Badania nad zależnością między zawartością kwasów nukleinowych i białek a szybkością wzrostu korzeni kukurydzy

Studies on the contents of nucleic acids and the proteins and the rate of elongation of corn roots

P. MASŁOWSKI, H. MASŁOWSKA, M. WIERZBICKA

WSTĘP

Liczne badania przeprowadzone na mikroorganizmach wykazały, że szybkość syntezy białek u bakterii mierzona szybkością wzrostu, jest prostą liniową funkcją zawartości RNA (Wade 1952; Schaechter, Maate, Kjeldgaard 1958; Niedhardt, Magasanik 1960). Stwierdzenie natomiast tej zależności w komórkach roślin wyższych napotyka na poważne trudności, związane głównie z kompleksowością wzrostu i różnicowania się komórek. Dlatego też prac na ten temat jest stosunkowo niewiele, przy czym uzyskane wyniki są często sprzeczne. Na podkreślenie zasługują tutaj badania Portera (1953), Potopowa i Maroti (1956), Woodstocka i Skooga (1960), Ingle i Hagemana (1964).

Potopow i Maroti po raz pierwszy wykazali zależność między podziałem komórek a szybkością metabolizmu fosforu rybonukleinowego w korzeniach sadzonek grochu.

Porter natomiast, badając wpływ kwasu rybonukleinowego i auksyn na wzrost korzeni kukurydzy stwierdził, że kwas ten jest czynnikiem limitującym proces wydłużania się komórek. Podobne wyniki uzyskali Woodstock i Skoog w przypadku korzeni linii wsobnych kukurydzy, przy czym stwierdzili także ścisłą liniową zależność między zawartością RNA a szybkością wzrostu korzeni.

Wyniki te, nie zostały jednak później w pełni potwierdzone przez Ingle i Hagemana.

Ta różnorodność i sprzeczność wyników skłoniła nas do przeprowadzenia badań mających na celu:

- 1) Uzyskanie dokładniejszych danych o zależności między szybkością wzrostu a zawartością RNA i białek w komórkach korzeni kukurydzy,
- 2) Sprawdzenie, czy stężenie DNA jest cechą odmianową.

Badania przeprowadzono w oparciu o własny materiał badawczy i własną technikę analityczną.

MATERIAŁ I METODY

Materiał

Do badań użyto cztery odmiany kukurydzy w stopniu superelity: „Przebédowska Biała”, „Wigor”, „Wielkopolanka” i „IHAR 206”.

Ziarna kukurydzy selekcionowano, układano w kuwetach porcelanowych wyłożonych bibułą filtracyjną, nasyconą wodą destylowaną i kiełkowano w ciemności, w temp. 28°C.

Po 48 godz., gdy korzonki uzyskały długość 12–16 mm pobierano kiełkujące ziarna posiadające korzonki o długości 15 mm i wkładano do otworków wywierconych w parafinowanej gazie, przykrywającej duże krystalizatory napełnione wodnym roztworem 10^{-4} M chlorku wapnia.

Średnią szybkość wzrostu, wyrażoną w mm/godz. określano drogą pomiaru długości korzeni 100 kiełkujących ziaren, z dokładnością do 0,5 mm, przed i po 4-godzinnym okresie wzrostu. Natychmiast po wykonaniu tych pomiarów, korzenie umieszczano na wyskalowanej linijce plastikowej i pod lupą odcinano żyłką — licząc od wierzchołków — 5 mm segmenty.

Do oznaczenia kwasów nukleinowych i białek pobierano po 60 sztuk 5 mm korzonków, do suchej masy — $2\times$ po 20 korzonków. Pięciomilimetrowe odcinki korzeni zarodkowych, przeznaczone do analizy na kwasy nukleinowe umieszczano w 10 ml zimnego (0°C) 95% etanolu, natomiast korzonki przeznaczone do określenia suchej masy i białka — w wodzie podwójnie destylowanej i chłodzonej lodem.

