ACTA AGROBOTANICA
Vol. XXXII, z. 2 — 1979
173-183

Rybonukleaza w korzeniach i węzłach krzewienia dwóch odmian jęczmienia

HALINA SKOCZEK i MICHAŁ BORYS

Instytut Przyrodniczych Podstaw Produkcji Roślinnej, Zakład Fizjologii Roślin
Akademia Rolnicza w Poznaniu

(Przyjęto dn. 19 VII 1978 r.)

H. Skoczek and M. Borys (*Institute of Natural Bases for Plant Production, Department of Plant Physiology, Academy of Agriculture, Wołyńska 35, 60-637 Poznań, Poland*). Acta Agrobotanica 32 (2): 173-183, 1979.

Ribonuclease in roots and nodes of two barley cultivars

Cultivar Union which, compared with cultivar Lubuski has a larger root system, was found to show a significantly higher RNase activity.
The nodes of cv. Union show a lower RNase activity per gram of tissue fresh weight and a higher specific activity, in comparison with cv. Lubuski. The number of RNase isoenzymes in the roots of both examined cultivars is the same. No difference in the number of RNase isoenzymes between the nodes of the examined cultivars was found either. On the other hand, certain differences between the examined cultivars in some RNase isoenzymes activities were observed in the analysed parts of the plants.

WSTĘP

Z prac dotyczących rybonukleazy (RNazy) w korzeniach wiadomo o występowaniu kilku typów tego enzymu. Wilson (1967, 1968 a i b, 1971) wyodrębnił w korzeniach kukurydzy 3 rodzaje enzymów degradujących RNA: RNazę I występującą we frakcji rozpuszczalnej homogenatu tkankowego, RNazę II związaną z mikrosomami oraz nukleazę I towarzyszącą dużym organellom komórkowym, degradującą zarówno RNA jak i DNA. W obrębie każdej klasy Wilson (1969, 1971) zidentyfikował kilka izoenzymów RNazy.

W poszczególnych odcinkach korzeni stwierdzono różne aktywności RNazy. Robinson i Cartwright (1958) w korzeniach bobu i Maroti (1969) w korzeniach kukurydzy zaobserwowali, że wyższa aktywność RNazy występuje w komórkach o intensywnym metabolizmie — w strefie elongacji i różnicowania.

RNazy odgrywają znaczną rolę we wzroście tkanek roślinnych poprzez udział w metabolizmie kwasów nukleinowych. Stwierdzono wielokrotnie zależność między aktywnością RNazy a ilością RNA w tkankach (Dove 1973; Bryant i in. 1976). Ledoux i in. (1971) zaobserwowali w siewkach jęczmienia wprost proporcjonalną zależność między wzrostem aktywności RNazy rozpuszczalnej a zawartością RNA. Przy spadku aktywności enzymu malała ilość RNA, a wzrastał poziom kwaśnych produktów degradacji kwasów nukleinowych w badanym materiale roślinnym. Na udział RNazy we wzroście wskazują również prace dotyczące zmian w aktywności RNazy podczas rozwoju zarodków w kiełkujących nasionach żyta (Siwecka i in. 1971, 1973, 1977).

Ze względu na rolę, jaką odgrywają RNazy we wzroście tkanek roślinnych, uznano za celowe określenie aktywności RNazy w korzeniach i węzłach krzewienia u dwóch odmian jęczmienia różniących się wielkością systemu korzeniowego (Krzywański i in. cz. IV 1976) oraz morfologią i aktywnością wzrostową głównego węzła krzewienia. Ponadto w niniejszej pracy określono skład izoenzymów RNazy w korzeniach i węzłach, dla badanych odmian jęczmienia, w celu określenia specyficzności odmianowej wspomnianego składu.

MATERIAŁ I METODY

Do doświadczeń użyto nasiona jęczmienia jarego odmiany Union i Lubuski ze zbiorów w 1973 roku. Nasiona sterylizowano w 16% H_2O_2 przez 20 min, 4 godz. płukano pod bieżącą wodą, a następnie podkiełkowywano na wilgotnej bibule w pokoju laboratoryjnym przez 48 godzin. Skiełkowane nasiona o wyrównanej sile wzrostu kiełków przenoszono do pudełek plastikowych na bagietki zanurzone w wodzie destylowanej. Po 6 dniach kiełkowania przenoszono siewki do hodowli w kulturach wodnych. Hodowlę prowadzono w sposób opisany we wcześniejszej pracy (Krzywański i in. cz. II i IV 1976). Rośliny rosły w wazonach od 4.03.77 r. do 21.04.1977 r.

