Związki azotowe i fosforowe mitochondrialnej oraz plastydowej frakcji dojrzewających ziarniaków żyta (*Secale cereale* L.)

Nitrogen and phosphorus compounds in mitochondrial and plastid fractions of ripening rye grains

S. GRZESIUK, K. KULKA, E. SOJKA

WSTĘP

Rozwój ziarniaków żyta składa się z trzech etapów dotyczących zmian morfologiczno-anatomicznych (Grzesiuk, 1961; Sójka, 1961). Są to:

1. etap zasadniczego formowania bielma (od zapylenia do 9—12 dnia);
2. etap zasadniczego formowania zarodka (od 9—12 dnia do 24—27 dnia);
3. etap zasadniczego gromadzenia materiałów zapasowych (od 24—27 dnia do pełnej dojrzałości morfologicznej).

Etapy te związane są z odpowiednimi przemianami biochemicznymi (Kulka 1966, 1966a) i procesami fizjologicznymi (Sójka, 1961). Ziar-
no o różnej dojrzałości ma dzięki temu zmieniającą się aktywność fizjo-
logiczną i różną żywotność. Właściwości te wywierają następnie duży
wpływ na fizjologię roślin z niego wyrosłych. Z reguły największą ży-
wotność osiągają ziarniaki zbóż na początku trzeciego etapu ich morfo-
genezy, co przypada na początek tzw. dojrzałości woskowej (Grzesiuk,
1967).

Należy sądzić, że metabolizm dojrzewających ziarniaków oraz ich
właściwości fizjologiczne kształtowane są w dużej mierze działalnością
mitochondriów i częściowo plastydów. W literaturze brak jest jednak do-
tychczas prac wyjaśniających powyższe powiązania. Jedynie Proko-
fiew i Rodionowa (1966) przeprowadzili fragmentaryczne badania
składu chemicznego i aktywności mitochondriów w zarodkach formują-
cych się nasion słonecznika. Na podstawie tych i innych danych (Pro-
kofiew, 1968) można wysunąć przypuszczenie, że zarówno mitochon-
dria, jak i plastydy spełniają istotną rolę w gromadzeniu materiałów za-
pasowych nasion oraz organów zapasowych.

Fizjologiczne funkcje mitochondriów i plastydów związane są z ich określoną strukturą i składem chemicznym (Lehninger 1964; Frey-Wyssling, Mühlethaler, 1965). Określając więc zmiany w składzie chemicznym tych organelli można w pewnej mierze wnioskować także o procesach w nich zachodzących (Dickinson, Hanson, 1965; Prokofiew, Radionowa, 1966; Abu-Shakra Salach, Ching Te May, 1967; Lado, Schwendimann, 1967; Prokofiew, 1968).

Celem niniejszej pracy było prześledzenie dynamiki suchej masy frakcji mitochondrialnej i plastydowej rozwijającego się ziarna żyta, z równoczesnym określeniem w tych organellach zmian zawartości związków azotowych i fosforowych. Ponadto starano się wyjaśnić, w jakim stopniu zmiany właściwości fizjologicznych dojrzewających ziarniaków związane są z ilością i składem chemicznym omawianych organelli.

MATERIAŁ I METODY BADAŃ

1. Materiał. Próbkę formujących się ziarniaków żyta (jarego — ekotyp 'Mazurski' i ozimego — odm. 'Ludowe') przeznaczone do analiz pobierano w odstępach trzydniowych począwszy od trzeciego (żyto jare) i szóstego (żyto ozime) dnia po zapyleniu. Badania podczas etapu zasadniczego formowania bielma i zarodka obejmowały całe ziarno. Pobieranie prób całych ziarniaków zakończono z powodu trudności analitycznych na początku dojrzałości woskowej, tj. po 27 dniach formowania ziarna żyta jarego i 33 dniach formowania ziarna żyta ozimego. Próbkę zarodków izolowano przy pomocy igły preparacyjnej w temperaturze 1—3°C z ziarniaków żyta ozimego w następujących okresach ich rozwoju: a — pod koniec dojrzałości mlecznej, b — w pierwszym okresie dojrzałości woskowej, c — w dojrzałości pełnej.

2. Izolowanie plastydów i mitochondriów. Całe ziarniaki rozcierano ręcznie w chłodzonym lodem mózdzierzu porcelanowym z 0,5 M roztworem sacharozy przygotowanej na tris-HCl buforze 0,01 M (pH 7,6). Ten sposób homogenizowania materiału roślinnego jest jednym z najlepszych do wyodrębniania organelli komórkowych (Bonner, 1965). Otrzymany w ten sposób homogenat sączono przez cztery warstwy gazy, a nieprzesączalną jego część poddawano powtórnemu rozcieraniu, sączeniu i kontroli mikroskopowej. Homogenaty łączono i następnie odpowiednio frakcjonowano za pomocą wirowania.

Do homogenizacji pobierano 40—80 g ziarna świeżego. Na 1 g świeżej masy ziarna dodawano 2—3 ml roztworu sacharozy.

