

KWASY NUKLEINOWE W KOŃCOWYCH ETAPACH DOJRZEWANIA ZIARNA JĘCZMIENIA JAREGO

Ryszard Górecki, Stanisław Grzesiuk

Instytut Biologii Roślin AR-T, Olsztyn

WSTĘP

Proces rozwoju ontogenetycznego ziarna zbóż dzieli się na trzy wyraźnie zróżnicowane etapy [5-8, 36]:

- etap formowania bielma i prozarodka (faza dojrzałości zielonej),
- etap zasadniczego formowania zarodka i częściowego gromadzenia materiałów zapasowych (faza dojrzałości mlecznej),
- etap zasadniczego gromadzenia materiałów zapasowych, utraty wody i przejścia w stan spoczynku (faza dojrzałości woskowej i pełnej dojrzałości fizjologicznej).

Poszczególnym etapom morfogenezy ziarniaka towarzyszą odpowiednie zmiany fizjologiczne i biochemiczne. Wiążą się one z metabolizmem węglowodanów, białek, kwasów nukleinowych (NA) oraz dynamiką aktywności enzymów i witamin. Dlatego też dojrzewające ziarno posiada zmienną aktywność fizjologiczną, przejawiającą się między innymi w niejednakowej zdolności do kiełkowania. Najwyższą wartość biologiczną osiąga ziarno w pierwszej połowie trzeciego etapu embriogenezy, tj. na początku dojrzałości woskowej. Biologiczne właściwości dojrzewających nasion wpływają następnie na wzrost, rozwój i plonowanie roślin z nich wyrosłych [5, 6, 19, 31, 32, 37].

Rozpatrując ontogenezę pojedynczej komórki, organu czy też całej rośliny, można wyróżnić w niej dwa zasadniczo różne etapy przemiany materii [17]. Etap pierwszy przypada na wzrost embrionalny tkanek i charakteryzuje się tzw. „podstawową” przemianą materii, właściwą wszystkim organizmom żywym. W tym okresie zachodzą intensywne procesy strukturotwórcze, prowadzące do syntezy białek konstytucjonalnych i tłuszczowców; formują się także pierwsze organelle komórkowe. Tworzenie tych podstawowych składników protoplazmy poprzedzone jest zawsze intensywną biosyntezą kwasów nukleinowych. Związki te na po-

czątku fazy embrionalnej nagromadzają się w największych ilościach, co wyraźnie zaznacza się w wysokiej aktywności metabolicznej komórki. Natomiast drugi etap stanowi specyficzną przemianę materii, związaną z dyferencjacją komórek roślinnych. W tym okresie kwasy nukleinowe będące podstawowymi składnikami cytoplazmy biorą udział w syntezie substancji zapasowych komórki.

W ontogenezie nasion obserwuje się charakterystyczne prawidłowości w syntezie związków organicznych. Najpierw gromadzą się w nich związki fosforowe, a wśród nich NA, dopiero później takie substancje jak cukry proste, skrobia, hemicelulozy, białka zapasowe i inne związki chemiczne stanowiące suchą masę nasion. Na tej podstawie można przypuszczać, że intensywne przemiany metaboliczne zachodzące w dojrzewającym nasieniu wiążą się z uprzednią biosyntezą kwasów nukleinowych i innych związków fosforowych [21].

Występowanie kwasów nukleinowych w nasionach wiąże się nie tylko z ich rozwojem. Część tych związków odkłada się w nasionach w postaci substancji zapasowych, które zostają zużyte w początkowym okresie kiełkowania. Prawdopodobnie przerwanie lub wyjście nasion z głębokiego spoczynku jest uwarunkowane nagromadzeniem w tkankach merystematycznych odpowiedniej ilości NA i innych związków organicznych [18].