Przed przystąpieniem do ekstrakcji enzymu korzenie płukano najpierw w wodzie bieżącej, potem w destylowanej i obsuszano na bibule. Następnie ucinano korzenie i węzły krzewienia (wielkość węzła około 0,5 cm). Do ekstrakcji enzymów brano korzenie z 2 do 3 roślin jęczmienia oraz tkankę węzłów o masie około 4 gramów.

Wykonano po 3 powtórzenia ekstrakcji RNazy z korzeni oraz po 2 powtórzenia ekstrakcji enzymu z węzłów dla każdej odmiany jęczmienia.

Stosowano bufor ekstrakcyjny zawierający 50 mM cytrynian o pH 6,1 i 0,5 M sacharozę. Stosunek buforu do tkanki wynosił każdorazowo 2 : 1. Rozdrobniony materiał roślinny ucierano w moździerzu w temperaturze 2°C przez 12 minut. Homogenat wirowano 20 min. przy 35 000 g,

a następnie 1,5 godz. przy 110 000 g. Uzyskany supernatant stanowił źródło RNazy.

W preparatach oznaczono białko metodą Lowry i in. (1951) stosując BSA frakcję V jako standard.

Aktywność RNazy badano zmodyfikowaną metodą Tuve i Anfinsen (1960). Mieszanina inkubacyjna zawierała: 0,2/0,1 M bufor fosforanowo-cytrynianowy o pH 6,4 (optimum pH dla aktywności RNazy w badanym materiale roślinnym), 1,6 mg/ml drożdżowego RNA firmy Sigma i enzym. Mieszaninę inkubowano w temperaturze 37°C przez 30 minut. Reakcję zatrzymywano przez dodanie 0,5 ml 25% kwasu nadchlorowego zawierającego 0,75% octanu uranylu. Mieszaninę oziębiano w łaźni z lodem przez 15 min, a następnie odwirowywano. Supernatant rozcieńczano 19 razy wodą destylowaną i oznaczano absorbcję w 260 nm w kuwetach o grubości 1 cm. Jednostkę aktywności enzymu stanowił przyrost wartości absorbcji o 0,1 dla części kwasorozpuszczalnej w warunkach doświadczenia.

Rozdział izoenzymów RNazy przeprowadzono metodą Davisa (1964). RNazy identyfikowano na żelach w oparciu o metodę Wilsona (1971), przy czym do inkubacji żelu po rozdzieleniu RNazy używano 0,2/0,1 M buforu fosforanowo-cytrynianowego o pH 6,4.

OMÓWIENIE WYNIKÓW

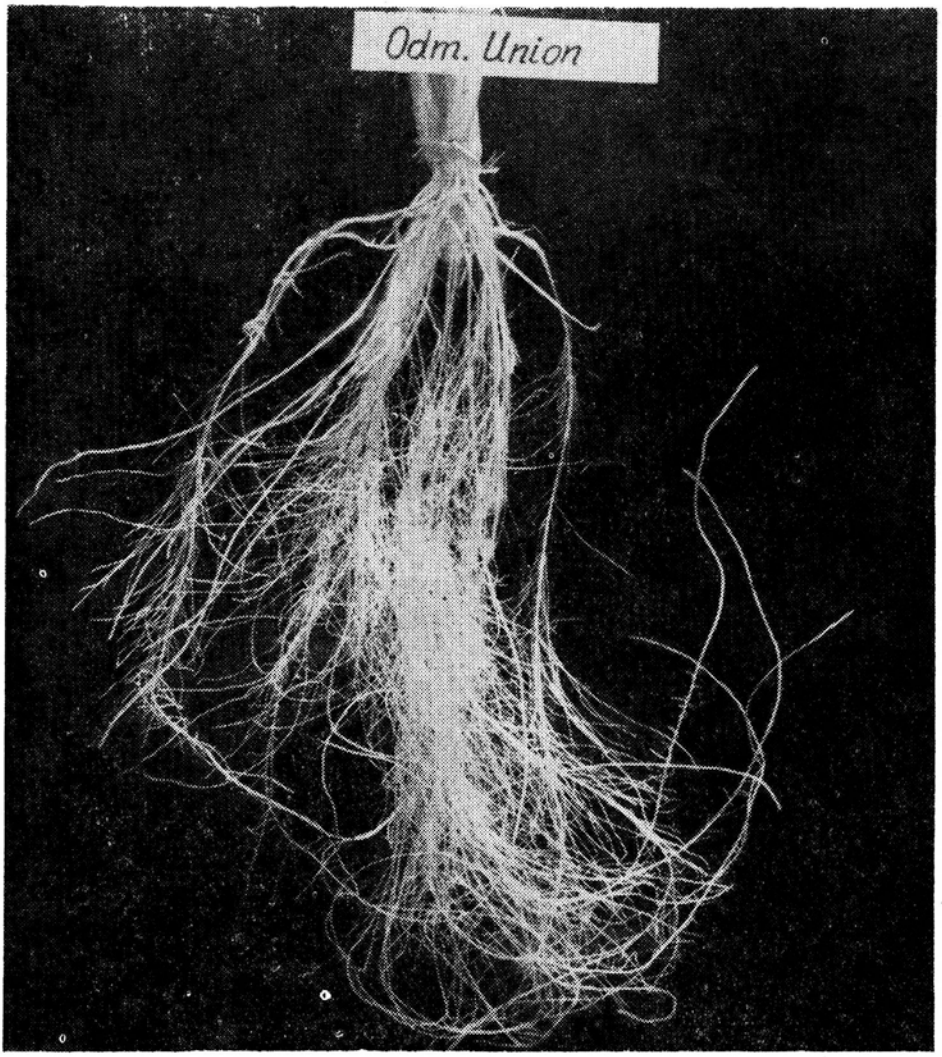
Uzyskane wyniki z pomiarów aktywności RNazy w korzeniach zebrano w tabelach 1 i 2. Skład izoenzymowy RNazy w badanym materiale roślinnym przedstawiają rysunki 5 i 6. Rysunki 1 i 2 ilustrują uzyskane w hodowli w kulturach wodnych typowe pokroje systemów korzeniowych badanych odmian jęczmienia.