Frakcje plastydów i mitochondriów izolowano z homogenatów w temperaturze 0—4°C metodą frakcjonowanego wirowania. Przesączony uprzednio homogenat ziarniaków wirowano najpierw przez 5 min. przy

900 g i osad zawierający skrobię, jądra komórkowe, resztki nie rozrzuconych komórek itp. odrzucano. Supernatant poddawano kolejnemu pięciominutowemu wirowaniu przy 3800 g, w wyniku którego osadzała się podstawowa masa plastydów. Nowy supernatant wirowano z kolei przy 8 000 g przez 15 minut, osadzając w ten sposób frakcję mitochondriów. Otrzymane osady struktur podkomórkowych przemywano jednorazowo takim samym roztworem, jaki używany był do homogenizacji, po czym zawiesiny organelli ponownie odwirowywano — plastydy przy 3 800 g, a mitochondria przy 8 000 g. Osady analizowano chemicznie.

Mitochondria z zarodków żyta ozimego wyodrębniano w sposób podobny do ich izolacji z całych ziarniaków. Do homogenizacji brano 3,5 g zarodków dojrzewających ziarniaków. Pierwsze wirowanie homogenatu przeprowadzano przy 2 000 g; osad odrzucano, a z supernatantu izolowano mitochondria przy 15 minutowym wirowaniu, przy 10 000 g.

Wyodrębnianie organelli komórkowych wzorowano częściowo na publikacjach Sisakjana i in. (1960), Bartelsa i Wolfa (1965), oraz Christiansena (1964).

3. Analizy chemiczne wyodrębnionych organelli komórkowych. Otrzymane przy wirowaniu osady struktur komórkowych zawieszano w 0,5 M roztworze sacharozy, doprowadzając objętość każdej zawiesiny do określonej stałej wielkości. W obydwu frakcjach oznaczano suchą masę odłuszczonego preparatu, azot ogólny, azot białkowy, fosfor nieorganiczny, fosfor lipidowy oraz fosfor kwasów nukleinowych. Azot ogólny oraz azot białkowy określano metodą Kjeldahla, natomiast wymienione formy fosforu metodą Fiske'a i Subbarrowa (1925).

Tok postępowania przy wykonywaniu analiz. Z 6 ml zawiesiny plastydów lub mitochondriów pobierano 1 ml do oznaczenia N ogólnego. Pozostałą ilość (5 ml) zadawano 2 ml 20% kwasu trójchlorooctowego, doprowadzając stężenie kwasu do około 5%. Następnie plastydy lub mitochondria rozcierano w ciągu 20 minut w moździerzu, po czym zawiesinę wirowano przy 6000 g. Osad dwukrotnie przemywano 1% kwasem trójchlorooctowym i dwukrotnie wodą destylowaną. Wszystkie roztwory (supernatanty) łączono i oznaczano w nich P-(fosfor)nieorganiczny. Całą ekstrakcję P-nieorganicznego przeprowadzano w temperaturze około 2°C.

Osad pozostały po wirowaniu przemywano zimnym etanolem, ponownie odwirowywano i do nowego osadu wprowadzano mieszaninę etanolu i eteru (w stosunku 1:1). Zawiesinę utrzymywano w stanie wrzenia na łaźni wodnej w ciągu 10 minut przy temperaturze 55°C. Po jej odwirowaniu znów dodawano do osadu mieszaninę etanolu i eteru i procedurę powtarzano. Po kolejnym wirowaniu osad przemywano alkoholem i eterem oraz suszono go i ważono, określając jego masę jako masę tzw. suchego preparatu. Do tej wielkości (masy suchego preparatu) odnoszono częściowo wyniki analiz. Otrzymane podczas w. w. postępowania roztwory łączono i określano w nich P-(fosfor)lipidowy.

Z suchego preparatu organelli komórkowych ekstrahowano kwasy nukleinowe, wśród których, jak należy sądzić (S z a r k o w s k i, 1965; L e h n i n g e r, 1964), dominowały RNA. Ekstrakcję przeprowadzono w ten sposób, że osad zadawano 0,5 N HClO₄, po czym mieszaninę przetrzymywano w temperaturze 70°C przez 30 minut na łaźni wodnej (G u i n n, 1966). W cieczy znad osadu określano P-(fosfor) kwasów nukleinowych. W osadzie pozbawionym kwasów nukleinowych oznaczano azot białkowy. Wszystkie analizy chemiczne przeprowadzono przynajmniej w dwukrotnym powtórzeniu.

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

1. Masa suchych preparatów organelli komórkowych

Jak wynika z podanej uprzednio metodyki, suche preparaty organelli komórkowych nie stanowią całej ich masy, lecz tylko tę część, która pozostaje po ekstrakcji fosforu nieorganicznego, tłuszczowców i rozpuszczalnych (wolnych) cukrowców. Są to więc głównie białka, których ilość w mitochondriach dochodzi do 35—70% (P o t a p o w, D u b r o w, 1967), a w plastydach do 20—70% (F r e y W y s s l i n g, M ü h l e t h a l e r, 1965), oraz cukrowce.