Świeżą masę oznaczano wagowo po osuszeniu korzonków bibułą filtracyjną, natomiast suchą masę — po ogrzaniu przez 24 godz. w temp. 65°C.

Ekstrakcja kwasów nukleinowych

Ekstrakcję kwasów nukleinowych przeprowadzano wg metody Niemana i Poulsena (1963) w modyfikacji własnej dotyczącej głównie czasu ekstrakcji.

Wyżej wymienieni autorzy izolowali kwasy nukleinowe metodą Schmidta i Thannhausera (1954) 0,3 N KOH, 18 godz. w temp. 30°C i stężenie ich obliczali bezpośrednio ze wzoru podanego przez Chargraffa (1948). Jak stwierdziliśmy, tego rodzaju postępowanie może być przyczyną dużego błędu, szczególnie że długotrwała hydroliza RNA w środowisku alkalicznym prowadzi do degradacji białek, które utrudniają pomiary spektrofotometryczne, jak też fosforu i rybozy. Należy przy tym podkreślić, że określone ilości kwasu rybonukleinowego na podstawie zawartości rybozy w przypadku materiału roślinnego może prowadzić do poważnego błędu, dochodzącego jak wykazał Heber (1963) do 100%.

Nie dała też zadowalających wyników metoda dwóch długości fal wg Tsaneva i Markova (1960).

Najlepsze natomiast wyniki uzyskaliśmy stosując skrócony czas hydrolizy alkalicznej RNA do jednej godziny według metody Scotta, Fraccastoro i Tafta (1956) oraz Flecka i Munro (1962). Metoda ta umożliwia wystarczająco dokładny

rozdział RNA i DNA, przy czym hydrolizaty RNA były prawie całkowicie pozabawione produktów degradacji białek, co zostało stwierdzone na podstawie max. i min. absorpcji UV i metodą Lowry (1951). Umożliwia to ilościowe oznaczanie RNA spektrofotometrycznie przy zastosowaniu jednej długości fali (260 m μ), co w dużym stopniu upraszcza i skraca czas analizy.

W naszym przypadku postępowano w ten sposób, że fragmenty korzonków, natychmiast po ich spreparowaniu i umieszczeniu w etanolu, rozdrabniano w chłodniczym homogenizatorze szklanym. Następnie przenoszono ilościowo do probówek wirowniczych i wirowano 10 min. w temp. 2°C przy 3000 obr./min. Supernatant odrzucano, osad ekstrahowano kolejno: 10 ml chłodzonego metanolu — 2 razy, 50% etanolem zakwaszonym do pH 4,5 kwasem octowym lodowatym — 2 razy, 0,2 N HClO₄ oziębionym do 2°C — 2 razy, przy czym mieszaninę przed odwirowaniem przechowywano 30 min. w temp. 2°C. Osad, po odwirowaniu w chłodzonej wirówce przy 3000 obr./min. zadawano mieszaniną etanol — eter (3:1) i ogrzewano do wrzenia ok. 30 sek. Ekstrakcję powtarzano dwukrotnie.

Pozostałość po odwirowaniu przemywano jednorazowo eterem w temperaturze pokojowej, a po usunięciu eteru rozpuszczano w 5 ml 0,3 N KOH i hydrolizowano przez 1 godzinę w temp. 37°C. Osad otrzymany po odwirowaniu, przemywano dwukrotnie 5 ml 0,3 N KOH. Supernatant i płyny z przemycia zlewano razem i dopełniano 0,3 N KOH do objętości 10 ml, zakwaszano kwasem nadchlorowym do pH 1 i przechowywano w temp. 0°C przez 2 godziny.

Po odwirowaniu osadu zawierającego DNA-białko, przemywano go 2 ml 1 N kwasu nadchlorowego, a ciecz z przemycia łączono z supernatantem zawierającym frakcję RNA. Przemywanie DNA powtarzano aż do zaniku nukleotydów RNA w supernatancie (badając gęstość optyczną). Zwykle przy drugim zawieszeniu DNA w kwasie nadchlorowym, stężenie ich było prawie nieuchwytnie.