Przy obecnym stanie wiedzy trudno jest określić, w czym tkwi zmniejszona aktywność fizjologiczna dojrzewających nasion. Biorąc pod uwagę biologiczną rolę kwasów nukleinowych w nasionach wydaje się, że związki te zasługują w tym przypadku na szczególną uwagę. Należy nadmienić, że badania nad kwasami nukleinowymi rozwijających się nasion są mało zaawansowane i dotyczą głównie ich ogólnej dynamiki w procesie dojrzewania. Brak więc bardziej szczegółowych danych na ten temat był bezpośrednią przyczyną podjęcia niniejszych badań.

Celem pracy było prześledzenie zmian frakcji kwasów nukleinowych w zarodkach dojrzewającego ziarna jęczmienia jarego. Badania takie mogą rzucić nowe światło na wyjaśnienie niejednakowej żywotności ziarna o różnym stopniu dojrzałości.

MATERIAŁ I METODYKA BADAŃ

Badania przeprowadzono w 1974 r. na dojrzewającym ziarnie jęczmienia jarego, odmiany Piast. Próby do analiz pobierano w fazie dojrzałości woskowej i pełnej. Bezpośrednio po zbiorze roślin wyjmowano ziarniaki ze środkowych partii kłosa. Następnie określono energię i zdolność kiełkowania świeżego ziarna; oznaczono też jego suchą masę. Pozostałe ziarno suszono w laboratorium na wolnym powietrzu przez okres 14 dni. Tak przygotowany do dalszych badań materiał przechowywano w labora-

torium w suchym i chłodnym miejscu. Analizy chemiczne NA wykonywano na zarodkach (zawsze świeżo przygotowywanych do tego celu). Zarodki izolowano ręcznie za pomocą igły preparacyjnej. W celu zahamowania aktywności enzymatycznej czynność tę wykonywano w temperaturze około $+1^{\circ}\text{C}$. Dla ułatwienia izolowania zarodków ziarno poddawano pęcznieniu przez około 12 godzin w temp. około $0-1^{\circ}\text{C}$.

W niniejszej pracy izolowanie NA przeprowadzano według metody Kirby [16] odpowiednio zmodyfikowanej (o czym niżej).

Okolo 4 g wyizolowanych, a następnie zamrożonych zarodków ziarna jęczmienia jarego homogenizowano za pomocą robota laboratoryjnego, typ 309 dodając bentonit (w ilości 15 mg/g tkanki) i 0,025 M bufor Tris-HCl o pH 7,6 z dodatkami (siarczan dodecyłu sodu, MgCl_2 , KCl). Otrzymany w ten sposób homogenat zadawano zbuforowanym fenolem w ilości 4 ml czystego fenolu/1 g tkanki (przy pomocy buforu Tris-HCl o pH 7,6) i mieszano przez 30 min. Następnie płyn odwirowywano przez 20 min. przy 3000 g. Po odwirowaniu nadsącz zadawano ponownie fenolem i bentonitem (jak poprzednio), po czym mieszaninę pozostawiano w chłodzie. Natomiast do dolnej fazy wprowadzano wyżej wymieniony bufor Tris-HCl i wirowano mieszaninę jak poprzednio. Po odwirowaniu ponownie zbierano warstwę górną i dołączano do poprzednio zebranej, a osad odrzucało. Połączone fazy wodne zawierające fenol i bentonit odwirowywano w tych samych warunkach. Po odwirowaniu zebrany nadsącz wytrząsano w mieszaninie chloroformu i alkoholu izoamylowego przygotowanej w stosunku 10:1 (czynność odbiaćczania przeprowadzono dwukrotnie, do zaniku żelu na granicy faz). Po odwirowaniu warstwy wodnej ekstrakt zadawano 96% etanolem. Wytrącone w ten sposób kwasy nukleinowe pozostawiano w temperaturze -20°C przez około 12 godzin.

Następnie po odwirowaniu i odrzuceniu etanolu otrzymany preparat NA oczyszczano dalej według metody Ralpa i Bellamy'ego [30].

