Aktywność adenozynotrójfosfatazy i rybonukleazy w zarodkach ziarna jęczmienia jarego w okresie spoczynku późniwego

*Adenosinetriphosphatase and ribonuclease activity in embryos of spring barley grain
in the period of after-harvest dormancy*

K. KULKA

Zasadniczym czynnikiem wywołującym spoczynek późniwy ziarna zbóż są inhibitory wzrostu (Miyamoto i in., 1961; Grzesiuk 1967; Rejowski i Kulka 1967). Związki te mogą hamować w ziarnie działanie wielu enzymów (Eliott i Leopold 1953; Mietlickij i Korablewa 1965; Grzesiuk 1967), bądź też wstrzymywać działanie biologiczne giberelin (Bradbeer 1968). Gibereliny zaś, jak wiadomo, stymulują biosyntezę α -amylazy i rybonukleazy (Chrisplees i Varner 1967).

O aktywności enzymów w dojrzewającym wtórnie ziarnie zbóż (tj. w okresie spoczynku) wiadomości są małe i niekompletne (Kretowicz 1945; Grzesiuk 1967). Wynika jednak z nich, że w miarę przechodzenia spoczynku w ziarnie zmniejsza się aktywność amylazy i katalazy, a zwiększa się aktywność enzymów proteolitycznych.

Praca niniejsza miała na celu wyjaśnienie jak kształtuje się aktywność ATP-azy i RN-azy w zarodkach (oraz ich frakcji mitochondrialnej) spoczynkowego ziarna jęczmienia podczas pęcznienia.

METODY BADAŃ

Badania przeprowadzono na ziarnie jęczmienia jarego 'Browarny PZHR'. Świeżo zebrane ziarno (w 1967 r.) przechowywano (w laboratorium) w stanie powietrznie suchym, w temperaturze pokojowej, w ciemności. Następnie podczas spoczynku poddawano je pęcznieniu umieszczając na kielkowniku Jacobsena na przeciąg 24 i 48 godzin na bibule filtracyjnej nasyczonej wodą wodociągową o temperaturze około 20°C.

Próbki ziarna przeznaczone do badania aktywności enzymów pobierano po upływie 24 i 48 godz. pęcznienia, płukano lekko w wodzie destylowanej i osuszano z wody zewnętrznej za pomocą bibuły filtracyjnej. Następnie z ziarna tego wyjmowano zarodki, które przenoszono do naczynka umieszczonego w lodzie. Aktywność enzymów oznaczano w całych zarodkach oraz w ich frakcji mitochondrialnej.

Izolowanie mitochondriów. Świeżo wypreparowane zarodki rozcierano w moździerzu porcelanowym o gładkiej powierzchni wewnętrznej (zamrożonym w lodzie) z 0,5 M roztworem sacharozy przygotowanej na 0,01 M buforze tris-HCl (pH 7,6). Homogenat sączono przez cztery warstwy gazy. Nie naruszone fragmenty tkanek rozcierano powtórnie. Połączone przesącze przedstawiały jednorodną masę, pozbawioną w zasadzie całych komórek (kontrola mikroskopowa). Mitochondria izolowano z homogenatu metodą frakcjonowanego wirowania (Cunningham 1964). Osadu mitochondriów nie przemywano z uwagi na możliwość wypłukania jonów aktywujących ATP-azę (Forti 1957; Reid i in. 1964).

Aktywność ATP-azy. Aktywność tego enzymu określano metodą opisaną przez Sisakjana i wsp. (1963) nieznacznie zmodyfikowaną. Osad mitochondriów rozcierano w temperaturze 0°C, w moździerzu z 6 ml buforu boranowego o pH 5,6. Zawiesinę trzymano 20 min. w temperaturze 4°C. Skład mieszaniny reakcyjnej wynosił: 1 ml 0,1 M buforu boranowego + 1 ml zawiesiny mitochondriów + 1 ml 0,001 M ATP. Mieszaninę inkubowano 15 min. w temperaturze 37°C. Reakcję przerywano 3 ml 10 % kwasu tróchlorooctowego. Całość trzymano 0,5 godz. w szafie chłodniczej, po czym odwirowywano przy 6000 g w ciągu 10 min. W supernatancie oznaczano fosfor nieorganiczny metodą Fiske Subbarowa, opisaną przez Brzeskiego i Kaniugę (1956). W próbach kontrolnych kwas tróchlorooctowy wprowadzano do inkubatu przed dodaniem ATP.