W korzeniach jęczmienia stwierdzono wyższą aktywność RNazy u odmiany Union (tab. 1), co jest skorelowane z występowaniem większej masy

Tabela 1 — Table 1

Aktywność RNazy w korzeniach jęczmienia odmian Union i Lubuski
Activity of RNases in roots of barley cvs. Union and Lubuski

Korzenie Roots	Białko Protein (mg/ml)	Aktywność RNazy — RNase activity		
		jedn./ml/30′ units/ml/30′	jedn./mg białka units/mg protein	jedn./g świeżej masy units/g fresh weight
Union	1,47	392	272	969
Lubuski	1,37	188	140	477

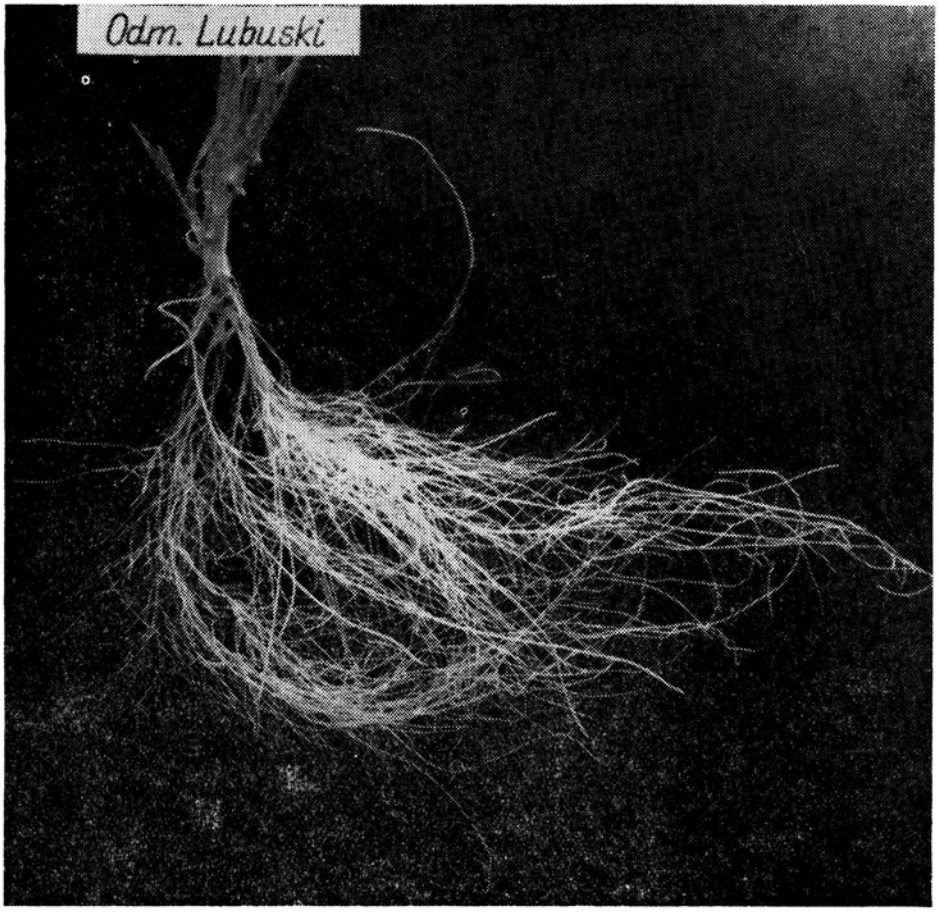