Przygotowane w wyżej podany sposób próbki kwasów nukleinowych rozpuszczano następnie w 10 ml 0,05M buforu fosforanowego o pH 6,8, zawierającego 0,3M NaCl, po czym nanoszono roztwór NA na kolumnę chromatograficzną. Przed tym jednak pobierano próbę (10-krotnie rozcieńczoną) w celu oznaczenia zawartości ogólnej NA i sprawdzenia ich stopnia odbiaćczania. Mierzono absorbcję przy 280 i 260 nm. Stopień odbiaćczania wyliczano ze stosunku $\frac{E_{280}}{E_{260}}$. Wartość ilorazu w dobrze oczyszczonych preparatach NA wahała się w granicach od 0,48 do 0,50.

Preparaty kwasów nukleinowych frakcjonowano, na kolumnach z metylowaną albuminą osadzoną na ziemi okrzemkowej — MAK, według metody Mandella i Hersheya [25] w modyfikacji stosowanej przez Filka [3]. 12 g celitu 545 zalewano 100 ml 0,05M buforu fosforanowego o pH

6,8 (zawierającego 0,1M NaCl) i gotowano przez kilka minut w celu usunięcia pęcherzyków powietrza. Po ostudzeniu dodawano 5 ml 1% roztworu metylowanej albuminy. Do chromatografii stosowano kolumnę szklaną o średnicy wewnętrznej 1,5 cm z płaszczem wodnym. Na wbudowanym w dolnej części kolumny spieku szklanym G1 umieszczano krążek bibuły. Na wierzchołku uformowanego złoża w kolumnie, stanowiącego mieszaninę ziemi okrzemkowej z metylowaną albuminą, umieszczano warstwę ochronną 1 g ziemi okrzemkowej bez albuminy. Napełnianie kolumny i chromatografię NA w gradiencie stężenia NaCl przeprowadzano w temperaturze 25°C. Po osadzeniu NA (uprzednio rozpuszczonych w buforze fosforanowym) na kolumnie MAK, poszczególne ich frakcje wymywano zbuforowanym (przy pomocy 0,05M buforu fosforanowego o pH 6,8) roztworem NaCl o liniowym gradiencie stężenia w granicach 0,3 do 1,2M. Przepływ płynu w układzie chromatograficznym regulowano za pomocą pompy perystaltycznej. Szybkość przepływu wynosiła 50-80 ml/godzinę. Zbierano frakcje o objętości 5 ml, w których następnie oznaczano spektrofotometrycznie zawartość NA.

Na podstawie zmian absorpcji światła ultrafioletowego wykreślano profile chromatograficzne rozdzielonych na frakcje kwasów nukleinowych.

Wyniki zawartości NA w badanych próbach podawano w jednostkach ekstynkcji przyjmując za jednostkę tę ilość NA, która powodowała przyrost ekstynkcji $E_{260\text{nm}}^{1\text{cm}}$ o 0,01.

WYNIKI I DYSKUSJA

KIELKOWANIE ZIARNA

W tabeli 1 zamieszczono wyniki energii i zdolności kiełkowania ziarna jęczmienia jarego zebranego w dojrzałości woskowej i pełnej dojrzałości morfologicznej. Z danych tych wynika, że ziarno zebrane w dojrzałości

Tabela 1

Kiełkowanie ziarna jęczmienia jarego
o różnej dojrzałości

Dojrza- łość ziarna	Energia	Zdolność kiełko- wania
		%
Woskowa	94	99
Pełna	91	97

woskowej charakteryzowało się wyższą żywotnością od ziarna zebranego w dojrzałości pełnej. Zaobserwowane prawidłowości potwierdzają wcześniejsze badania Grzesiuka [5] i Sójki [36].