Łączna masa suchych preparatów plastydów i mitochondriów wyodrębnionych z dojrzewających ziarniaków żyta wynosiła przeciętnie kilka promili suchej masy ziarna (Tabela 1). W bezwzględnych ilościach masa mitochondriów przeważała w pierwszych dniach formowania się ziarna nad masą plastydów, później zaś było odwrotnie.

Podstawową masę badanych plastydów stanowiły chloroplasty, zaś w mniejszej mierze chromoplasty i leukoplasty. W pierwszej połowie rozwoju ziarna chloroplasty skupione były głównie w bielmie, zaś w późniejszym okresie (dojrzałość woskowa) przeważnie w okrywie nasiennej, szczególnie zaś w okolicy zarodka.

Kształtowanie się suchej, odtłuszczonej masy organelli rozpatrzono w odniesieniu do 1000 ziarniaków lub 1000 zarodków, co pozwoliło na uzyskanie najwłaściwszego obrazu ich dynamiki. Z danych tabeli 1 wynika, że w miarę rozwoju ziarna poziom plastydów systematycznie wzrastał, osiągając maksimum na początku dojrzałości woskowej. Ziarno takie cechuje zazwyczaj największa żywotność (G r z e s i u k, 1961; S ó j k a, 1962).

Należy sądzić, że wykazany przyrost ilości plastydów podczas rozwoju ziarna wynikał ze zwiększenia się liczby organelli oraz wzrostu ich suchej masy. Obserwacje mikroskopowe wykazały ponadto, że chloroplasty ziarna bardziej zaawansowanego w rozwoju posiadały zdecydowanie większe rozmiary niż ziarniaków młodszych.

Tabela 1 — Table 1

Masa suchych preparatów plastydów i mitochondriów w formujących się ziarniakach żyta
 Dry matter of plastid and mitochondria preparations in the forming rye grain

Nr próby No. of sample	Dni po zapyle Days after pollination	Żyto jare — Spring rye			Żyto ozime — Winter rye		
		Sucha masa 1000 ziarn (w g) Dry matter of 1000 grains (in g)	Suchy preparat plastydów w mg/1000 ziarn Dry preparation of plastids in mg/1000 grains	Suchy preparat mitochondriów w mg/1000 ziarn Dry preparation of mitochondria in mg/1000 grains	Sucha masa 1000 ziarn (w g) Dry matter of 1000 grains (in g)	Suchy preparat plastydów w mg/1000 ziarn Dry preparation of plastids in mg/1000 grains	Suchy preparat mitochondriów w mg/1000 ziarn Dry preparation of mitochondria in mg/1000 grains
1	3	1,2	1,27	5,42	—	—	—
2	6	2,6	3,05	4,17	2,6	6,80	7,97
3	9	4,2	5,70	5,88	3,3	9,30	4,95
4	12	5,6	11,97	3,03	5,6	21,06	4,26
5	15	9,3	19,41	4,38	7,7	34,37	4,31
6	18	10,6	17,80	3,64	9,3	44,50	6,34
7	21	15,8	57,12	7,84	14,4	50,29	12,40
8	24	19,9	118,00	26,03	17,7	50,58	10,00
9	27	20,3	93,23	17,29	20,3	80,66	8,70
10	30	—	—	—	22,1	90,50	9,79
11	33	—	—	—	24,5	160,00	16,80

Rola chloroplastów w rozwijających się ziarniakach nie została dotychczas dostatecznie wyjaśniona. Można przypuszczać, że dostarczają one na drodze fotosyntezy pewnej ilości asymilatów oraz wzbogacają w tlen bielmo, a szczególnie tkanki zarodka.

Największa masa plastydów występowała w ziarnie w okresie maksymalnej syntezy skrobi (Grzesiuk, 1961). Potwierdzałoby to pogląd, że główna funkcja plastydów sprowadza się do gromadzenia materiałów zapasowych (Frey-Wyssling, Mühlethaler, 1965). Tym też należy tłumaczyć większą ilość plastydów w ziarnie żyta ozimego (bardziej skrobiowego), niż u żyta jarego.

Nieco odmiennie w formującym się ziarnie kształtowała się dynamika mitochondriów. W okresie formowania się bielma i zarodków poziom suchego preparatu mitochondriów podlegał pewnym wahaniom, zmniejszając się wyraźnie w końcowej fazie rozwoju zarodka (Tabela 1). Świadczy to prawdopodobnie o rozpoczynającym się procesie starzenia komórek endospermu. W tym bowiem okresie w tkankach bielma zaczyna się dość intensywne gromadzenie skrobi. W drugiej połowie dojrzałości młecznej i początkowej fazie woskowej stwierdzono natomiast wzrost suchego preparatu mitochondriów (próby od 7 do 11 u żyta ozimego). Wiązało

Tabela 2 — Table 2

Zawartość azotu białkowego i fosforu w mitochondriach 1000 zarodków dojrzewających ziarniaków żyta ozimego

