Metabolizm kwasów nukleinowych i frakcji białkowych zarodków i bielma w kiełkujących ziarnach kukurydzy

*Studies on the metabolism of nucleic acid and protein fractions in the embryo and
endosperm of germinating maize*

P. MASŁOWSKI, H. MASŁOWSKA, M. WIERZBICKA

WSTĘP

Mimo stosunkowo licznych prac nad przemianą kwasów nukleinowych w kiełkujących nasionach, mało jest poznana funkcja tych związków w zapasowych tkankach roślin, oraz mechanizm użytkowania tych rezerw przez rozwijający się zarodek.

Przypuszcza się ogólnie, że zapasowe kwasy nukleinowe są źródłem nukleotydów do syntezy nowych kwasów w rozwijającej się roślinie, chociaż i pod tym względem opinie są podzielone. Oota i Takata (1961) oraz Ledoux i Huart (1962) sugerują, że kwasy nukleinowe endospermu są zużytkowane przez rozwijający się zarodek w formie niezmienionej, natomiast według Barkera i Douglasa (1960) oraz Matsushita (1959) — przed translokacją do zarodka ulegają one degradacji do nukleotydów. Wręcz przeciwne stanowisko zajmuje Cherry (1962) oraz Ingle i Hageman (1965), według których związki nukleinowe bielma nie odgrywają praktycznie żadnej roli w syntezie cytoplazmatycznych kwasów nukleinowych, które powstają *de novo* we wczesnych stadiach kiełkowania.

Ta różnorodność i sprzeczność zdań skłoniła nas do przeprowadzenia badań, celem dokładniejszego poznania przemian kwasów nukleinowych w powiązaniu z przemianami frakcji białkowych zarodków i bielma kiełkujących ziarn kukurydzy.

MATERIAŁ I METODY

Materiałem do doświadczeń były ziarna kukurydzy odmiany 'Wigor' ze Stacji Hodowlano-Badawczej IHAR w Smolicach.

Do kiełkowania ziarn stosowano krystalizatory o pojemności 2 litrów, napełnione $10^{-4}M$ roztworem $CaCl_2$ i pokryte parafinowaną gazą z wywierconymi otworkami o średnicy ok. 3 mm. Ziarna przed kiełkowaniem zaprawiono 0,2% roztworem formaliny i umieszczano na bibule zwilżonej wodą destylowaną w szalkach Petriego do momentu przebicia okrywy nasiennej przez kiełek. Skiełkowane

nasiona przenoszono do krystalizatorów, umieszczając je w otworkach gazy. Doświadczenie przeprowadzano w temp. 20°C, na świetle, w 10 równoległych seriach.

Próby do analiz, po 500 roślin z każdej serii, pobierano w 2, 4, 6, 8, 12, 16 dniu po skielkowaniu. Pobierano rośliny o jednakowym wzroście, odrzucając zbyt wyrosnięte i nie skielkowane. Próbę kontrolną (0) pobierano z partii nasion umieszczonych na krystalizatorach. Kielkujące ziarno dzielono na bielmo i zarodek. Do zarodka (osi) zaliczano tarczkę zarodkową, korzeń i pęd. W poszczególnych częściach anatomicznych ziarna oznaczano wilgotną i suchą masę, następnie liofilizowano i rozdrabniano początkowo na młynku tarczowym, a następnie kulowym. Rozdrobniony materiał ekstrahowano eterem przez 48 godzin i przechowywano w ciemnych uszczelnionych parafiną słoikach w temp. 4°C.

W badanej próbce oznaczano azot ogólny metodą Kjeldahla wg Perrina (1953), a następnie ekstrahowano go w środowisku alkalicznym przy użyciu jonów Cu^{++} , Na^+ , SO_4^{--} i SO_3^{--} według metody Merza i Bressaniego (1957) opisaną dokładnie w poprzedniej pracy (Maślowski, 1962).