Jak wykazały niektóre badania [5, 31, 36] świeże i niedojrzałe ziarno zbóż może kiełkować w niewielkim procencie już po upływie 9-15 dni od chwili zapłodnienia. Następnie, w miarę jego rozwoju, zdolność do kiełkowania wzrasta, osiągając wartości maksymalne na początku dojrzałości woskowej, tj. w okresie intensywnego gromadzenia materiałów zapasowych. Natomiast pod koniec dojrzewania zdolność ta się obniża. Jednocześnie przedłuża się średni czas kiełkowania, co związane jest z nagromadzeniem się w ziarnie inhibitorów, w wyniku czego przechodzi ona w okres spoczynku późniejszego. Maksymalna zdolność kiełkowania ziarna na początku trzeciego okresu ontogenezy tłumaczona jest przez Grzesiuka [6] największym nagromadzeniem w tym czasie rozpuszczalnych w wodzie białek, cukrowców, witamin oraz obecnością zasadniczych kompleksów enzymatycznych. W tym okresie zarodek jest całkowicie wykształcony i obserwuje się niewielką ilość inhibitorów, które mogłyby hamować wzrost kiełka.

SUCHA MASA BIELM I ZARODKÓW

Kształtowanie się ciężaru suchej masy zarodków i bielm przedstawia tabela 2. Wynika z niej, że ciężar ten był nieco wyższy w okresie dojrzałości pełnej niż w okresie dojrzałości woskowej. Rozwój ziarna, w tym także i zarodka, kończył się wprawdzie na początku dojrzałości woskowej, lecz zwiększanie się jego rozmiarów trwało do końca pełnej dojrz-

Tabela 2

Kształtowanie się suchej masy zarodków i bielm dojrzewającego ziarna jęczmienia jarego

Dojrza- łość ziarna	Sucha masa, mg		
	100 zarodków	100 bielm	razem
Woskowa	78	2843	2921
Pełna	89	2935	3024

łości morfologicznej. Przedstawiane dane wskazują na dość wyraźny przyrost suchej masy endospermu i zarodka w końcowych etapach dojrzewania ziarna.

Jednakże przytoczone wyniki oznaczeń suchej masy są odmienne od wyników badań Grzesiuka [5], Rejowskiego [31] i Sójki [36]. Autorzy ci

bowiem wykazali, że sucha masa rozwijającego się ziarna zbóż wzrastała bardzo szybko, osiągając wartość najwyższą w połowie dojrzałości woskowej. W miarę jednak osiągnięcia przez ziarno pełnej dojrzałości, jego sucha masa zmniejszała się. Istota tego zjawiska uzasadniona jest przekształcaniem się w ziarnie cukrowców prostych w bardziej złożone, połączone jest z wydzielaniem wody uprzednio związanej chemicznie. Przyczyną obniżania się suchej masy w końcowych etapach dojrzewania może też być duże natężenie oddychania przy jednoczesnym zahamowaniu odpływu związków odżywczych z rośliny macierzystej [6].

Przedstawione w tej pracy wyniki wskazują, że proces dojrzewania ziarna jęczmienia jarego w 1974 r. w okolicach Olsztyna przebiegał niezupełnie normalnie. Zjawisko to można wytłumaczyć dużym natężeniem opadów deszczu i niską temperaturą podczas dojrzewania zbóż.