Protein nitrogen and phosphorus content in mitochondria 1000 embryos of ripening winter rye

Nr próby ziarna No. of grain sample	Dni po zapyleniu Days after pollination	Sucha masa 1000 ziarn (g) Dry matter of 1000 grains (g)	Sucha masa 1000 zarodków (g) Dry matter of 1000 embryos (g)	Suchy preparat mitochondriów (mg) Dry preparation mitochondria (mg)	N-białkowy (μg) Protein-N (μg)	P-nieorganiczny (μg) Inorganic-P (μg)	P-lipidowy (μg) Lipid-P (μg)	P-kwasów nukleinowych (μg) Nucleic acid-P (μg)
10	30	22,1	0,556	5,50	252	8	18	23
12	36	25,1	1,201	21,20	1832	64	165	85
14	42	31,8	1,267	13,20	1264	59	69	55

się to zapewne z charakterystycznym dla tego etapu morfogenezy szybkim tempem rozwoju zarodka i komórek warstwy aleuronowej ziarna.

Wysoki poziom suchego preparatu mitochondriów obserwowano również w zarodkach (Tabela 2). Zawierały one znacznie więcej tych organelli (w odniesieniu do suchej masy) niż formujące się bielmo. W okresie sześciu dni zarodki podwoiły swoją masę, towarzyszył zaś temu aż czterokrotny wzrost poziomu frakcji mitochondrialnej w ich tkankach. W dalszych okresach rozwoju ziarniaków sucha masa zarodków wzrastała już tylko nieznacznie, a poziom frakcji mitochondrialnej znacznie spadał.

Analogiczne dane uzyskano o mitochondriach rozwijających się zarodków nasion słonecznika (Prokofiew i Radionowa, 1966) oraz ziarniaków jęczmienia (Grzesiuk, Sójka, Rotkiewicz, 1970). Wynika z nich, że największa ilość mitochondriów wytwarza się w zarodkach w pierwszym okresie dojrzałości woskowej. Wskazuje to, że w tym okresie embriogenezy w tkankach zarodka ma miejsce duże natężenie procesów metabolicznych. Wiadomo również, że całe ziarniaki o takim samym stopniu rozwoju wykazują zwykle największą energię i zdolność kiełkowania oraz wydają rośliny cechujące się wzmożonym potencjałem życiowym (Grzesiuk, 1961; Sójka, 1962).

2. Skład chemiczny plastydów i mitochondriów

W rozwoju komórek ich organelle zmieniają zarówno swój kształt i skład chemiczny, jak i ogólną aktywność i funkcje (Frey-Wysslig, Mühlethaler, 1965).

A. Azot plastydów i mitochondriów. Ilość azotu ogólnego plastydów, a także mitochondriów dojrzewających ziarniaków żyta

Tabela 3 — Table 3

Zawartość azotu ogólnego w plastydach i mitochondriach w mg na 1000 ziarn żyta ozimego

Total nitrogen content of plastids and mitochondria in mg per 1000 grains of winter rye

Nr próby No of sample	Dni po zapyleniu Days after pollination	Sucha masa 1000 ziarn (w g) Dry matter of 1000 grains (in g)	Plastids	Mitochondria
2	6	2,6	0,85	1,31
3	9	3,3	0,86	0,73
4	12	5,6	1,74	0,52
5	15	7,7	4,81	0,54
6	18	9,3	3,01	1,97
7	21	14,4	5,89	2,99
8	24	17,7	4,85	3,82
9	27	20,3	14,78	1,92
10	30	22,1	13,83	1,87
11	33	24,1	13,63	—

Tabela 4 — Table 4

Zawartość azotu w plastydach i mitochondriach w mg na 1000 ziarn żyta jarego

Nitrogen content of plastids and mitochondria in mg per 1000 grains of spring rye

Nr próby No. of sample	Dni po zapyleniu Days after pollination	Sucha masa 1000 ziarn (w g) Dry matter of 1000 grains (in g)	Azot ogólny — Total nitrogen		Azot białkowy — Protein nitrogen	
			Plastids	Mitochondria	Plastids	Mitochondria
1	3	1,2	1,0	1,46	0,10	0,44
2	6	2,6	1,52	1,83	0,10	0,50
3	9	4,2	1,94	1,95	0,17	0,40
4	12	5,6	1,80	0,55	1,03	0,24
5	15	9,3	2,92	—	1,44	0,46
6	18	10,6	—	—	3,05	0,35
7	21	15,8	10,27	2,97	4,50	0,59
8	24	19,9	16,36	5,79	6,26	1,99
9	27	20,3	26,38	5,98	6,99	1,47

wynosiła z reguły mniej niż 1‰ suchej masy ziarna (Tabele 3 i 4). Plastyny i mitochondria ziarna żyta jarego zawierały znacznie więcej azotu ogólnego niż analogiczne organelle żyta ozimego.