Końcowy ekstrakt RNA dopełniano do 100 ml kwasem nadchlorowym o pH 1.

Osad zawierający DNA-białko hydrolizowano 15 min. 3 ml 0,5 N HClO₄ w temp. 70°C, wirowano, a następnie wytrącone białko przemywano dwukrotnie 2 ml 0,5 N HClO₄ w temp. 2°C.

Ciecze z przemycia dodawano do frakcji DNA znajdującej się w supernatancie i uzupełniano 0,5 N HClO₄ do objętości 25 ml. Należy przy tym podkreślić, że przy oznaczaniu DNA metodą spektrofotometryczną, wyżej wymienione warunki hydrolizy były optymalne. Zwiększenie czasu ogrzewania, lub stosowanie wyższych temperatur, może spowodować zanieczyszczenie ekstraktu produktami degradacji białek, w wyniku czego maksimum absorpcji UV przesunie się z 260 m μ w kierunku fal dłuższych.

Oznaczanie kwasów nukleinowych

Ilość kwasów nukleinowych określano z zawartości fosforu wg Allena (1940) oraz przez absorpcję w UV przy 260 m μ na spektrofotometrze uniwersalnym Zeiss-Jena. Wyniki odczytywano z krzywych standardowych RNA i DNA przygotowanych podobnie jak próby właściwe.

Tabela 1 — Table 1

Zależność między szybkością wzrostu a zawartością suchej masy, białka, RNA i DNA w korzeniu
Relationship between growth rate and the dry weight, protein, RNA and DNA content of the root

Odmiana Variety	Szybkość wzrostu po 48 godz. w mm/godz. Growth rate after 48 hours mm/hr	Zawartość w 5 mm korzonkach w μg Contents (5 mm) tip				Szybkość wzrostu/sucha ma- sa $\times 10^4$ Growth rate dry wt $\times 10^4$	Szybkość wzrostu/białko $\times 10^4$ Growth rate/protein $\times 10^4$	Szybkość wzrostu/DNA $\times 10^2$ Growth rate DNA $\times 10^2$	Szybkość wzrostu/RNA $\times 10^3$ Growth rate/RNA $\times 10^3$
		Sucha masa Dry wt	Białko Pro- tein	DNA DNA	RNA RNA				
Przebę- dowska Biała	0,85	315	215	3,7	33	27	39	23	25
Wigor	0,9	474	255	3,5	34,5	19	35	25	26
Wielko- polanka	1,07	610	298	3,0	36	17	36	36	30
IHAR 206	1,12	640	355	3,7	37,5	17	31	30	30

Tabela 2 — Table 2

Zależność między szybkością wzrostu a zawartością suchej masy, białka, RNA i DNA w rozwi-
jającym się wierzchołku korzenia kukurydzy odmiany Wigor

Relationship between growth rate and the dry weight, protein, RNA and DNA content of the
root tip during development. Variety Wigor

Termin pobrania prób w godzinach Age at sampling hr	Długość korzenia w cm Root length cm	Szybkość wzrostu w mm/godz. Growth rate mm/hr	Zawartość w 5 mm korzonkach w μg Contents/5 mm tip μg				Szybkość wzrostu/s.m. 10×4 Growth rate/dry wt $\times 10^4$	Szybkość wzrostu/białko $\times 10^4$ Growth rate/protein $\times 10^4$	Szybkość wzrostu/DNA $\times 10^2$ Growth rate/DNA $\times 10^2$	Szybkość wzrostu/RNA $\times 10^3$ Growth rate/RNA $\times 10^3$
			Sucha masa Dry wt	Białko Pro- tein	DNA DNA	RNA RNA				
48	1,42 $\pm$ 0,3	0,9	475	255	3,5	24,5	19	35	25	36
72	4,5 $\pm$ 0,5	1,7	380	243	4,3	18,7	44	70	39	90
96	12,6 $\pm$ 0,8	2,25	265	180	3,8	15,0	84	125	60	150
120	18,5 $\pm$ 0,7	2,2	220	120	3,0	11,2	100	183	73	200

DNA oznaczano dodatkowo przy pomocy reakcji z dwufenyloaminą na de-zoksyrybozę wg Burtona (1956).

