Kwasy nukleinowe w rozwijającym się ziarnie żyta

Cz. III. Badania nad składem nukleotydowym RNA dojrzewającego ziarna

The nucleic acids in the developing grain of rye

Part. III. Investigations on the nucleotide composition of RNA of the ripening grain

K. KULKA

W procesie formowania się ziarna zbóż zachodzą w nim różnorodne zmiany morfologiczno-anatomiczne, fizjologiczne i biochemiczne (Kalinin 1959; Grze-siuk 1961a i b). Wydaje się, iż zmiany te w mniejszym lub większym stopniu zależą od struktury przestrzennej kwasów nukleinowych i ich składu chemicznego.

Dotychczas brak jest w piśmiennictwie naukowym publikacji na temat zmian w składzie chemicznym RNA w rozwijających się nasionach. Natomiast dość znaczne różnice w składzie nukleotydowym RNA wykryto w liściach oliwki (Kessler i Frank 1962) oraz w kielkach kukurydzy (West 1962) będących w stanie deficytu wodnego.

Celem niniejszych badań było wyjaśnienie, w jakiej mierze formowanie się ziarna związane jest ze zmianami składu ogólnego RNA.

METODYKA BADAŃ

Obiektem badań było żyto jare (miejscowy mazurski ekotyp) i ozime („Ludo-we”). Próbkki ziarna przeznaczone do analizy składu chemicznego RNA pobierano w odstępach trzydniowych, poczynając od trzeciego dnia po zapyleniu do pełnej dojrzałości. Badany materiał po przeniesieniu do laboratorium natychmiast utrwalano w sterylizatorze Kocha w temperaturze 100°C w przepływającej parze wodnej, a następnie suszono w temperaturze 60°C do stałego ciężaru. Poczynając od próby 9-tej oddzielano od bielma zarodki przy pomocy igły preparacyjnej. Dobrze wysuszone próbki ziarna i zarodków dokładnie mielono i przechowywano w hermetycznie zamkniętych naczyniach szklanych, w chłodnym i ciemnym miejscu, do momentu rozpoczęcia analiz chemicznych.

Pewną trudność sprawia wybór odpowiedniej metody do badania składu chemicznego RNA w zróżnicowanych tkankach i organach roślin wyższych.

W wielu pracach celem oznaczenia składu nukleotydowego kwasów nukleinowych, wyodrębniano je z danego materiału w formie względnie czystych preparatów które następnie hydrolizowano do wolnych zasad lub nukleotydów (Filipowicz

1956; Fujisawa i Makino 1959). Otrzymane w ten sposób mieszaniny zasad purynowych i pirymidynowych lub nukleotydów rozdzielano zwykle przy pomocy chromatografii i elektroforezy bibułowej. Następnie poszczególne składniki RNA oznaczano ilościowo na podstawie pomiarów gęstości optycznej w świetle ultrafioletowym, lub też przez oznaczenie zawartości fosforu.

W dość licznych badaniach nad składem kwasów nukleinowych stosuje się metodę Spiryna i Biełozierskiego (1956) oraz jej modyfikacje. Przy pomocy tej metody oznaczono skład nukleotydowy kwasów RN oraz skład zasad azotowych kwasów DN w bakteriach, glonach, grzybach i roślinach wyższych (por. Spiryn 1962).

W niniejszej pracy do badań składu nukleotydowego RNA zastosowano ostatnią z przytoczonych metod (Spiryn i Biełozierskiej 1956) wprowadzając do niej niewielką zmianę, która polega na tym, że pierwotną ilość hydrolizatu RNA (ok. 20 ml) zagęszczano do objętości 2 ml. W czasie zagęszczania hydrolizatu znaczna część zanieczyszczeń uległa wytrąceniu w postaci brunatnego osadu, co przyczyniło się do jego znacznego oczyszczenia. Metoda ta nie nadawała się jednak do badań starszych prób ziarna. Szczególne trudności wystąpiły przy oddzielaniu hydrolizatu RNA od pozostałej części badanego materiału, gdyż hydrolizat ten przybierał wówczas postać gęstej kleistej masy i jego wyodrębnienie przez wirowanie nawet przy ok. 18000 g nie dawało oczekiwanych rezultatów. Z konieczności więc ograniczono analizy dojrzewającego ziarna tylko do 8 pierwszych prób.