Podczas ontogenezy ziarniaków, zawartość azotu ogólnego i białkowego plastydów wzrastała początkowo bardzo powoli. Jednak w drugiej połowie dojrzałości młecznej i w początkowym okresie dojrzałości wosko-

Tabela 5 — Table 5

Zawartość azotu i fosforu w mitochondriach zarodków dojrzewających ziarniaków żyta ozimego w mg na 1 g suchego preparatu

Nitrogen and phosphorus content in mitochondria of embryos of developing winter rye grain in mg per 1 g dry preparation

Nr próby No of sample	Dni po zapyleniu Days after pollination	N-ogólny Total-N	N-białkowy Protein-N	P-nieorganiczny Inorganic-P	P-lipidowy Lipid-P	P-kwasów nukleinowych Nucleic acid-P
10	30	210,58	45,85	1,45	3,27	4,25
12	36	187,78	86,44	3,00	7,80	4,00
14	42	324,54	95,77	4,54	5,21	4,24

wej ilość azotu ogólnego i białkowego kilkakrotnie wzrastała i utrzymywała się na wysokim poziomie.

Podobna prawidłowość dotyczyła azotu ogólnego i białkowego mitochondriów żyta jarego. Natomiast zawartość azotu ogólnego mitochondriów żyta ozimego wzrastała aż do momentu uzyskania przez ziarniaki końcowej fazy dojrzałości mleczonej, po czym od początku dojrzałości woskowej notowano jej spadek.

Przedstawione wyniki wskazują, że w plastydach formujących się ziarniaków żyta do początku trzeciego etapu embriogenezy zwiększała się zawartość białek. Plastydy te cechowała duża aktywność i nie wykazywały one objawów starzenia się.

Zawartość azotu białkowego mitochondriów zarodków żyta ozimego (Tabela 2) w początkowym okresie dojrzałości woskowej była niewielka, lecz już 6 dni później (w wyniku czterokrotnego wzrostu ilości mitochondriów) podnosiła się aż siedmiokrotnie. W przeciągu następnego tygodnia, to jest do chwili uzyskania przez ziarno dojrzałości pełnej, poziom azotu białkowego mitochondriów ponownie obniżył się o 30%. Ten wysoki spadek zawartości białka wynikał niewątpliwie z zahamowania procesu tworzenia nowych mitochondriów oraz był efektem starzenia się już istniejących. Znalazło to również potwierdzenie w obniżonej ilości kwasów nukleinowych odpowiedzialnych za syntezę związków białkowych (Sisakjan, Mielik-Sarkisjan, 1962; Frey-Wyssling, Mühlethaler, 1965).

Należy jednak zaznaczyć, że w odtłuszczonej preparacie mitochondriów zarodków względna ilość azotu ogólnego i białkowego wzrastała aż do pełnej dojrzałości ziarna (Tabela 5).

B. Fosfor plastydów i mitochondriów. W rozwijających się ziarniakach obydwu badanych form żyta zawartość fosforu nieorganicznego, lipidowego i nukleinowego frakcji plastydowej z pewnymi

wahaniami zwiększała się aż do uzyskania przez ziarno dojrzałości woskowej (Tabela 6 i 7). Wiązało się to ściśle z ilościowym wzrostem masy tych organelli (por. tabela 1). Te same wartości w odniesieniu do masy

Tabela 6—Table 6

Zawartość fosforu w plastydach i mitochondriach w μg na 1000 ziarn żyta ozimego
Phosphorus content of plastids and mitochondria of winter rye in μg per 1000 grains

Nr próby No. of sample	Dni po zapyle Days after pollination	Sucha masa 1000 ziarn (w g) Dry matter of 1000 grains (in g)	P-nieorganiczny Inorganic -P		P-lipidowy Lipid-P		P-kwasów nukleinowych Nucleic acid-P	
			Plastids	Mito- chondria	Plastids	Mito- chondria	Plastids	Mito- chondria
2	6	2,6	24	37	45	58	—	32
3	9	3,3	7	13	56	30	72	25
4	12	5,6	31	6	46	—	64	—
5	15	7,7	70	9	139	21	106	6
6	18	9,3	95	10	90	13	78	8
7	21	14,4	59	20	106	40	89	16
8	24	17,7	228	22	175	44	62	20
9	27	20,3	231	19	—	17	208	18
10	30	22,1	385	28	95	25	271	24
11	33	24,5	1000	53	160	31	499	34

Tabela 7—Table 7

Zawartość fosforu w plastydach i mitochondriach w μg na 1000 ziarn żyta jarego
Phosphorus content of plastids and mitochondria of spring rye in μg per 1000 grains

Nr próby No. of sample	Dni po zapyle Days after pollination	Sucha masa 1000 ziarn (w g) Dry matter of 1000 grains (in g)	P-nieorganiczny Inorganic-P		P-lipidowy Lipid-P		P-kwasów nuklei-nowych Nucleic acid-P	
			Plastids	Mito- chondria	Plastids	Mito- chondria	Plastids	Mito- chondria
1	3	1,2	3	26	32	50	3	19
2	6	2,6	4	14	—	—	8	16
3	9	4,2	25	25	43	63	57	17
4	12	5,6	49	9	76	12	57	10
5	15	9,3	74	121	56	8	81	16
6	18	10,6	210	131	54	7	77	16
7	21	15,8	196	159	172	17	253	27
8	24	19,9	236	338	118	—	335	87
9	27	20,0	839	320	317	46	259	57

suchego preparatu plastydów (Tabela 8 i 9) wykazały, że w miarę rozwoju ziarna zwiększała się w plastydach ilość fosforu nieorganicznego, malała natomiast ilość fosforu lipidowego. Stosunkowo duży spadek za-