Podane w niniejszej pracy stężenia kwasów nukleinowych oparte są wyłącznie na oznaczaniu spektrofotometrycznym, dającym minimalnie niższe wyniki niż przy oznaczaniu fosforu.

Czystość obydwu frakcji kwasów nukleinowych sprawdzano chromatograficznie na obecność uracylu i tyminy w hydrolizatach tych związków w 60 % HClO_4 (60 min., 100°C) (Wyatt 1951).

Oznaczanie białek

Osady powstałe po ekstrakcji RNA i DNA łączono razem, rozpuszczano 24 godz. w 1 N NaOH, białka strącano kwasem tróchlorooctowym o końcowym stężeniu 5%, wirowano, przemywano 5% kwasem tróchlorooctowym, rozpuszczano powtórnie w 1 N NaOH i w roztworze oznaczano wg metody Lowry i innych (1951). Wyniki badań w odniesieniu do suchej masy jednego 5 mm segmentu korzonka, jako średnie z czterech powtórzeń podano w tabelach 1 i 2.

DYSKUSJA

Woodstock i Skoog (1960) badając szybkość wzrostu strefy merystematycznej korzeni linii wsobnych kukurydzy, uzyskali ilościowe zależności między wzrostem a zawartością RNA. Natomiast Ingle i Hageman (1954) nie potwierdzili tej zależności, szczególnie w przypadku ziaren mieszańców.

Nasze badania nie wykazały także ścisłych prawidłowości liniowych między zawartością RNA a szybkością wzrostu korzeni czterech odmian kukurydzy krajowej.

Jak wynika z zestawienia podanego w tabeli 1 szybkość wzrostu poszczególnych odmian wahała się w granicach od 0,85 mm/godz. dla „Przebędowskiej Białej”, do 1,12 mm/godz. dla odmiany „IHAR 206” i odpowiednio stężenia RNA od 33–37,5 $\mu\text{g}/\text{korz.}$, białek — 215–355 $\mu\text{g}/\text{korz.}$ i suchej masy — od 315–640 $\mu/\text{korz.}$ Wyniki te wskazują, że w przypadku roślin wyższych zależności między szybkością wzrostu i zawartością RNA nie są tak prostolinijne, jak u mikroorganizmów. Nie wyklucza to jednak możliwości, że któraś z frakcji RNA może być powiązana z obserwowanymi szybkościami wzrostu, wymaga to jednak dalszych badań, szczególnie w oparciu o jedną z tych frakcji.

Nie stwierdzono też żadnych prawidłowości między szybkością wzrostu a zawartością DNA którego stężenie dla poszczególnych odmian wahało się w granicach od 3–3,7 $\mu\text{g}/\text{korz.}$, przy czym odmiany o największej i najmniejszej szybkości wzrostu korzeni wykazywały to samo stężenie DNA.

Nie potwierdziły się też przypuszczenia, że ilość DNA jest cechą odmianową, ponieważ poszczególne odmiany nie wykazywały większych różnic w zawartości tego związku.

Odwrotnie proporcjonalną natomiast zależność pomiędzy szybkością wzrostu a zawartością RNA i białka stwierdzono w czasie rozwoju korzenia.

Jak wynika z zestawienia podanego w tabeli 2, wraz ze wzrostem szybkości od 0,9–2,2 mm/godz. obniżała się wyraźnie zawartość RNA (z 24,5–11,2 $\mu\text{g}/\text{korz.}$), DNA (z 3,5–3,0 $\mu\text{g}/\text{korz.}$), białka (z 255–120 $\mu\text{g}/\text{korz.}$) i suchej masy (z 475–220 $\mu\text{g}/\text{korz.}$).