Do rozdzielenia nukleotydów RNA stosowano chromatografię bibułową wstępującą w układzie rozpuszczalnika: kwas izomasłowy nasycony wodą + stężony amoniak dodany w takiej ilości, aby cały układ osiągnął pH 3,6.

Analizę każdej próby wykonano na dwóch równoległych hydrolizatach. Następnie z każdego hydrolizatu sporządzano trzy jednakowe chromatogramy. Wyniki przedstawione w tabelach stanowią średnie arytmetyczne sześciu powtórzeń.

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Jak już zaznaczono w metodyce, w trakcie wykonywania niniejszej pracy stwierdzono, że hydrolizaty RNA zawierają dość znaczne ilości związków utrudniających analizę chromatograficzną jak i pomiary gęstości optycznej w ultrafiolecie. W miarę rozwoju ziarniaka ilość związków pochłaniających ultrafiolet stale się zwiększa. Utrudnia to w pewnej mierze prawidłową analizę, a w wypadku ziarna bardziej dojrzałego zupełnie ją uniemożliwia. Gęstość optyczną badanego hydrolizatu (po jego częściowym oczyszczeniu — por. metodyka) ilustruje ryc. 1. Hydrolizaty pochodzące z 8 próby ziarna już są tak znacznie zanieczyszczone, że krzywa absorpcji w ultrafiolecie przedstawia dla określonych długości fal niemal linię prostą. Właściwy natomiast jej kształt winien być zbliżony do krzywej absorpcji czystego preparatu RNA.

W trakcie rozdzielenia mieszaniny nukleotydów przy pomocy chromatografii bibułowej, otrzymano 4 plamy (zamiast trzech). Ilustruje to ryc. 2. W toku dalszych

Ryc. 1. Krzywe absorpcji w świetle ultrafioletowym hydrolizatów RNA

1 — hydrolizat otrzymany z RNA drożdżowego; 2 — hydrolizat z pierwszej próby ziarna; 3 — hydrolizat z czwartej próby ziarna; 4 — hydrolizat z ósmej próby ziarna

Ultraviolet absorption spectra of hydrolysates of RNA.

1 — hydrolysate of yeast RNA; 2 — hydrolysate of RNA from the first sample of grain; 3 — hydrolysate of RNA from the fourth sample of grain; 4 — hydrolysate of RNA from the eighth sample of grain

Ryc. 2. Chromatogram nukleotydów RNA rozwijającego się zarodka żyta ozimego.

Liczby rzymskie — kolejne próby, A — kwas adenylowy; C — kwas cytydylowy; GU — kwasy: guanylowy + uridyłowy

Chromatogram of the nucleotides of RNA of developing embryo of winter rye.

Roman numerals — alternate sampling; A — adenylic acid, C — cytidylic acid, GU — guanylic + uridylic acids

badan okazało się, że czwartą plamę dodatkową stanowią różne barwniki, które wędrują prawie z frontem rozpuszczalnika. Barwniki te w trakcie naświetlania chromatogramu analityczną lampą kwarcową o długości fali ok. 360 m μ wykazywały intensywną fluorescencję. Właściwości tej nie posiadają nukleotydy. Na podobne trudności przy analizie składu nukleotydowego kwasów nukleinowych zwracają uwagę Waniuszyn i Biełozierskij (1959) oraz Sisakjan i Odincowa (1960).