Tabela 8 — Table 8

Zawartość różnych form fosforu w plastydach i mitochondriach żyta ozimego w mg na 1 g suchego preparatu

Content of different phosphorus forms of plastids and mitochondria of winter rye in mg per 1 g dry preparation

Nr próby No. of sample	Dni po zapy- leniu Days after pollination	P-nieorganiczny Inorganic-P		P-lipidowy Lipid-P		P-kwasów nukleinowych Nucleic acid-P	
		Plastids	Mito- chondria	Plastids	Mito- chondria	Plastids	Mito- chondria
2	6	3,51	4,70	6,60	7,33	—	4,00
3	9	0,81	2,65	6,00	6,15	7,75	5,03
4	12	1,49	1,33	2,18	—	3,02	—
5	15	2,03	2,20	4,05	4,80	3,08	1,37
6	18	2,14	1,62	2,02	2,05	1,76	1,20
7	21	1,18	1,64	2,10	3,20	1,77	1,23
8	24	4,50	2,16	3,46	4,40	1,23	2,05
9	27	2,86	2,80	—	2,56	2,58	2,65
10	30	4,25	3,55	1,05	3,26	3,00	3,29
11	33	6,25	3,19	1,00	1,85	3,12	2,00

Tabela 9 — Table 9

Zawartość różnych form fosforu w plastydach i mitochondriach żyta jarego w mg na 1 g suchego preparatu

Content of different phosphorus forms of plastids and mitochondria of spring rye in mg per 1 g dry preparation

Nr próby No. of sample	Dni po zapy- leniu Days after pollination	P-nieorganiczny Inorganic-P		P-lipidowy Lipid-P		P-kwasów nukleinowych Nucleic acid-P	
		Plastids	Mito- chondria	Plastids	Mito- chondria	Plastids	Mito- chondria
1	3	2,73	4,78	2,50	9,20	2,38	3,50
2	6	1,50	3,33	—	—	2,60	3,87
3	9	4,39	4,25	7,64	10,77	10,10	2,91
4	12	4,13	2,95	6,33	4,00	4,80	3,31
5	15	3,81	27,56	2,89	1,80	4,19	3,74
6	18	11,80	36,00	3,05	1,97	4,32	4,35
7	21	11,56	20,27	3,01	2,14	4,43	3,44
8	24	20,00	13,00	1,00	—	2,84	3,36
9	27	9,00	18,53	3,50	2,65	2,78	3,28

wartości fosforu lipidowego w okresie dojrzałości woskowej ziarna prawdopodobnie wskazuje na pierwsze oznaki zmniejszania się aktywności plastydów i zapoczątkowanie procesu ich starzenia.

Poziom fosforu nukleinowego w plastydach rozwijającego się ziarna był stosunkowo stały, malał on jednak wraz z postępującą dojrzałością ziarna (Tabela 9). Większy spadek tej formy fosforu w trzecim etapie embriogenezy w plastydach żyta jarego wskazywał na wcześniejsze zapoczątkowanie starzenia się plastydów tego żyta i jego szybsze wchodzenie w okres spoczynku niż żyta ozimego. Powyższe obserwacje zgodne są z danymi Frey - Wysslinga o spadku zawartości kwasów nukleinowych w starzejących się chloroplastach (Frey - Wyssling, Mühlethaler, 1965).

Zawartość związków fosforowych w mitochondriach dojrzewających ziarniaków (Tabele 8—9) układała się bardzo podobnie do opisanej wyżej prawidłowości. W miarę rozwoju ziarniaków bezwzględna zawartość fosforu nieorganicznego oraz częściowo fosforu kwasów nukleinowych (Tabela 6 i 7) z pewnymi wahaniemmi zwiększała się aż do dojrzałości woskowej. Ilość fosforu lipidowego ulegała w tym czasie dużym wahaniom, lecz utrzymywała się w zakresie pewnego stałego poziomu.

Wymienione wartości w przeliczeniu na masę suchego preparatu (Tabela 8 i 9) wykazały, że względna ilość fosforu nieorganicznego w okresie zasadniczego formowania bielma malała w mitochondriach, następnie w etapie formowania zarodka wzrastała, po czym już pod koniec tego etapu u żyta jarego ponownie się obniżała. Prawidłowość ta potwierdza uprzednio wysunięty wniosek, że pierwsze objawy starzenia mitochondriów wystąpiły na początku trzeciego etapu embriogenezy. Biorąc zaś pod uwagę, że względna zawartość fosforu nieorganicznego w mitochondriach ziarniaków żyta jarego była kilkakrotnie większa niż u żyta ozimego, a oddychanie ziarna żyta jarego znacznie słabsze niż ozimego (por. Grzesiuk, 1961; Sójka 1961) należy przypuszczać, że natężenie fosforylacji oksydacyjnej w mitochondriach ziarniaków żyta jarego było znacznie mniejsze niż u żyta ozimego. Stąd też ziarniaki żyta jarego wcześniej wykazywały objawy obniżonej żywotności, która sygnalizowała popadanie ich w abiozę.