Pozwala to przypuszczać, że stężenie RNA nie wydaje się być czynnikiem limitującym szybkość wzrostu korzenia, jak to sugerował Porter (1953) oraz Woodstock i Skoog (1960). Ponadto zmniejszanie się suchej masy, zawartości białka i kwasów nukleinowych w czasie wzrostu korzenia, pozwala przypuszczać zgodnie z sugestią Ingle i Hagemana (1964) że strefa merystematyczna korzenia maleje w czasie wzrostu.

Streszczenie

Przeprowadzono badania nad zależnością między szybkością wzrostu a zawartością kwasów nukleinowych i białek w korzeniach kukurydzy odmiany: „Przebédowska Biała”, „Wigor”, „Wielkopólanka”, „IHAR 206”.

Nie stwierdzono ilościowej zależności liniowej między zawartością RNA i DNA a szybkością wzrostu.

W przypadku badań powyższych zależności we wczesnych stadiach rozwoju korzenia nie zaobserwowano limitującego wpływu RNA na szybkość wzrostu.

Katedra Biochemii
W. S. R. w Olsztynie

(Wpłynęło: dn. 30.9.1965 r.)

SUMMARY

A study has been made on the rates of elongation and nucleic acids and protein contents of the roots of *Zea mays*, var. “Przebédowska Biała”, “Wigor”, “Wielkopólanka” and “IHAR 206”. A direct proportionality was not found between the RNA and DNA contents ($\mu\text{g}/\text{root}$) of the root and their rates of elongation.

When the relationship was studied during the development of the roots of corn seedlings, the results suggested, that RNA content, per root tip, was not the limiting factor in the control of growth rate during the early stages of root growth.

LITERATURA

- Allen R. J. L., 1940, Biochem. J. 34: 858.
Burton K., 1956, Biochem. J. 62: 315.
Chargraff E., Zamenhof S., 1948, J. Biol. Chem. 173: 327.
Fleck A., Munro H. N., 1962, Biochim. Biophys. Acta 55: 571.
Heber U., 1963, Planta 59: 600.
Ingle J., Hageman R. H., 1964, Plant Physiol. 39: 730.
Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J., 1951, J. Biol. Chem. 193: 265.
Nieman R. M., Poulsen L. L., 1963, Plant Physiol. 38: 31.

- Niedhardt F. C., Magasanik B., 1960, *Biochim. Biophys. Acta* 42: 99.
- Nirenberg M. W., Matthaei I. W., Jones O. W., Martin R. G., Barondes S. H., 1963, *Federation Proc.* 22: 55.
- Porter W. K., 1953, A study of the growth promoting and inhibiting action of auxin in corn seedlings Ph. D. thesis Univ. Wisconsin Madison.
- Potopow N. G., Maroti., 1956, *Acta Bot. Acad. Sci. Hung.* 2: 365.
- Schaechter M. O., Maate, Kjeldgaard N. D., 1958, *J. Gen. Microbiol.* 19: 592.
- Schmidt G., Thannhauser S. G., 1954, *J. Biol. Chem.* 161: 83.
- Scott J. F., Fraccastoro A. P., Taft E. B., 1956, *J. Histochem. Cytochem.* 4: 1.
- Tsanev R., Markov G. G., 1960, *Biochim. Biophys. Acta* 42: 442.
- Wade H. E., 1952, *J. Gen. Microbiol.* 7: 24.
- Watson J. D., 1964, *Bull. Soc. Chim. Biol.* 46: 1399.
- Wittmann H. G., 1963, *Naturwiss.* 50: 76.
- Woodstock L. W., Skoog F., 1960, *Am. J. Botany* 47: 713.
- Wyatt G. R., 1951, *Biochem. J.* 48: 584.
- Zamecnik P. C., 1962, *Biochem. J.* 85: 257.