Tabela 1 — Table 1

Skład nukleotydowy RNA dojrzewającego ziarna żyta ozimego
Nucleotide composition of RNA of the ripening grain of winter rye

Próby Samp- les	Liczba dni po zapyleniu Number of days after pollination	Zawartość nukleotydów (% molarne) Content of nucleotides (mole %)				$\frac{G+C}{A+U}$
		G	A	C	U	
1	3	28,1	23,1	27,2	21,6	1,24
2	6	28,5	22,6	27,3	21,6	1,26
3	9	28,8	23,0	27,0	21,2	1,26
4	12	28,7	23,4	27,0	20,9	1,26
5	15	28,9	22,7	27,1	21,3	1,27
6	18	30,4	24,2	25,7	19,7	1,28
7	21	29,8	23,2	26,6	20,4	1,29
8	24	29,1	23,2	27,1	20,6	1,28

Tabela 2 — Table 2

Skład nukleotydowy RNA dojrzewającego ziarna żyta jarego
Nucleotide composition of RNA of the ripening grain of vernal rye

Próby Samp- les	Liczba dni po zapyleniu Number of days after pollination	Zawartość nukleotydów (% molarne) Content of nucleotides (mole %)				$\frac{G+C}{A+U}$
		G	A	C	U	
1	3	31,4	25,0	24,0	19,6	1,24
2	6	30,7	25,3	24,7	19,3	1,24
3	9	28,3	23,8	25,6	22,3	1,17
4	12	30,1	24,2	24,8	20,9	1,22
5	15	30,0	23,6	26,2	20,2	1,28
6	18	29,1	22,5	28,0	20,4	1,33
7	21	29,6	24,6	25,4	20,4	1,22
8	24	30,0	23,1	27,0	19,9	1,32

Z uzyskanych rezultatów (tabele 1—4) wynika, że RNA we wszystkich badanych okresach rozwoju ziarna i zarodków należy do tzw. „typu GC”, to znaczy, że suma zawartości molarnych kwasu guanylowego i cytydylowego przeważa nad sumą kwasu adenylowego i urydylowego.

Tabela 3 — Table 3

Skład nukleotydowy RNA rozwijającego się zarodka żyta ozimego
Nucleotide composition of RNA of the developing embryo of winter rye

Próby Samples	Liczba dni po zapyleniu Number of days after pollination	Zawartość nukleotydów (% molarny) Content of nucleotides (mole %)				$\frac{G+C}{A+U}$
		G	A	C	U	
9	27	29,4	24,7	25,5	20,4	1,22
10	30	29,5	24,2	25,7	20,6	1,23
11	33	30,9	24,6	24,6	19,9	1,25
12	36	28,3	24,1	27,0	20,6	1,24
13	39	28,8	24,0	26,8	20,4	1,25
14	42	28,8	22,6	27,2	21,4	1,27
15	45	30,0	23,6	26,4	20,0	1,29
16	48	29,0	23,5	26,6	20,9	1,25

Tabela 4 — Table 4

Skład nukleotydowy RNA rozwijającego się zarodka żyta jarego
Nucleotide composition of RNA of the developing embryo of vernal rye

Próby Samples	Liczba dni po zapyleniu Number of days after pollination	Zawartość nukleotydów (% molarny) Content of nucleotides (mole %)				$\frac{G+C}{A+U}$
		G	A	C	U	
9	27	30,8	24,5	24,7	20,0	1,25
10	30	30,7	24,6	25,3	19,4	1,27
11	33	30,8	24,2	25,0	20,0	1,26
12	36	29,2	24,3	26,6	19,9	1,26
13	39	31,0	24,7	25,1	19,2	1,28
14	42	24,0	26,0	27,0	23,0	1,04
15	45	30,0	24,5	26,0	19,5	1,27
16	48	29,6	23,5	26,7	20,2	1,29

Najlepszym chyba wskaźnikiem zmian składu nukleotydowego RNA jest współczynnik specyficzności ($G+C/A+U$). Jego wartości wahają się w zasadzie od 1,22–1,32, a dla większości prób od 1,24–1,29. Na ogół ziarno i zarodki mniej dojrzałe (mniej rozwinięte) charakteryzują się niższymi współczynnikami specyficzności. Jednak różnice pomiędzy wartościami tych współczynników nie są w zasadzie duże. Spostrzeżenie to nasuwa wniosek, że w trakcie rozwoju ziarna żyta skład chemiczny RNA nie ulega większym zmianom.