Rys. 1. Pokrój systemu korzeniowego i wyrastanie korzeni przybyszowych z węzła krzewienia u odmiany Union

Fig. 1. The form of the root system and adventitious roots growth from node of cultivar Union

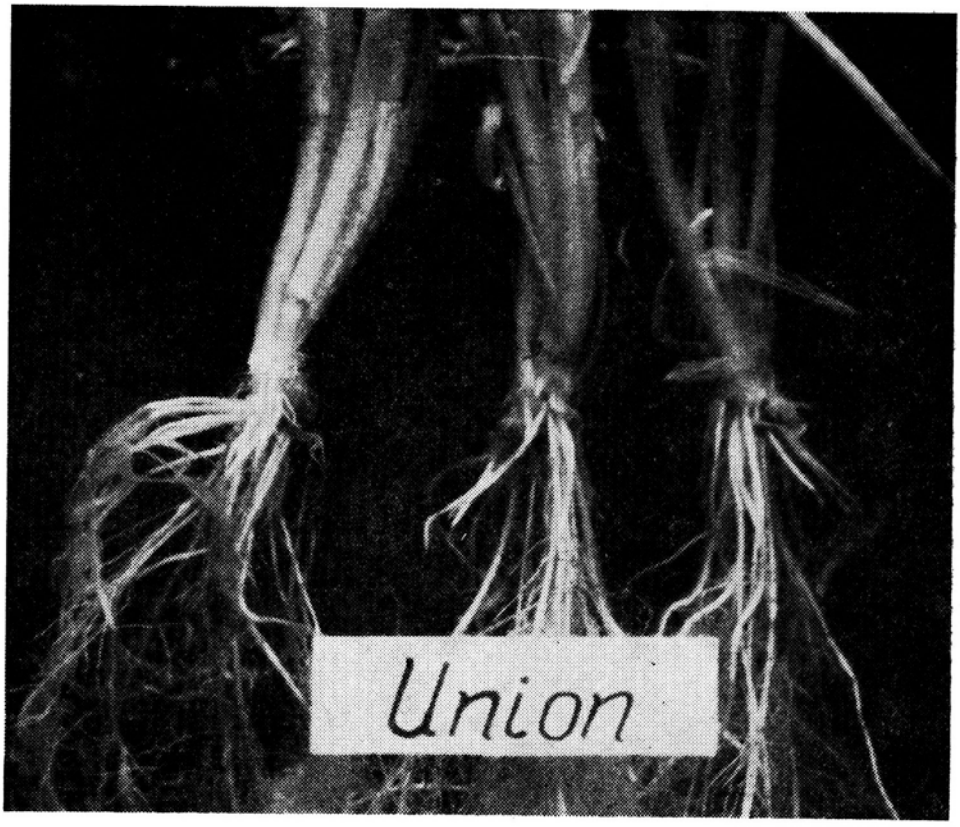
korzeni u tej odmiany w porównaniu z odmianą Lubuski (średnia świeża masa 1 systemu korzeniowego u odmiany Union wynosiła 3,76 g, a u odmiany Lubuski 2,11 g.). Krzywański i in. (cz. IV 1976) stwierdzili również w korzeniach odmiany Union w porównaniu z odmianą Lubuski wyższą aktywność oksydazy IAA i peroksydazy.