W ekstrakcie oznaczano N-rozpuszczalny i N-białkowy. Azot nierozpuszczalny oznaczano z różnicy N-ogólnego i N-rozpuszczalnego, natomiast N-niebiałkowy z różnicy N-rozpuszczalnego i N-białkowego wyekstrahowanego.

Azot rozpuszczalny oznaczano metodą Kjeldahla w modyfikacji Perrina, natomiast białkowy metodą Thimanna i Loosa (1957).

Rozdział i oznaczanie frakcji albuminowej, globulinowej, glutelinowej i zeinowej w ekstrakcie azotu ogólnego przeprowadzono wyżej podaną metodą Merza i Bressaniego opisaną dokładnie w poprzedniej naszej pracy (Maślowski 1962).

Azot chlorofilowy oznaczano tylko w zarodkach, ekstrahując go z 500 mg badanego materiału 60 min wodą podwójnie destylowaną. Pozostałość po ekstrakcji zadawano 30 ml 85% wodnego acetonu (obj/obj) i całość ogrzewano 15 min w 70°C. Roztwór sączono przez sączek Goocha, osad przemywano dwukrotnie roztworem wodnym acetonu. Ekstrakt i płyny z przemycia odparowywano do sucha. Suchą pozostałość mineralizowano i oznaczano azot metodą Kjeldahla.

Kwasy nukleinowe (RNA i DNA) oznaczano bezpośrednio w świeżym materiale według metody Niemana i Poulsena (1963) w modyfikacji własnej, opisaną dokładnie w pracy poprzedniej (Maślowski, Maślowska, Wierzbicka 1966).

W przypadku bielma, ze względu na zbyt małe ilości DNA i trudności oddzielenia go ilościowo od frakcji RNA, oznaczano tylko kwas rybonukleinowy.

Wyniki pomiarów z czterech powtórzeń z trzech oddzielnych serii analiz podano w tabeli 1, 2 i 3.

WYNIKI I DYSKUSJA

Wyniki badań zestawione w tabeli 1 wykazują, że podczas kielkowania ziarn, procent zawartości suchej masy bielma i osi wyraźnie maleje, przy czym największy spadek obserwuje się w pierwszych dniach kielkowania. Ten intensywny spadek procentowy zawartości suchej masy osi tłumaczy się wzmożonym pochlaniem

Tabela 1 — Table 1

Wzrost roślin i zawartość suchej masy kukurydzy 'Wigor' w różnych okresach kiełkowania i wzrostu zarodkowego

Plant growth and dry matter content during 16-day period of germination of maize 'Wigor'

Dni kiełkowania Days of growth	Długość korzeni w cm Root length in cm	Długość łodygi Stalk length in cm	Bielfo endosperm		Zarodek embryo	
			procent suchej masy dry matter, %	sucha masa 100 nasion bez zarodka dry mater of 100 seeds without embryo	procent suchej masy dry matter, %	sucha masa zarodków 100 roślin w g dry matter of embryos of 100 plants in g.
0	0,2	0,0	81,72	21,53	57,84	2,18
2	4,8	1,5	69,00	20,06	24,10	3,08
4	10,3	4,2	68,35	19,37	21,98	3,55
6	18,4	9,5	66,50	19,23	15,98	4,42
8	19,2	12,1	63,04	16,55	13,38	5,10
12	19,3	14,4	59,90	14,67	11,49	5,66
16	21,0	24,3	49,37	10,78	9,98	7,21

wody, a tym samym zwiększeniem ich objętości. Świadczy o tym wzrost bezwzględnej suchej masy 100 osi z 2,18—7,21 g, przy jednoczesnym spadku suchej masy 100 endospermów z 21,53 — 10,78 g.