Można przypuszczać, że zachodzące w toku rozwoju ziarna zmiany jego aktywności fizjologicznej (por. Grzesiuk 1961b) mogą mieć swoje źródło w odpowiedniej sekwencji nukleotydów w RNA i DNA. Wyjaśnienie tego zagadnienia ogranicza dotychczas brak odpowiedniej metodyki.

WNIOSKI

1. Skład nukleotydowy RNA formującego się ziarna i zarodków żyta należy do typu GC.
2. Wartości współczynnika specyficzności ($G+C/A+U$) wahają się na ogół w granicach od 1,24–1,29.
3. Uzyskane wyniki w pewnym stopniu mają charakter dyskusyjny i wskazują tylko, że w trakcie rozwoju ziarniaka skład nukleotydowy RNA nie ulega większym, istotnym zmianom.

Panu Doc. dr Stanisławowi Grzesiukowi pragnę serdecznie podziękować za wszechstronną pomoc i cenne wskazówki przy wykonywaniu niniejszej pracy.

Katedra Fizjologii Roslin WSR w Olsztynie
Kierownik doc. dr St. Grzesiuk

(Wpłynęło: dn. 23.XI.1965 r.)

SUMMARY

The nucleotide composition of RNA in the ripening grain of winter and vernal rye was determined. Both whole grain and their embryos were analysed.

1. In general, the values of the $G+C/A+U$ ratio varied from 1,24 to 1,29.
2. The results indicate that in the process of grain development there are no significant changes in nucleotide composition of RNA.

LITERATURA

- Filipowicz B., 1956, Skład kwasów rybonukleinowych trzustyki prawdziwej, *Acta Biochim. Polon.* 3 (1): 69–85.
- Fujisawa K., Makino K., 1959, Nucleinsäuren und ihre Baustaine, Z książki: *Papier chromatographie in der Botanik*, red. Linskens, Berlin.
- Grzesiuk St., 1961a, O fizjologicznych właściwościach rozwoju nasion, *Wiad. Bot.* 5 (1): 3–18.
- Grzesiuk St., 1961b, Studia nad fizjologią dojrzewającego ziarna zbóż, *Zeszyty Naukowe WSR Olsztyn* 11 (104): 3–127.

- Kalinin F. L., 1959, Embrionalnoje razwítie rastienij, Kijew.
- Kessler B., Frank-Fiskel J., 1962, Dehydration induced synthesis of nucleic acids and changing of composition of ribonucleic acids a possible protective reaction in drought resistant plants, *Nature* 196 (4854): 542—543.
- Sisakjan N. M., Odincowa M. S., 1960, Nukleotidnyj sostaw RNK kletocznych struktur rastienij, *Biochimia* 25 (1).
- Spiryn A. S., 1962, Sowremiennyje predstavlenija o moliekulijarnoj prirodi i stroieni nukleino-
wych kislot i nukleoproteidow, *Uspiechy biol. Chimii* 4: 744—753.
- Spiryn A. S., Biełozierskij A. N., 1956, Sostaw nukleinowych kislot pri eksperimentalnoj izmienčiwosti u bakterii kiszecznoj grupy, *Biochimia* 21 (6): 768—776.
- Wanieszyn B. F., Biełozierskij A. N., 1959, Srawnitielnoje izuczenije sostawa ribonukleino-
wych kislot u wysszych rastienij, *DAN SSSR* 124: 944.
- West S. H., 1962, Protein nucleotide and ribonucleic acid metabolism in corn during germinating under water stress, *Plant Physiol.* 37 (5): 565—571.