Względna zawartość fosforu lipidowego w mitochondriach żyta ozimego zmniejszała się do początku trzeciego etapu embriogenezy, natomiast w ziarnie żyta jarego do połowy drugiego etapu, po czym powoli zwiększała się. Dane te ponownie wskazują na wcześniejszą utratę aktywności mitochondriów żyta jarego.

Względna zawartość fosforu kwasów nukleinowych w mitochondriach ziarniaków wahała się w pobliżu pewnego stałego poziomu i zgodna była z danymi innych autorów (Frey - Wyssling, Mühlethaler, 1965). Podobne wyniki uzyskano również dla całych ziarniaków (Kulka, 1966, 1966a).

W izolowanych zarodkach żyta ozimego przyrostowi bezwzględnej ilości kwasów nukleinowych frakcji mitochondrialnej odpowiadał w przybliżeniu wzrost bezwzględnej zawartości azotu białkowego (Tabela 2). Stwierdzono, że w okresie dojrzałości syntezy woskowej synteza białka tej frakcji była dwukrotnie wyższa niż w końcowej fazie dojrzewania ziarna oraz w czasie dojrzałości pełnej. Wzrost ilości fosforu nieorganicznego w mitochondriach zarodków, w ostatniej fazie dojrzewania ziarna (Tabela 5) wynikał prawdopodobnie ze zmniejszonej zdolności przeprowadzania procesów fosforylacji przez te organelle.

STRESZCZENIE I WNIOSKI

Badano zmiany ilościowe i skład chemiczny frakcji plastydowej i mitochondrialnej rozwijającego się ziarna żyta jarego i ozimego. Próbkę formujących się ziarniaków żyta ozimego i jarego pobierano do analiz co 3 dni, począwszy od trzeciego (żyto jare) i szóstego dnia (żyto ozime) po zapyleniu, a zakończono na początku dojrzałości woskowej. Z ostatniego etapu dojrzewania ziarniaków żyta ozimego pobierano próbki wyizolowanych zarodków. W otrzymanych frakcjach organelli komórkowych oznaczono: azot ogólny i białkowy, fosfor nieorganiczny, lipidowy i kwasów nukleinowych. Stwierdzono:

1. Podczas rozwoju ziarniaków żyta (ozimego i jarego) zwiększa się w nich masa (suchych preparatów) plastydów i mitochondriów. Największą masę wymienionych organelli posiada ziarno w trzecim etapie embriogenezy, zarodki zaś w końcowej fazie tego etapu.
2. W miarę rozwoju ziarniaków szybciej rośnie w nich masa plastydów niż mitochondriów. Prawdopodobnie wiąże się to z gromadzeniem przez plastydy materiałów zapasowych (skrobi).
3. Dojrzewające ziarno żyta ozimego (bardziej skrobiowe) zawiera więcej plastydów niż ziarno żyta jarego.
4. Skład chemiczny plastydów i mitochondriów zmienia się podczas ontogenezy ziarniaków żyta.
5. Intensywnemu przyrostowi masy zarodków w okresie dojrzałości woskowej, towarzyszy szybki przyrost azotu białkowego, fosforu nieorganicznego, lipidowego i kwasów nukleinowych frakcji mitochondrialnej.

*Katedra Fizjologii Roślin WSR
w Olsztynie*

(Wpłynęło 16.2.1970 r.)

SUMMARY AND CONCLUSIONS

There were studied quantitative changes and chemical composition of plastide and mitochondrial fractions of developing spring and winter rye grain. The samples of the developing rye grains were taken for chemical analyses every three days starting from the third (spring rye) and the sixth day (winter rye) after pollination, and they were concluded to the beginning of the waxy stage. At the latter stage samples were taken from the isolated embryos of the grains. Total and protein nitrogen and inorganic, lipid and nucleic acid phosphorus were determined in several organelles fractions. It was found:

1. During the development of winter and spring rye grains there is an increase of plastids and mitochondria in dry matter. The greatest mass of mentioned organelles was found in the grains in third stage of embryogenesis and in embryos — in the final phase of this stage.

2. In the course of grain development the mass of plastids increases faster than that of mitochondria. Probably it is connected with the accumulation of reserve materials (starch) in plastids.

3. The ripening winter rye grain (richer in starch) contains a greater mass of plastids than the spring rye grains.

4. The chemical composition of plastids and mitochondria changes during ontogenesis of rye grains.

5. Contemporaneously with the intensive increase of embryos mass in the wax stage it is observed the fast increase of protein nitrogen and inorganic, lipid and nucleic acid phosphorus of mitochondrial fraction.