Dużo szybszy wzrost bezwzględnej suchej masy osi w stosunku do ubytku masy bielma dowodzi o stosunkowo małym udziale bielma we wzroście masy osi powstającej głównie z produktów fotosyntezy. Najintensywniejszy przy tym wzrost korzeni i łodyg obserwuje się w pierwszych 6 dniach kiełkowania, co świadczy o wzmoczonych procesach anabolicznych w tym okresie. Dowodem tego jest także intensywny wzrost zawartości RNA osi, wynoszący w ciągu 6 dni kiełkowania ok. 33 mg/100 osi/24 godz., DNA — 1,6 mg/100 osi/24 godz. (tabela 3).

Podczas gdy zawartość kwasów nukleinowych w zarodkach w czasie kiełkowania wyraźnie rośnie, ilość ich w endospermie pozostaje praktycznie stała. Fakt ten nie dowodzi jednak — jak to sugerują Ingle i Hageman (1965), że kwasy te posiadają znikome znaczenie jako substancje zapasowe dla rozwijającego się zarodka. Istnieje bowiem możliwość syntezy tych związków w endospermie lub scutellum, a następnie translokacji do osi, czego jednak bez pomocy radioizotopów nie da się jednoznacznie rozstrzygnąć.

Metabolizm kwasów nukleinowych różni się w sposób zasadniczy od metabolizmu białek w okresie kiełkowania. Jak wykazują bowiem wyniki zestawione w tabeli 2, źródłem azotu do syntezy nowego białka cytoplazmatycznego — podczas kiełkowania ziarn bez dostępu azotu z zewnątrz — są białka endospermu. Dowodem tego jest intensywny spadek zawartości N-ogólnego i N-białkowego w bielmie na korzyść tych frakcji w zarodku.

Tabela 2 — Table 2

Zawartość różnych form azotu w kiełkujących ziarnach kukurydzy

Content of different nitrogen forms during 16-day period of germination

Dni kiełko- wania Days of growth	N- ogólny total N	N-rozpusz- czalny soluble N		N-nieroz- puszczalny non-soluble N		N-białkowy protein N		N-niebiał- kowy non-protein N		N-rozpusz- czalny w alkoholu alcohol- soluble N		N-rozpusz- czalny w zasadach base-soluble N		N-rozpusz- czalny w kwasach acid-soluble N		N-chloro- filowy chlorophyll N	
		a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b
0 2 4 6 8 12 16	1,86	1,54	82,79	0,32	17,20	1,65	88,71	0,23	12,36	0,79	42,47	0,37	19,89	0,18	9,67	—	—
	1,55	1,41	90,96	0,14	9,04	1,24	80,00	0,31	20,00	0,65	41,93	0,25	16,12	0,20	12,90	—	—
	1,54	1,44	100,00	0,00	0,00	0,92	63,89	0,52	36,11	0,48	33,33	0,20	13,88	0,24	16,67	—	—
	1,35	1,08	80,00	0,27	20,00	0,89	65,93	0,46	34,07	0,20	14,81	0,16	11,85	0,26	19,33	—	—
	1,24	0,98	79,03	0,26	20,97	0,80	64,51	0,44	35,48	0,17	13,70	0,17	13,70	0,20	16,12	—	—
	1,22	0,83	68,03	0,39	31,97	0,74	50,65	0,48	39,34	0,13	10,65	0,13	10,65	0,09	7,37	—	—
	1,00	0,73	73,00	0,27	27,00	0,60	60,00	0,27	27,00	0,12	12,00	0,12	12,00	0,09	9,00	—	—
0 2 4 6 8 12 16	3,21	2,90	90,60	0,30	9,40	1,98	61,60	0,93	29,00	0,018	0,56	0,68	21,10	0,92	31,70	0,06	1,80
	4,19	3,27	78,04	0,92	21,96	2,24	52,50	1,95	46,53	0,019	0,55	0,55	13,22	0,65	15,51	0,10	2,38
	4,20	3,14	74,76	1,06	25,24	2,30	54,76	1,90	45,23	0,008	0,19	0,48	11,42	0,60	14,29	0,15	3,57
	4,31	2,82	65,40	1,49	34,60	2,63	61,02	1,68	39,00	0,009	0,20	0,43	9,97	0,50	11,60	0,20	4,64
	4,21	2,71	64,37	1,50	35,63	2,70	64,13	1,55	36,81	0,0023	0,54	0,46	10,92	0,47	11,16	0,23	5,42
	4,28	2,73	63,78	1,55	36,22	2,76	64,48	1,51	35,28	0,023	0,53	0,49	11,44	0,45	10,51	0,25	5,84
	4,35	3,43	78,85	0,92	21,15	2,00	45,97	2,34	53,79	0,018	0,41	0,41	9,42	0,41	9,42	0,24	5,51