OGÓLNA ZAWARTOŚĆ KWASÓW NUKLEINOWYCH W ZARODKACH ZIARNA JĘCZMIENIA JAREGO

Biologiczna rola kwasów nukleinowych w dojrzewających nasionach nie jest jeszcze wyjaśniona dostatecznie. Prowadzone liczne badania biochemiczne [1, 4, 6, 11, 12, 19] wykazały, że w miarę dojrzewania ziarna zbóż wzrastał w nim szybko poziom RNA i DNA, w przeliczeniu na 100 ziaren (zawartość bezwzględna), osiągając maksimum w okresie dojrzałości woskowej. Jednakże zawartość względna (w odniesieniu do suchej masy) malała w miarę rozwoju nasion. Kulka [19] stwierdził w całej dynamice przemian NA, podczas rozwoju i dojrzewania ziarna, pewną etapowość odpowiadającą w zarysie trzem fazom formowania ziarniaka [5, 36]. W okresie zasadniczego rozwoju bielma zachodził szybki wzrost ilości omawianych związków. Podczas zasadniczego rozwoju zarodka, obejmującego drugą połowę dojrzałości mlecznej i początek dojrzałości woskowej, bezwzględna zawartość NA w całym ziarnie utrzymywała się na stałym poziomie, zwiększając się szybko pod koniec tego etapu, kiedy to ziarno osiągało najwyższą aktywność fizjologiczną. W okresie zasadniczego gromadzenia materiałów zapasowych zachodziło powolne zmniejszanie się ilości kwasów nukleinowych. W ziarnie w tym czasie ustawały zasadnicze procesy wzrostowe i syntezy białek.

Przytoczone w tabeli 3 wyniki ogólnej zawartości NA w zarodkach ziarna jęczmienia wskazują na wyraźnie większą zawartość omawianych związków w okresie dojrzałości pełnej niż w woskowej. Tendencje te zaznaczyły się zarówno w odniesieniu do 1 g suchej masy jak i w przeliczeniu na 100 zarodków. Zwiększony poziom kwasów nukleinowych w zarodkach pochodzących z ziarna o dojrzałości pełnej był wynikiem ich gromadzenia się do końca okresu dojrzewania ziarna, co prawdopodobnie związane było z biosyntezą RNA w zarodkach, która trwała do końca

Tabela 3

Zmiany zawartości kwasów nukleinowych w zarodkach dojrzewającego ziarna jęczmienia jarego. Wyniki zawartości NA podano w jednostkach ekstynkcji

Dojrza- łość ziarna	Ogólna zawartość NA		Zawartość poszczególnych frakcji NA w przeliczeniu 100 zarodków		
	na 1 g suchej masy	na 100 zarodków	sRNA	DNA-RNA	rRNA + +mRNA
Woskowa	109,74	8,56	2,15	2,10	4,31
Pełna	126,74	11,28	2,27	2,51	5,60

okresu dojrzewania [1, 6, 19]. Kulka, Sobieraj [23] oraz Scerano i Morales [34] wykazali nawet syntezę RNA w zarodkach ziarna spoczynkowego.