High School of Agriculture, Olsztyn 5

Department of Plant Physiology,

Head: Prof. dr St. Grzesiuk

LITERATURA

- Abu-Shakra Salah S., Ching Te May, 1967, Mitochondrial activity in germinating new and old soybean seeds, *Crop. Sci.* 7 (2): 115—118.
- Bartels P. G., Wolf F. T., 1965, The effect of amitrole upon nucleic acid and protein metabolism of wheat seedlings, *Physiologia Plant.* 18 (3): 805—812.
- Bonner W. D., 1965, Mitochondria and electron transport. Z książki „Plant biochemistry” pod red. Bonner J., Verner J. E., Academic press New York and London, 89—120.
- Christiansen K., 1964, Isolation of red beet mitochondria in sucrose solutions, *Physiologia Plant.*, 17 (4): 884—889.
- Dickinson D. B., Hanson J. B., 1965, Comparasion of mitochondria from tomato fruits at various stages of ripeness, *Plant Physiol.* 40 (2): 161—165.
- Fieske C. H. Subbarow J. J., 1925, The colorimetric determination of phosphorus, *J. Biol. Chem.*, 66: 375—400.
- Frey-Wyssling A., Mühlethaler K., 1965, Ultrastructural plant cytology. Elsevier Publ. Comp., Amsterdam—London—New York.
- Grzesiuk St., 1961, Studia nad fizjologią dojrzewającego ziarna zbóż. Zeszyty Naukowe WSR w Olsztynie 11 (104): 3—82.
- Grzesiuk St., 1967, Fizjologia nasion, PWRiL, Warszawa.
- Grzesiuk St., Sójka E., Rotkiewicz D., 1970, Fizjologiczne właściwości ziarna jęczmienia jarego „Browarny PZHR”, otrzymanego z roślin traktowanych herbicydami, Zeszyty problemowe PNR (w druku).
- Guinn G., 1966, Exstraction of nucleic acids lyophilized plant material, *Plant Physiol.* 41 (4): 689—695.
- Kulka K., 1966, Kwasy nukleinowe w rozwijającym się ziarnie żyta. Cz. I. Ogólna zawartość kwasów nukleinowych w formującym się ziarniaku, *Acta Soc. Bot. Pol.* 35 (1): 17—24.
- Kulka K., 1966a, Kwasy nukleinowe w rozwijającym się ziarnie żyta. Cz. II. Dynamika RNA, DNA oraz niektórych frakcji związków fosforu w formującym się ziarniaku, *Acta Soc. Bot. Pol.* 35 (2): 273—279.

- Lado P., Schwendimann M., 1967, Changes of mitochondrial RNA level during the transition from rest to growth in the endosperm of germination castor beans, *Life Sci.* 7 (16): 1681—1690.
- Lehninger A. L., 1964, *The mitochondrion*, W. A. Benjamin, Inc. New York, Amsterdam.
- Potapow H. G., Dubrow A. P., 1967, Strukturalna organizacija rastitelnoj kletki, Z książki „Fizjologia sieliskochozajstwiennych rastienij, 1: 15—56.
- Prokofiew A. A., 1968, Formirowanie siemian kak organow zapasa, *Timirjazijskoje cztenija* 27, Izd. „Nauka”, Moskwa.
- Prokofiew A. A., Rodionowa M. A., 1966, Izmienienije mitochondrij zarodyszzej podsolnecznika na raznych etapach formirowanija siemieni, *Fizjologia rast.*, 13 (5): 819—823.
- Sójka E., 1961, Badania nad fizjologią i biochemią rozwijającego się ziarna żyta (*Secale cereale* L.). Cz. I. Morfologia rozwoju oraz fizjologiczne właściwości dojrzewającego ziarna. *HRAiN*, 5 (6): 689—703. Cz. II. Związki azotowe w dojrzewającym ziarnie, *HRAiN* 5 (6): 705—720.
- Sójka E., 1962, Badania nad fizjologią i biochemią rozwijającego się ziarna żyta (*Secale cereale* L.). Cz. III. Wpływ dojrzałości ziarna siewnego na plonowanie roślin oraz ich odporność na suszę i niskie temperatury, *HRAiN* 6 (1): 1—19. Cz. IV. Zależność przedsiewnej jaryzacji od stopnia dojrzałości ziarna siewnego, *HRAiN*, 6 (2): 157—172.
- Sisakjan N. M., Odincowa M. S., Czerkaszina N. A., 1960, Nukleotydnyj sostaw ribonukleinowych kislot kletocznych struktur rastienij, *Biochimia* 25 (1): 160—163.
- Sisakjan N. M., Mielik-Sarkisjan S. S., 1962, Białki chloroplastow, *Uspiechi Biolog. Chimii* 4: 3—41.
- Szarkowski J. W., 1965, Badania porównawcze nad kwasami rybonukleinowymi rybonukleazami zielonych i etiolowanych roślin wyższych, *Monografie Biochemiczne* 10, PWN, Warszawa.