a — w procentach suchej masy, (a-in dry matter %), b — w procentach azotu ogólnego, (b-in total N %)

Tabela 3 — Table 3

Zawartość DNA i RNA w kiełkujących ziarnach kukurydzy 'Wigor'
 RNA and DNA content during 16-day period of germination of maize
 'Wigor'

Dni kiełkowania Days of growth	RNA		DNA	
	a	b	a	b
	bielmo endosperm			
0	0,51	109	—	—
2	0,50	103	—	—
4	0,59	96	—	—
6	0,48	92	—	—
8	0,50	82	—	—
12	0,58	85	—	—
16	0,69	74	—	—
	Zarodek embryo			
0	1,65	36	0,08	1,7
2	2,60	80	0,11	3,38
4	2,80	99	0,15	5,32
6	3,60	159	0,25	11,05
8	3,50	178	0,23	11,70
12	3,20	230	0,20	14,40

a — w procentach suchej masy

a-as dry matter %

b — w mg na suchą masę 100 roślin

b-in mg per dry matters of 100 plants

Wzrost azotu niebiałkowego, w pierwszych dniach kiełkowania, jest mniejszy aniżeli odpowiadający mu ubytek azotu białkowego. Świadczy to, że translokacja prostych peptydów i aminokwasów do rozwijającego się zarodka zachodzi intensywnie dopiero od drugiego dnia kiełkowania. Związane jest to prawdopodobnie z początkiem syntezy chlorofilu (tab. 2), którego obecność stwarza dogodne warunki do syntezy składników ustrojowych w tym również i nowego białka, kosztem związków azotowych bielma. Podobne wyniki uzyskali: Chibnall (1939), Yemm i Folkes (1958) oraz Weissman (1959) w badaniach nad przemianą związków azotowych w kiełkujących nasionach pszenicy i jęczmienia. Przy czym Yemm i Folkes wykazali, że najintensywniejsza proteoliza białek endospermu jęczmienia zachodzi w okresie maksymalnego wzrostu zarodka i maksymalnej intensywności oddychania.

Białkami zapasowymi endospermu są: zeina, gluteliny, albuminy i globuliny.

Jak wykazały poprzednie badania (Masłowski 1963) w pierwszej fazie dojrzewania ziarn głównie obserwuje się dużą zawartość albumin i globulin, przy minimalnej ilości zeiny. Największy procentowy udział w suchej masie N-albuminowego i N-globulinowego przypada na początek okresu formowania się bielma (1,3%), natomiast N-glutelinowego — na jego koniec (0,9%). W miarę dojrzewania ziarn pierwsza frakcja białkowa obniża się do 0,3%, druga zaś do 0,5 %, w przeciwieństwie

do zeiny, której stężenie wzrasta od 0,05% do 0,9% w fazie dojrzałości pełnej, co stanowi ok. 50% azotu ogólnego.