Aktywność rybonukleazy. Aktywność rybonukleazy oznaczano na podstawie metod, które opisali De Duve i wsp. (1955) oraz Skwirskaja i Czepinoga (1964). Osad mitochondriów rozcierano w temperaturze około 0°C z 6 ml buforu octanowego o pH 6,2. Następnie zawiesinę trzymano w szafie chłodniczej (temp. 4°C) w ciągu 30 min. celem ekstrakcji enzymu, po czym wirowano przy 6000 g w ciągu 10 min. Skład mieszaniny reakcyjnej wynosił: 1 ml 0,1 M buforu octanowego + 1 ml wyciągu tkankowego + 2 ml 0,4 % kwasu rybonukleinowego z drożdży. Mieszaninę inkubowano w temperaturze 37°C w ciągu 90 min. Reakcję przerywano przez dodanie 4 ml 0,25 % octanu uranylu w 5 % kwasie tróchlorooctowym. Próbkę pozostawiano na 30 min. w szafie chłodniczej, a następnie odwirowywano (przy 6000 g) osad białka i nierozłożonego RNA.

Określanie aktywności ATP-azy i RN-azy w całych zarodkach przeprowadzano analogicznie jak i w mitochondriach, homogenizując je do jednorodnej, przesączalnej przez gazę masy.

Oznaczenia aktywności enzymów wykonano w trzech powtórzeniach.

WYNIKI I DYKUSJA

Podczas pęcznienia zdolnego już do kiełkowania ziarna (dojrzałość fizjologiczna) zwiększała się w jego zarodkach sucha masa mitochondriów (tabela 1). Zmiany te mogłyby być wynikiem powiększania masy poszczególnych mitochondriów w okresie poprzedzającym ich podział (Szabadasz 1967) oraz zwiększaniem się ich liczby (Breidenbach i in. 1967). Pęcznienie ziarna, będącego w spoczynku, nie wywo-

Tabela 1 — Table 1

Zmiany aktywności ATP-azy i RN-azy we frakcji mitochondrialnej, wydzielonej z zarodków pęczniącego ziarna jęczmienia
Changes of ATPase and RNase activity in mitochondrial fraction, isolated from embryos of imbibing barley grain

Liczba dni po sprężeniu	% ziarna kielkującego % of germinating grain		Sucha masa mitochondriów na 100 zarodków (mg) Dry matter of mitochondria per 100 embryos (mg)		Aktywność ATP-azy, $\mu\text{g P}$ ATPase activity, $\mu\text{g P}$				Aktywność RN-azy, $\mu\text{g P}$ ATPase activity, $\mu\text{g P}$			
	po 4 dniach after 4 days	po 7 dniach after 7 days	po 24 godz. after 24 hours	po 48 godz. after 48 hours	po 24 godz. pęcznienia ziarna after 24 hours imbibition of grain		po 48 godz. pęcznienia ziarna after 48 hours imbibition of grain		po 24 godz. pęcznienia ziarna after 24 hours imbibition of grain		po 48 godz. pęcznienia ziarna after 48 hours imbibition of grain	
					na 1 mg suchego paratu mitochondriów per 1 mg of dry mitochondrial preparation	na 100 zarodków per 100 embryos	na 1 mg suchego paratu mitochondriów per 1 mg of dry mitochondrial preparation	na 100 zarodków per 100 embryos	na 1 mg suchego paratu mitochondriów per 1 mg of dry mitochondrial preparation	na 100 zarodków per 100 embryos	na 1 mg suchego paratu mitochondriów per 1 mg of dry mitochondrial preparation	na 100 zarodków per 100 embryos
4	0	8	3,1	3,0	2,8	8,7	3,4	10,2	22,5	69,7	34,4	103,0
23	44	68	3,0	3,2	3,8	11,4	5,2	16,6	30,0	90,0	38,5	123,2
53	92	100	3,4	3,7	6,0	20,4	11,0	40,7	28,0	95,2	42,0	155,4

ływało wyraźnych różnic w ciężarze preparatu frakcji mitochondrialnej zarodków (tabela 1).

Aktywność adenozynotrójfosfatazy. ATP-aza odgrywa ważną rolę w przemianach energetycznych organizmów roślinnych, stymulując hydrolizę ATP do ADP. Procesowi temu towarzyszy uwolnienie się pewnej ilości energii chemicznej. Energia ta może być zużywana podczas przebiegu wielu procesów biochemicznych i fizjologicznych. W literaturze naukowej znany jest bowiem fakt, że tkanki o dużej aktywności fizjologicznej cechuje zwykle wysoka aktywność ATP-azowa (Zakrzewska Henisz 1965; Jaffe i Galston 1967; Kisjakowa i in. 1967).