Liczba izoenzymów RNazy w korzeniach obu odmian jęczmienia jest jednakowa. Zaobserwowano jedynie różnice w aktywności 5 izoenzymów



Rys. 2. Pokrój systemu korzeniowego i wyrastanie korzeni przybyszowych z węzła krzewienia u odmiany Lubuski
Fig. 2. The form of the root system and adventitious roots growth from node of cultivar Lubuski

RNazy (rys. 5 i 6). Przypuszczalnie wzrost aktywności tej RNazy u odmiany Lubuski wiąże się z postępującymi procesami starzenia korzeni u tej odmiany. W systemie korzeniowym odmiany Lubuski przeważają korzenie starsze, a młode korzenie przybyszowe, wyrastające z węzłów krzewienia, występują w niewielkiej ilości (rys. 2). Zaobserwowano w jednym z doświadczeń, że w starych korzeniach (po 3,5 miesiącach wzrostu jęczmienia odmiany Lubuski w kulturach wodnych w okresie zimowym), przy braku młodych korzeni bocznych, znacznie wzrastała aktywność izoenzymu 5, pozostałe izoenzymy RNazy były natomiast słabo widoczne na żelu. Nasuwa się pewna analogia z wynikami Sahulki (1971), który stwierdził w starzejących się liściach bobu, w porównaniu z młodymi liśćmi,



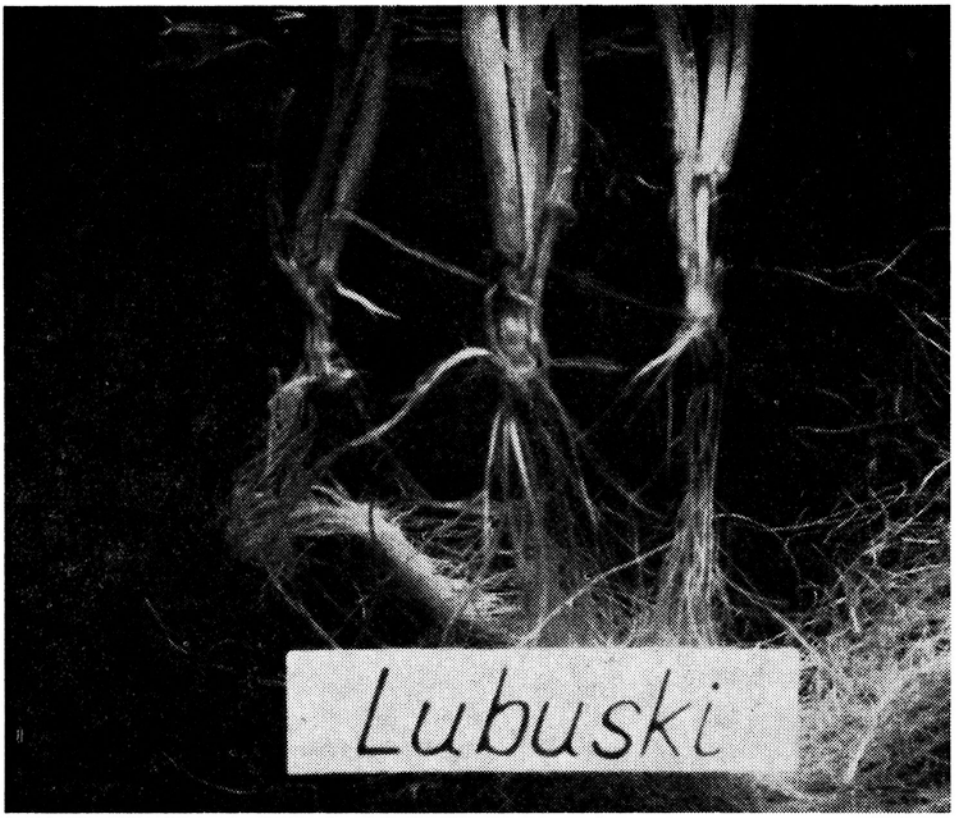
Rys. 3. Morfologia węzłów krzewienia odmiany jęczmienia Union
Fig. 3. Morphology of barley nodes cultivar Union

wzrost aktywności (rozszerzenie się pasma na żelu) izoenzymu o najmniejszej ruchliwości elektroforetycznej, a ponadto pojawienie się dodatkowej izo-RNazy. Schulka (1971) nie stwierdził zmniejszania się aktywności pozostałych izo-RNaz.

W kształtowaniu systemu korzeniowego jęczmienia dużą rolę odgrywa główny węzeł krzewienia. Badane odmiany jęczmienia wyraźnie różnią się morfologią i aktywnością węzła krzewienia (rys. 3 i 4).

Odmiana Union ma główny węzeł krzewienia grubszy, odznaczający się dużą aktywnością wzrostową. Wyrastają z niego liczne korzenie przybyszowe, które przyczyniają się do zwiększenia masy systemu korzeniowego tej odmiany (rys. 1 i 3). U odmiany Lubuski węzeł krzewienia jest cieńszy, o odmiennej morfologii. Z licznych zawiązków korzeni, jakie są widoczne na tym węźle, tylko w niewielkim stopniu wyrastają korzenie przybyszowe (rys. 2 i 4).