Zupełnie inaczej odbywa się proces przemiany tych białek w okresie kiełkowania ziarn. Najszybciej zużywana jest zeina, której stężenie w przeliczeniu na 100 endospermów, w ciągu 16 dni maleje z 170 mg do 20 mg, tj. ok. 9 razy, gdy jednocześnie stężenie glutelin — zaledwie 4 razy (z 80 mg do 20 mg), podobnie jak i stężenie albumin i globulin — z 39 mg do 10 mg. Wzmoczoną aktywność zeiny w stosunku do pozostałych frakcji można by tłumaczyć obecnością w niej końcowych grup aminowych — kwasu glutaminowego i treoniny, czego nie mają pozostałe frakcje białkowe. Ten końcowy azot aminokwasów — jak podają niektórzy autorzy — zwiększa reaktywność cząsteczki białkowej (Pawłow 1962). Intensywny rozpad zeiny w trakcie kiełkowania można by też tłumaczyć dużym zapotrzebowaniem na jej składniki przez rozwijający się zarodek. Dotyczy to głównie kwasu glutaminowego i proliny, stanowiących ok. 50% azotu aminowego zeiny (Block, Bolling 1945). Jak bowiem wykazały prace Weissmana nad przemianą azotową w kiełkującej pszenicy, oraz Yemma i Folkesa — w kiełkujących ziarnach jęczmienia, aminokwasy te odgrywają poważną rolę w syntezie cytoplazmatycznego białka. Na przykład w przypadku jęczmienia, 90% N-aminowego, niezbędnego do syntezy nowego białka pochodzi z kwasu glutaminowego, glutaminy i proliny. Związki te, jak wiadomo ściśle są ze sobą spokrewnione metabolicznie, przy czym kwas glutaminowy w wyniku transaminacji może dać 16 pospolitych aminokwasów niezbędnych do syntezy białka (Folkes, Yemm 1958, Meister 1955).

W tabeli 2 podano zmiany frakcji azotowych w rozwijającym się zarodku. Znamiennej cechą tych wyników jest wyraźny wzrost N-białkowego do 6 dnia kiełkowania, później nieco mniejszy, a po 12 dniach — w miarę „starzenia się kielków” — zawartość azotu maleje. Podobne wyniki uzyskali Very i Egel (1954) w przypadku kiełkujących ziarn owsa oraz Steward i Thomson (1956) w przypadku łubinu.

Azot białkowy reprezentowany jest głównie przez azot rozpuszczalny w kwasach i zasadach oraz przez azot chlorofilowy. Azot rozpuszczalny w alkoholu występuje w minimalnej ilości i nie wykazuje większych wahań w ciągu badanego okresu (od 0,04—0,7 mg). Azot rozpuszczalny w kwasach podobnie jak i azot rozpuszczalny w zasadach wzrasta prawie liniowo w miarę rozwoju zarodka, gdy natomiast azot chlorofilowy najintensywniejszy wzrost przejawia do 6-go dnia kiełkowania.

Azot niebiałkowy, w przeciwieństwie do azotu białkowego, najintensywniejszy przyrost wykazuje w pierwszych dwóch dniach, a następnie po 12 dniach kiełkowania, kiedy w tym czasie zawartość azotu białkowego wyraźnie spada.

Dane te jednak, nie upoważniają do wyciągnięcia zdecydowanych wniosków i należy je raczej potraktować jako badania wstępne do dalszych bardziej wnikliwych badań przy zastosowaniu substancji radioaktywnych.

Streszczenie

W endospermie i osi kielkujących ziarn kukurydzy odmiany 'Wigor' co 48 godzin w ciągu 16 dni oznaczano zawartość RNA i DNA, N-rozpuszczalnego, N-nierozpuszczalnego, N-albuminowego i globulinowego, N-glutelinowego, N-zeinowego i N-chlorofilowego. Stwierdzono, że synteza kwasów nukleinowych w osi zachodzi intensywniej niż synteza tych związków w bielmie.

Natomiast synteza cytoplazmatycznych białek kukurydzy, w pierwszych dniach kiełkowania ziarna bez dostępu azotu z zewnątrz odbywa się kosztem związków azotowych bielma, w szczególności kosztem zeiny.