Aktywność ATP-azową wykryto we wszystkich organellach komórek roślinnych (Sisakjan i in. 1963; Wieczier i Rajcina 1967). Enzym ten trwale związany jest ze strukturami komórki.

Aktywność ATP-azowa frakcji mitochondrialnej zarodków wyraźnie wzrastała w miarę ustępowania spoczynku ziarna (tabela 1), co szczególnie wyraźnie zaznaczyło się przy przeliczaniu wyników na 100 zarodków. W wypadku całych zarodków zwiększanie aktywności ATP-azy obserwowano dopiero w ziarnie o pełnej zdolności kiełkowania (tabela 2).

Zmniejszone działanie ATP-azy w całych zarodkach i mitochondriach ziarna spoczynkowego wpływało zapewne ograniczająco na procesy fosforylacji wielu związków organicznych, a w następstwie na ograniczenie natężenia podstawowych przemian biochemicznych zachodzących w komórkach spoczynkowego ziarna. W tym ogólnym ograniczeniu przemiany materii prawdopodobnie wystąpiły również zaburzenia w przebiegu samej fosforylacji oksydacyjnej, tj. w tym procesie, w wyniku którego powstaje ATP. Na taką zależność fosforylacji tlenowej od aktywności ATP-azowej wskazywano już wcześniej (por. Zakrzewska Henisz 1965).

Aktywność rybonukleazy. W tkankach roślinnych stwierdzono obecność różnych rybonukleaz (Ingle i Hageman 1965; Szarkowski 1965). Wilson (1963 a, 1963 b) wypreparował z rośliny kukurydzy RN-azę A (optimum działania przy pH 5) oraz RN-azę B (optimum działania przy pH 6,2). Oznaczoną w niniejszym doświadczeniu rybonukleazę, zgodnie z nomenklaturą Wilsona (1963 b) można zaliczyć do RN-azy B.

W mitochondriach zarodka jęczmienia w miarę przemijania spoczynku ziarna aktywność RN-azy zwiększała się tylko w niewielkim stopniu (tabela 1).

Całe natomiast zarodki pozostające w stanie spoczynku miały stosunkowo niską aktywność badanego enzymu (tabela 2). Aktywność ta zwiększała się, gdy ziarno kończyło spoczynek i uzyskiwało dojrzałość fizjologiczną (tabela 2).

Jakkolwiek fizjologiczne funkcje rybonukleazy nie są jeszcze całkowicie wyjaśnione, tym nie mniej, uzyskane wyniki sugerują, że podczas spoczynku ziarniaka rybonukleaza zarodka była w znacznej mierze inaktywowana, a w miarę jego ustępowania i uzyskiwania dojrzałości fizjologicznej, aktywność enzymu wielokrotnie się zwiększała.

Cząsteczki kwasów nukleinowych mają zdolność do szybkiej odnowy ze swoich prekursorów (Shannon i in. 1964; Srivastava 1964). W związku z tym, niektórzy

Tabela 2 — Table 2

Aktywność ATP-azy i RN-azy w zarodkach pęczniejącego ziarna jęczmienia
ATPase and RNase activity in embryos of imbibing barley grain

Liczba dni po sprzęcie	Wilgotność, % Humidity, %			Aktywność ATP-azy, $\mu\text{g P}$ ATPase activity, $\mu\text{g P}$			Aktywność RN-azy, $\mu\text{g P}$ RNase activity, $\mu\text{g P}$			
	Zarodków of embryos		całego ziarna of whole grain	po 24 godz. pęcznienia ziarna after 24 hours imbibition of grain		po 48 godz. pęcznienia ziarna after 48 hours imbibition of grain	po 24 godz. pęcznienia ziarna after 24 hours imbibition of grain		po 48 godz. pęcznienia ziarna after 48 hours imbibition of grain	
	po 24 godz. pęcznienia after 24 hours imbibition	po 48 godz. pęcznienia after 48 hours imbibition		na 1 g suchej masy per 1 g of dry matter	na 100 zarodków per 100 embryos		na 1 g suchej masy per 1 g of dry matter	na 100 zarodków per 100 embryos		
6	55,0	56,0	30	690	104	904	625	94	818	123
25	55,0	56,0	30	687	103	700	1740	261	1100	165
55	59,4	66,2	31	1120	168	1550	5500	825	3000	450

autorzy przypisują RN-azie pośrednią rolę w biosyntezie RNA (Barker i Douglas 1960; Gołaszewski 1964; Ingle i Hageman 1965) i białka (Szarkowski 1965). W zarodkach ziarna spoczynkowego procesy odnowy RNA i syntezy białek był niewątpliwie ograniczony i wzrastał się on dopiero po ustąpieniu spoczynku. W tym samym czasie wzrastała się aktywność RN-azy.