Nie jest znany mechanizm regulujący wyrastanie korzeni przybyszowych z węzła krzewienia u obu odmian jęczmienia. Wiadomo jednakże,



Rys. 4. Morfologia węzłów krzewienia odmiany jęczmienia Lubuski
Fig. 4. Morphology of barley nodes cultivar Lubuski

że węzeł jest tkanką bardzo aktywną biochemicznie. Stwierdzono w niej, w porównaniu z innymi częściami roślin jęczmienia, najwyższą aktywność oksydazy IAA, bardzo wysoką aktywność peroksydazy i największą liczbę izoenzymów peroksydazy oraz wysoką zawartość cytokininową (Krzywański i in. 1976; Stroiński i in. 1976; Jeske i in. 1977).

W węzłach krzewienia u odmiany Lubuski, w porównaniu z odmianą Union, stwierdzono nieco wyższą aktywność RNazy (tab. 2). Na uwagę zasługuje fakt, że u odmiany Lubuski w węzłach krzewienia, w porównaniu z korzeniami, aktywność RNazy w przeliczeniu na gram świeżej masy tkanki jest ponad 50% wyższa (tab. 1 i 2).

W węzłach, podobnie jak w korzeniach, nie stwierdzono występowania różnic w składzie izoenzymów RNazy między badanymi odmianami (rys. 5 i 6). Pewne różnice ilościowe dotyczą izoenzymu 3. Przypuszczalnie aktywność tej izo-RNazy jest uwarunkowana ilością występujących na węzłach zawiązków korzeniowych. W węzłach odmiany Lubuski, gdzie liczba zawiązków korzeniowych, z których nie wyrastają korzenie przyby-

Tabela 2 — Table 2

Aktywność RNazy w węzłach krzewienia odmian jęczmienia Union i Lubuski
Activity of RNase in nodes of barley cvs. Union and Lubuski

Węzły krzewienia Nodes	Białko Protein (mg/ml)	Aktywność RNazy — RNase activity		
		jedn./ml/30′ units/ml/30′	jedn./mg białka units/mg protein	jedn./g świeżej masy units/g fresh weight
Union	2,35	449	187	838
Lubuski	3,20	506	158	930

szowe, jest większa, prążek 3 jest jaśniejszy na żelu (większa aktywność izoenzymu).

Z danych zawartych w tej pracy wynika pewna zależność między poziomem RNazy a aktywnością wzrostową badanej tkanki. Odmiana jęczmienia posiadająca większą masę systemu korzeniowego ma wyższą aktywność RNazy. Można więc przypuszczać, że poziom aktywności RNazy frakcji rozpuszczalnej homogenatu tkankowego może być miernikiem intensywności wzrostu systemu korzeniowego jęczmienia.

Wyższa aktywność RNazy w węzłach krzewienia w przeliczeniu na gram świeżej masy występuje u odmiany Lubuski, gdzie węzły odznaczają się niewielkim wyrastaniem korzeni przybyszowych. Mamy tu do czynienia z potencjalną aktywnością wzrostową (liczne zawiązki korzeniowe), która w danych warunkach doświadczalnych nie realizuje się. Dalsze badania wykażą, czy jest to prawidłowość ogólna, czy też przypadkowa zbieżność w badanym, ograniczonym materiale.