Katedra Biochemii Żywności

Pracownia Biochemii Roślin

W.S.R. w Olsztynie

SUMMARY

Nucleic acids, total N, protein N, zein N, glutelin N, globulin N, non-protein N and chlorophyll N were determined in the axis (root plus shoot) and endosperm of maize at daily intervals during a 16-day germination period.

The results showed the maize kernel to contain a small reserve of nucleic acid, the increase of nucleic acids material in the growing axis being due to de novo synthesis.

The proteins, zein and glutelin were found to be the main source of nitrogen for the synthesis of cytoplasmatic protein of maize, and the loss of zein was twice as quick as that of glutelin. The content of acid-soluble N, likewise as of base-soluble N increased almost linearly as the germs developed, yet a more intensive increase of chlorophyll N content took place on the sixth day of germination.

LITERATURA

- Avery G. S., Egel F., 1954, Amer. Journ. Bot. 41: 310.
Barker G. R., Douglas T., 1960, Nature, 188: 943.
Block P. J., Bolling D., 1945, The aminoacids composition of proteins and food, C. Thomes Spiryngfeld
Chibnall A. C., 1939, Protein metabolism in the plant, Yale University Press.
Cherry J. H., Hageman R. H., 1961, Plant Physiol. 36: 163.
Cherry J. H., 1962, Plant Physiol. 37: 670.
Crocker W., Barton L. V., 1953, Physiology of Seeds Chronica Botanica Co Waltham, Mars 267.
Fleck A., Munro H. N., 1962, Biochim. Biophys., Acta 55: 571.
Folkes B. F., Yemm E. W., 1958, New Phytologist 57: 106.
Ingle J., Hageman R. H., 1965, Plant Physiol. 40: 48.
Koller D., Mayer A. M., Poljakoff-Mayber A., Klein S., 1962, Ann. Rev. of Plant Physiol. 13: 437.
Ledoux L., Huart R., 1962, Biochim. Biophys. Acta 61: 185.
Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A., Raudall R. J., 1951, J. Biol. Chem. 193: 265.
Masłowski P., 1963, Hod. Rośl. Aklimat. Nas. 7: 17.
Masłowski P., Masłowska H., Wierzbička M., 1966, Acta Soc. Bot. Pol. 35(2): 231—237.
Masłowski P., 1962, Genetica Polonica 3: 275.
Matsushita S., 1959, Mem. Res. Inst. Food Sci., Kyoto Univ. 17: 23.

- Meister A., 1955, *Advenc. Enzymo.* 16: 185
- Merz E. T., Bressani R., 1957, *Cereal Chem.* 34: 63.
- Oota Y., Osawa S., 1954, *Experientia* 10: 254.
- Öota Y., Takata K., 1961 (cyt. za Ingle J., Hageman R. H., *Plant Physiology* 1965, 40: 48).
- Pawłow A. N., 1962, *D.A.N. SSSR* 143: 235.
- Perrin C. H., 1962, *Anal. Chem.* 25: 968.
- Scott J. F., Fraccastoro A. P., Taft E. B., 1956, *J. Histochem. Cytochem.* 4: 1.
- Steward F. C., Thompson J. F., 1956, *Proteins and protein metabolism in plants "The Proteins"* N. York Acad. Press.
- Thimann K. V., Loos G. M., 1957, *Plant Physiol.* 32: 274.
- Toole E. H., Hendricks S. B., Borthvick H. A., Toole K., 1956, *Ann. Rev. of Plant Physiol.* 1: 299.
- Tsuboi K. K., 1950, *Biochim. Biophys. Acta* 6: 202.
- Yemm E. W., Folkes B. F., 1958, *Annual Review of plant Physiology* 9: 245.
- Weissman G. S., 1959, *Amer. Journ. Bot.* 46: 339.
- Wyatt G. R., 1951, *Biochem. J.* 48: 584.