STRESZCZENIE I WNIOSKI

W okresie spoczynku ziarno przechowywano w laboratorium, w stanie powietrznie suchym, w temperaturze pokojowej. W określonych odstępach czasu pobierano próbki ziarna i poddawano je pęcznieniu. Z pęczniącego ziarna (po 24 i 48 godz.) wyseparowywano zarodki oraz izolowano z nich mitochondria. W całych zarodkach oraz w mitochondriach oznaczano aktywność ATP-azy i RN-azy w trzech różnych okresach spoczynku ziarna. Stwierdzono:

1. Przy pęcznieniu ziarna, którego spoczynek minął (od dojrzałości fizjologicznej) zwiększa się w zarodkach sucha masa mitochondriów. W pęczniącym ziarnie spoczynkowym takich zmian nie obserwowano.
2. Podczas ustępowania spoczynku ziarna aktywność ATP-azowa mitochondrialnej frakcji zarodków wyraźnie się zwiększała. Natomiast w całych zarodkach znaczne zwiększenie aktywności ATP-azy obserwowano dopiero u ziarna, które posiadało pełną zdolność kiełkowania.
3. Aktywność RN-azy w mitochondriach była wysoka i tylko w niewielkim stopniu wzrastała w miarę upływu spoczynku. Całe natomiast zarodki pozostające w stanie spoczynku późniejszego wykazywały niską aktywność badanego enzymu w porównaniu z zarodkami ziarna, które uzyskało dojrzałość fizjologiczną.
4. Można przypuszczać, że inhibitory (tzw. β -inhibitor) zawarte w spoczynkowym ziarnie jęczmienia hamowały aktywność ATP-azy i RN-azy w zarodkach.

Panu Prof. Dr Stanisławowi Grzesiukowi serdecznie dziękuję za cenne rady i wskazówki w czasie wykonywania niniejszej pracy.

*Katedra Fizjologii Roślin
Wyższej Szkoły Rolniczej w Olsztynie*

(Wpłynęło dn. 24.6.1968 r.)

SUMMARY

During after ripening the grains were kept in the laboratory in air-dry state at room temperature. At fixed intervals grain samples were taken and allowed to swell. After 24 and 48 hrs., from the swelling grains embryos were removed and the mitochondria isolated.

ATPase and RNase activity were determined both in intact embryos and in mitochondria at three different periods of afterharvest dormancy. It was found that:

1. at the end of dormancy there the dry matter of mitochondria increases in the swelling grain. No such changes were observed in the dormant grain.
2. at the end of dormancy ATPase activity in the mitochondrial fraction of embryos was markedly increased. However, in intact embryos an increase of ATPase activity was observed only when the grain reached full germinating capacity.

3. the RNase activity in mitochondria was high and, as dormancy progressed, this activity increased only slightly. Intact dormant embryos, however, were characterized by low activity of the enzyme as compared with that of physiologically ripe grain.

4. it may be assumed that inhibitors (the so-called β -inhibitor) present in dormant barley grain inhibited ATPase and RNase activity in embryos.

