżej wymienione aminokwasy, będące końcowymi grupami niektórych białek i z nich w drodze transaminacji powstaje szereg innych aminokwasów (Masłowski, 10). W łodyżce wykiełkowanej na świetle obserwowano słabsze wybarwienie plam niż w ciemni. Prawdopodobnie następuje tu już początkowy okres powstawania chlorofilu, który stwarza bardziej sprzyjające warunki syntezy białek, a tym samym występuje mniejsza ilość aminokwasów.

Należy podkreślić, że metoda chromatografii skrawkowej jest nieco mniej dokładna od metody chromatografii stosowanej do rozdzielenia aminokwasów izolowa-

Tabela 1

Aminokwas	ciemnia			światło		
	korzonek	łodyżka	liścień	korzonek	łodyżka	liścień
izoleucyna						
leucyna	+++++	++	+	+++++	+	+++
fenyloalanina	+++++	-	-	+++	-	++
walina						
metionina	+++++	++	+	+++++	+	+++
tyrozyna						
prolina	++	+	-	+++	+	++
alanina	+	-	-	++	-	++
treonina						
kw. glutaminowy	+++++	+++	+	+++++	+	+++
glicyna		+++	+++		+++	
seryna	+++++					
kw. asparaginowy		++++	++++	+++++	++++	++++
arginina	+++++	++++	+++	++++	++++	+++
histydyna						
ornityna						
lizyna	+++++	+++++	++++	+++++	+++++	+++++
cysteina						

nych z tkanek. Jednakże w badaniach porównawczych staje się prostsza i szybsza dla rozdziału aminokwasów i zarazem wygodniejsza, gdyż daje dobre wyniki przy użyciu minimalnych ilości materiału wyjściowego.

PIŚMIENICTWO

1. Ackerman J., Sarnecka-Keller M.: *Histochemie*, **3**, 89, 1962.
2. Ackerman J.: Skrypt metod histochemicznych pod redakcją Krygier A. i Godlewskiego H., *PZWL*, **43**, 1963.
3. George I. C.: *Exp. Cell. Res.*, **15**, 242, 1958.
4. Grzebiak S., Kulka K.: *Rocz. Nauk Roln.*, **83**, 243–376, 1960.
5. Jiraček V., Kutova J., Leblova-Svobodova S.: *SB. CSAZV, Rost. Vyroba* **8**, 345–346, 1962.
6. Kazarian W. O., Karapetjan K. A.: *Dokł. A. N. Am. SSR.*, **34**, 89–92, 1962.
7. Korohoda J., Waksmundzki A., Wolter J.: *Rocz. Nauk Roln.*, **78**, 667–681, 1958.
8. Lawrence J. M., Grant D. R.: *Plant Physiol.*, **38**, 1, 1963.
9. Lindner I.: *Naturwissenschaften*, **43**, 201, 1956.
10. Masłowski P., Masłowska H., Wierzbicka M.: *Acta Soc. Bot. Pol.*, **36**, 459–466, 1967.
11. Mokronosow A. T., Iwanowa L. W., Zolnikowa W. P.: *Fizjologia roślin*, **6**, 158–164, 1959.
12. Pinegina R. R. I., Klimenko W. G.: *Kiszyniowski Inst.*, **5**, 19–26, 1962.
13. Rzeszowska G., Frelek Z.: *Endokr. Pol.*, **20**, 325–330, 1968.
14. Wolter J.: *Annal. Univ. M. Curie-Skłodowska, Lublin Sec. E.* **19**, 347–379, 1964.

Otrzymano 15.X.1970

OBJAŚNIENIA RYCIN

Ryc. 1. Chromatogramy aminokwasów zawartych w kiełkującej fasoli (*Phaseolus vulgaris* L.) na świetle: 1 – korzeń, 2 – łodyga, 3 – bielmo

Ryc. 2. Chromatogramy aminokwasów zawartych w kiełkującej fasoli (*Phaseolus vulgaris* L.) w ciemni: 1 – korzeń, 2 – łodyga, 3 – bielmo

Ryc. 3. Chromatogram aminokwasów zawartych w korzeniu fasoli (*Phaseolus vulgaris* L.) rosnącym na świetle: 1 – Cysteina, 2 – Lizyna, 3 – Ornityna, 4 – Histrydina, 5 – Arginina, 6 – Seryna, 7 – Glicyna, 8 – Kw. glutaminowy, 9 – Treonina, 10 – Kw. asparaginowy, 11 – Alanina, 12 – Prolina, 13 – Tyrozyna, 14 – Metionina, 15 – Walina, 16 – Fenylalanina, 17 – Izoleucyna, 18 – Leucyna

Ryc. 4. Chromatogram aminokwasów zawartych w korzeniu fasoli (*Phaseolus vulgaris* L.) rosnącym w ciemni. Objasnienia jak na ryc. 3

РЕЗЮМЕ

Полытка применения метода срезовой хроматографии для растительных тканей в сравнительных исследованиях может быть использована для определения изменений содержания и количества аминокислот. При исследованиях получены различия между хроматограммами корней, стеблей и Эндоспермы фасоли (*Phaseolus vulgaris* L.), прорастающей на свету и в темноте.