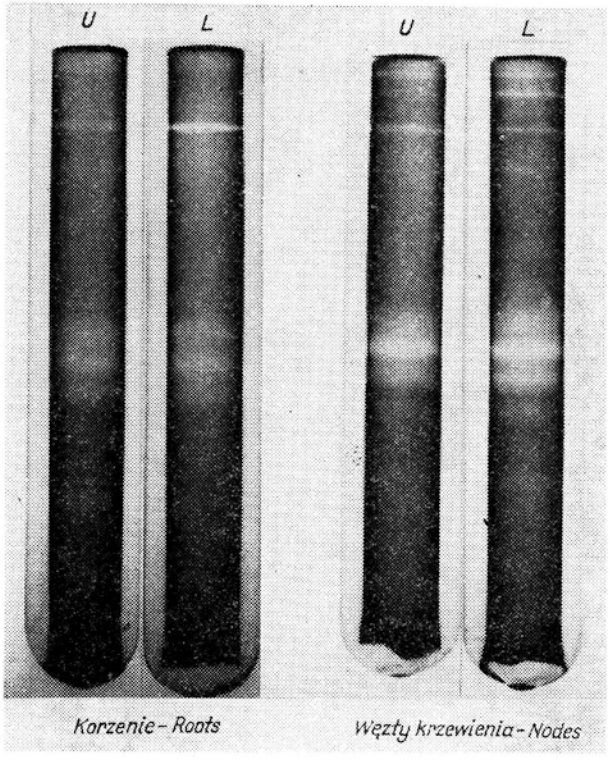
STRESZCZENIE I WNIOSKI

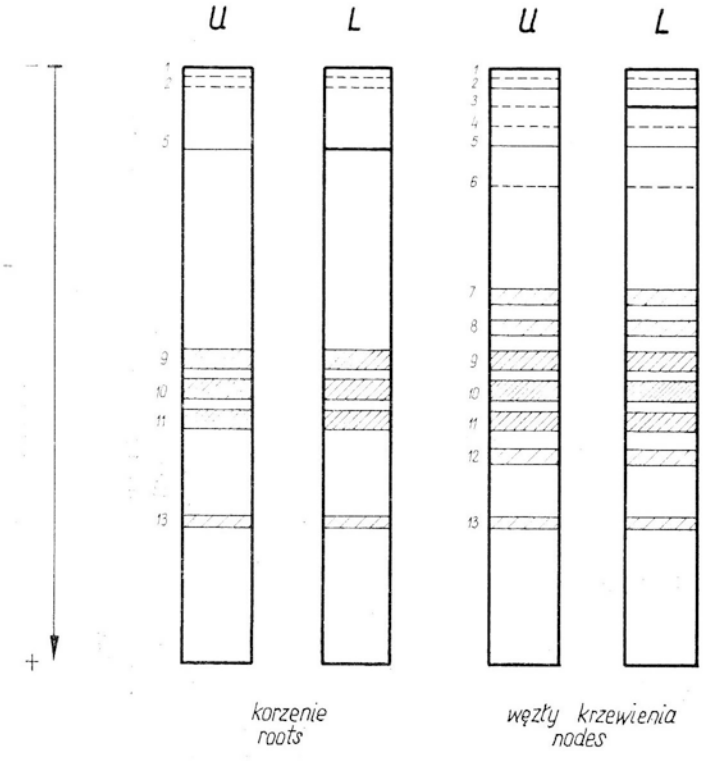
Zbadano aktywność i skład izoenzymowy RNazy w korzeniach i węzłach krzewienia u dwóch odmian jęczmienia jarego Union i Lubuski, różniących się wielkością systemu korzeniowego i morfologią głównego węzła krzewienia.

1. U odmiany Union, która w porównaniu z odmianą Lubuski posiada większy system korzeniowy, stwierdzono zdecydowanie wyższą aktywność RNazy.

2. Węzły krzewienia u odmiany Union w porównaniu z odmianą Lubuski posiadają niższą aktywność RNazy w przeliczeniu na gram świeżej masy tkanki oraz wyższą aktywność specyficzną.

3. Liczba izoenzymów RNazy w korzeniach obu odmian jęczmienia





Rys. 5. Izoenzymy RNazy z korzeni i węzłów krzewienia dwóch odmian jęczmienia: Union (U) i Lubuski (L). (Na żel nakładano 200 mg białka)

Fig. 5. RNase isoenzymes from the roots and nodes of two barley cultivars: Union (U) and Lubuski (L). (200 mg of protein were placed on gel)

Rys. 6. Schematyczna ilustracja elektroferogramów przedstawionych na rys. 5

Fig. 6. Schematic illustration of electropherograms shown in Fig. 5

jest jednakowa. Nie stwierdzono też różnic w ilości izoenzymów RNazy w węzłach badanych odmian.

4. Zaobserwowano między badanymi odmianami pewne różnice w aktywności niektórych izoenzymów RNazy w analizowanych częściach jęczmienia.

SUMMARY

The RNase activity and isoenzymatic composition in the roots and nodes of two spring barley cultivars: Union and Lubuski, differing in the size of the root system and morphology of the tiller node, was examined.

Cv. Union which, compared with cv. Lubuski has a larger root system, was found to show a significantly higher RNase activity.

The nodes of cv. Union show a lower RNase activity per gram of tissue fresh weight and a higher specific activity, in comparison with cv. Lubuski.