College of Agriculture, Olsztyn

Department of Plant Physiology

Head: Prof. Dr Stanisław Grzesiuk

LITERATURA

- Barker G. R., Douglas T., 1960, Function of ribonuclease in germinating peas, *Nature* 188 (4754): 943—944.
- Bradbeer J. W., 1968, Studies in seed dormancy. IV. The role of endogenous inhibitors and gibberellin in the dormancy and germination of *Corylus avellana* L. seed, *Planta* 78 (3): 266—276.
- Breidenbach R. W., Castelfranco P., Griddle R. S., 1967, Biogenesis of mitochondria in germinating peanut cotyledons. II. Changes in cytochromes and mitochondrial DNA, *Plant Physiol.* 42 (8): 1035—1041.
- Brzeski W., Kaniuga Z., 1956, *Ćwiczenia z biochemii roślin*, Warszawa, PWN.
- Chrisplees M. J., Varner J. E., 1967, Hormonal control of enzyme synthesis. On the mode of action of gibberellic acid in aleurone layers of barley, *Plant Physiol.* 42 (7): 1008—1016.
- Cunningham W. P., 1964, Oxidation of externally added NADH by isolated corn root mitochondria, *Plant Physiol.* 39 (4): 669—703.
- De Duve C., Pressman B., Gianetto R., Wattiaux R., Appelmans F., 1955, Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat liver tissue. *Biochem. J.* 60 (4): 604—617.
- Elliott B. B., Leopold A. C., 1953, An inhibitor of germination and amylase activity in oat seed, *Physiol. Plant.* 6 (1): 65—68.
- Forti G., 1957, Adenosinetriphosphatase activity of pea mitochondria, *Physiol. Plant.* 10 (5): 898—909.
- Gołaszewski T., 1964, Badania nad rybonukleazami roślin, *Postępy Biochemii* 10 (3): 369—379.
- Grzesiuk St., 1967, *Fizjologia nasion*, Warszawa, PWRiL.
- Ingle J., Hageman R. H., 1965, Metabolic changes associated with germination of corn. II. Nucleic acid metabolism, *Plant Physiol.* 40 (1): 48—53.
- Jaffe M. J., Galston A. W., 1967, Physiological studies on pea tendrils. III. ATPase activity and contractility associated with coiling. *Plant Physiol.* 42 (6): 845—847.
- Kisjakowa T. E., Gołubkowa B. M., Bogaczewa I. I., 1967, Wzaimoswąż struktury i funkcji fotosyntezeskiego aparatu w ontogenezie kartofelja, *Fizjol. rastienij.* 14 (1): 5—20.
- Kretowicz W. L., 1945, *Fizjologo-biochimizeskije osnovy chranienija ziarna*, Moskwa, Leningrad, Izd-wo Akademii Nauk SSSR.
- Miyamoto F., Tolbert N. E., Everson E. H., 1961, Germination inhibitors related to dormancy in wheat seeds. *Plant Physiol.* 36 (6): 739—746.
- Mietlickij L. W., Korablewa N. P., 1965, *Biochimia pokoja zapasajuszczich organow rastienij*, Moskwa, Izd-wo "Nauka".
- Reid H. B., Gentile A. C., Klein R. M., 1964, Adenosine triphosphatase activity of cauliflower mitochondria, *Plant Physiol.* 39 (6): 1020—1023.
- Rejowski A., Kulka K., 1967, Rola naturalnych inhibitorów wzrostu i kwasów nukleinowych w kształtowaniu spoczynku ziarna jęczmienia jarego, *Acta Soc. Bot. Polon.* 36 (2): 222—234.
- Sisakjan N. M., Kobjakowa A. M., Filipowicz I. P., 1963, Adenozintrifosfataza protoplazmiennych struktur rastienij. *Biochimia* 28 (6): 1011—1016.

- Shannon J. C., Hanson J. B., Wilson C. M., 1964, Ribonuclease levels in the mesocotyl tissue of *Zea mays* as a function of 2,4 D application, *Plant Physiol.* 39 (5): 804—809.
- Skwirskaja E. B., Czepinoga P. O., 1964, *Praktikum po nukleoproteidach i nukleinowym kwasom*, Moskwa, Izd-wo Wysszaja Szkoła.
- Srivastava W. L., 1964, The effect of gibberellic acid on ribonucleases and phytase of germinating barley seeds, *Canad. J. Bot.* 42 (9): 1303—1305.
- Szabadasz A. L., 1966, Morfologiczka organizacja mitochondrii w różnych fazach cytycznych funkcji. Mitochondrii (struktura i funkcja), Moskwa, Izd-wo "Nauka".
- Szarkowski A. L., 1966, Badania porównawcze nad kwasami rybonukleinowymi i rybonukleazami zielonych i etiolowanych roślin wyższych, Warszawa, PWN.
- Wieczier A. C., Rajcina G. I., 1967, Izuczenie ATFaznej aktywności w chloroplastach izolowanych z liści różnego wozrastu, *DAN BSSR* 11 (6): 544—547.
- Wilson C. M., 1963a, Chromatographic separation of ribonuclease in corn. *Biochim. Biophys. Acta* 68: 177—184.
- Wilson C. M., 1963 b, Substrate and product specificity of plant ribonucleases, *Biochim. Biophys. Acta* 76: 324—326.
- Zakrzewska-Henisz A., 1965, Czynność ATP-azowa a transport czynny jonów sodowych i potasowych, *Post. biochem.* 11 (2): 161—167.