SUMMARY

The application of tissue paper chromatography to plant tissues in comparative studies seems to be very helpful for tracing the changes in the content and amount of particular amino acids. In the present studies there have been shown the differences between the chromatograms of roots, stalk and endosperm of a bean (*Phaseolus vulgaris* L.) germinating in the light and in the dark.

EXPLANATION OF FIGURES

Fig. 1. Chromatograms of amino acids present in a bean (*Phaseolus vulgaris* L.) germinating in the light; 1 — root, 2 — stalk, 3 — endosperm

Fig. 2. Chromatograms of amino acids present in a bean (*Phaseolus vulgaris* L.) germinating in the dark; 1 — root, 2 — stalk, 3 — endosperm

Fig. 3. A chromatogram of amino acids present in the root of a bean (*Phaseolus vulgaris* L.), growing in the light; 1 — cysteine, 2 — lysine, 3 — ornithine, 4 — histidine, 5 — arginine, 6 — serine, 7 — glycine, 8 — glutamic acid, 9 — threonine, 10 — asparaginic acid, 11 — alanine, 12 — proline, 13 — tyrosine, 14 — methionine, 15 — valine, 16 — phenylalanine, 17 — isoleucine, 18 — leucine

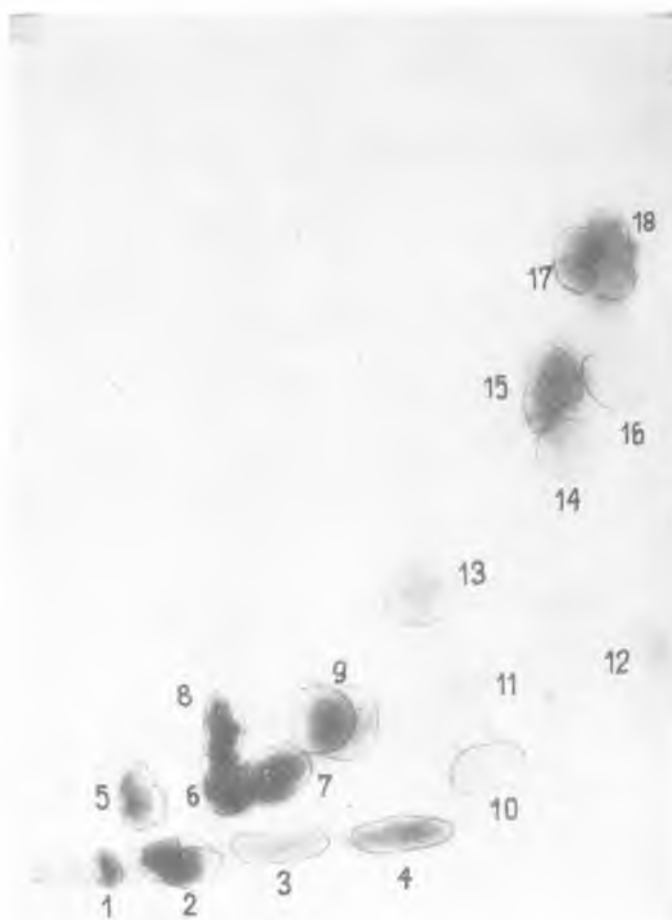
Fig. 4. A chromatogram of amino acids present in the root of a bean (*Phaseolus vulgaris* L.), growing in the dark. For explanation see Fig. 3



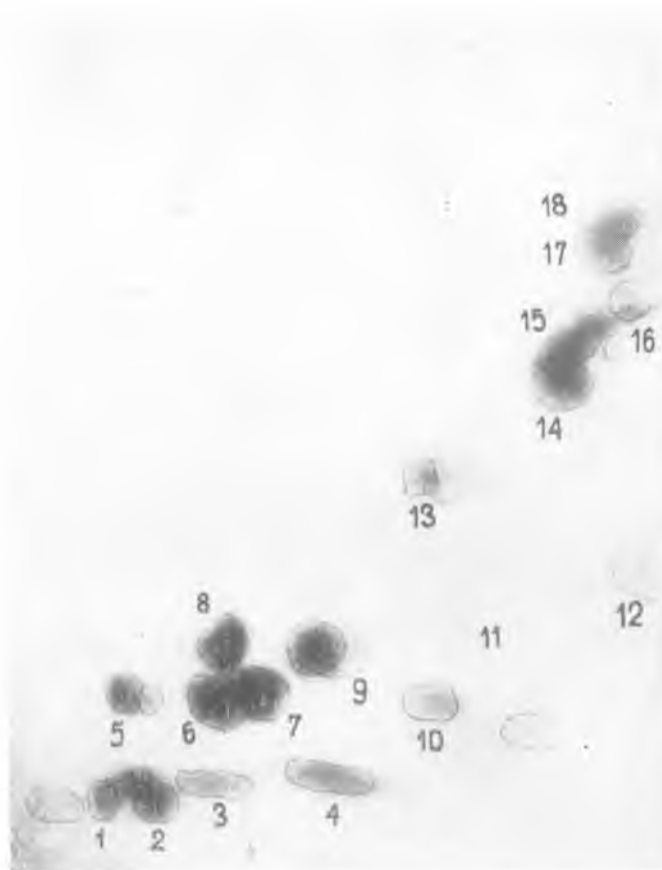
Ryc. 1



Ryc. 2



Ryc. 3



Ryc. 4