The number of RNase isoenzymes in the roots of both examined cultivars is the same. No difference in the number of RNase isoenzymes between the nodes of the examined cultivars was found either. On the other hand, certain differences between the examined cultivars in some RNase isoenzymes activities were observed in the analysed parts of the plants.

LITERATURA

Bryant J. A., Greenway S. C., West G. A., 1976. Development of nuclease activity in cotyledons of *Pisum sativum* L. Planta (Berl.) 130: 137-140.

Davis B. J., 1964. Disc electrophoresis. II Method and application to human serum proteins. Ann. NY. Acad. Sci. 121: 404-427.

Dove L. D., 1973. Ribonucleases in vascular plants: cellular distribution and changes during development. Phytochem. 12: 2561-2570.

Jeske G., Borys M., Krzywański Z., Stroiński A., 1977. Dziedziczenie systemów korzeniowych jęczmienia. VI. Aktywność cytokininowa korzeni i części nadziemnych jęczmienia. Prace Kom. Nauk. Roln. i Kom. Nauk Leśnych 43: 99-107.

Krzywański Z., Wójcik-Wojtkowiak D., Borys M., Stroiński A., Wojciechowski J., 1976. Dziedziczenie systemów korzeniowych jęczmienia. II. Wskaźniki rozmiarów systemu korzeniowego odmian Gryf, Lubuski i Skrzeszowicki rosnących w kulturach wodnych. Prace Kom. Nauk Roln. i Kom. Nauk Leśnych 41: 232-238.

Krzywański Z., Stroiński A., Wójcik-Wojtkowiak D., Borys M., 1976. Dziedziczenie systemów korzeniowych jęczmienia. IV. Aktywność oksydazy IAA i peroksydazy w różnych częściach roślin sześciu odmian jęczmienia. Prace Kom. Nauk Roln. i Kom. Nauk Leśnych 41: 245-250.

Ledoux L., Galand P., Huart R., 1962. Nucleic acid and protein metabolism of barley seedlings. I. The parallelism between ribonucleic acid content and ribonuclease activity. Biochim. Biophys. Acta 55: 97-104.

Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randall R. J., 1951. Protein measurment with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275.

Maroti M., 1969. The cytological indicators of root growth VI. Changes of ribonuclease activity in the cells of root segments. Acta biol. Acad. Sci. Hung. 20: 263-268.

Robinson E., Cartwright P. M., 1958. Nucleolytic enzymes in growing root cells. Journ. Exp. Bot. 9: 430-435.

Sahulka J., 1971. Electrophoretic investigation of ribonuclease in roots and leaves of *Vicia faba* (L.). Biol. Plant. 13: 243-246.

Siwecka M. A., Szarkowski J. W., 1971. The distribution of nucleolytic activity in organellae of rye embryos and seedling (*Secale cereale*). Bull. Acad. Polon. Sci. Ser. Biol. 19: 445-449.

Siwecka M. A., Gołaszewski T., Szarkowski J. W., 1973. The decrease of ribosome bound ribonucleolytic activity during rye embryo germination. Bull. Acad. Polon. Sci. Ser. Biol. 21: 171-175.

Siwecka M. A., Gołaszewski T., Szarkowski W., 1977. Association of ribonucleolytic activity with rye embryo ribosomes. Bull. Acad. Polon. Sci. Ser. Biol. 25: 15-19.

Stroiński A., Krzywański Z., Borys M., Wójcik-Wojtkowiak D., 1976. Dziedziczenie systemów korzeniowych jęczmienia. V. Charakterystyka odmianowa składu izoenzymów różnych części rośliny. Prace Kom. Nauk Roln. i Kom. Nauk Leśnych. 41: 251-256.

Tuve T. W., Anfinsen Ch. B., 1960. Preparation and properties of spinach ribonuclease. Journ. Biol. Chem. 235: 3437-3441.

Wilson C. M., 1967. Purification of a corn ribonuclease. Journ. Biol. Chem. 242: 2260-2263.

Wilson C. M. 1968a. Plant nucleases. I. Separation and purification of two ribonucleases and one nuclease from corn. Plant Physiol. 43: 1332-1338.

Wilson C. M., 1968b. Plant nucleases. II. Properties of corn ribonucleases I and II and corn nuclease I. Plant Physiol. 43: 1339-1346.

Wilson C. M., 1969. A rapid staining technique for detection of RNase after polyarylamide gel electrophoresis. Anal. Bioch. 31: 506-511.

Wilson C. M., 1971. Plant nucleases. III. Polyacrylamide gel electrophoresis of corn ribonuclease isoenzymes. Plant Physiol. 48: 64-68.