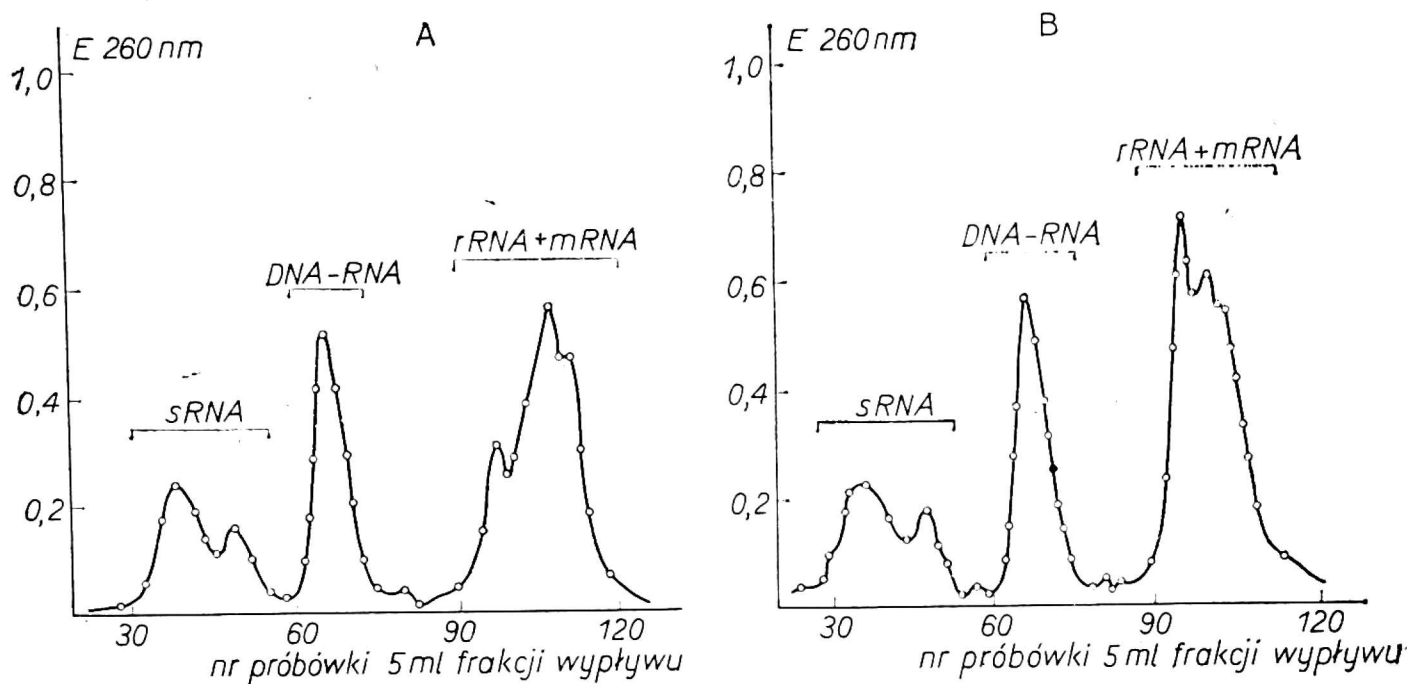
Natomiast w innych badaniach [12, 20] stwierdzono, że w bielmie synteza kwasów rybonukleinowych kończyła się już w fazie dojrzałości woskowej, po czym poziom ich zmniejszał się w miarę dalszego rozwoju ziarna. Obserwowane w bielmie obniżenie ilości RNA może być przyczyną rozpadu niektórych frakcji tego związku do mononukleotydów. Związki te mogą następnie przemieszczać się do zarodka i być źródłem syntezy nowych NA [26, 33].

Podobne regularności dotyczące dynamiki zmian zawartości kwasów rybonukleinowych obserwowano również w dojrzewających nasionach innych roślin, m. in. strączkowych [22, 26-28, 35, 42]. W nasionach tych najwyższe ilości omawianych związków stwierdzono w okresie osiągnięcia tzw. wczesnej dojrzałości fizjologicznej. Następnie, w miarę osiągnięcia pełnej dojrzałości morfologicznej, poziom RNA uległ znacznemu obniżeniu.

ZMIANY FRAKCJI KWASÓW NUKLEINOWYCH W ZARODKACH DOJRZEWAJĄCEGO ZIARNA JĘCZMIENIA JAREGO

W przedstawionych na rysunku 1 profilach chromatograficznych rozdzielonych na kolumnie MAK kwasów nukleinowych zaznaczyły się wyraźnie trzy zasadnicze frakcje: sRNA, DNA-RNA oraz rRNA + mRNA. Frakcja sRNA różnicowała się na dwa szczyty: pierwszy z nich stanowił 4S RNA, a drugi 5S RNA [2, 3, 9, 15, 39]. Kwas 4S RNA jest transportującym kwasem rybonukleinowym [tRNA], zaś 5S RNA — niskopolimerizowanym typem rybosomalnego RNA, dlatego też sumę 4S i 5S RNA oznaczono przez sRNA (formy rozpuszczalne).

Kolejna eluowana frakcja była jednoszczytowa; stanowiła ona mieszaninę DNA i RNA [3, 38, 40]. Przeprowadzone reakcje barwne z oracyną i dwufenyloaminą potwierdziły obecność w omawianym szczycie



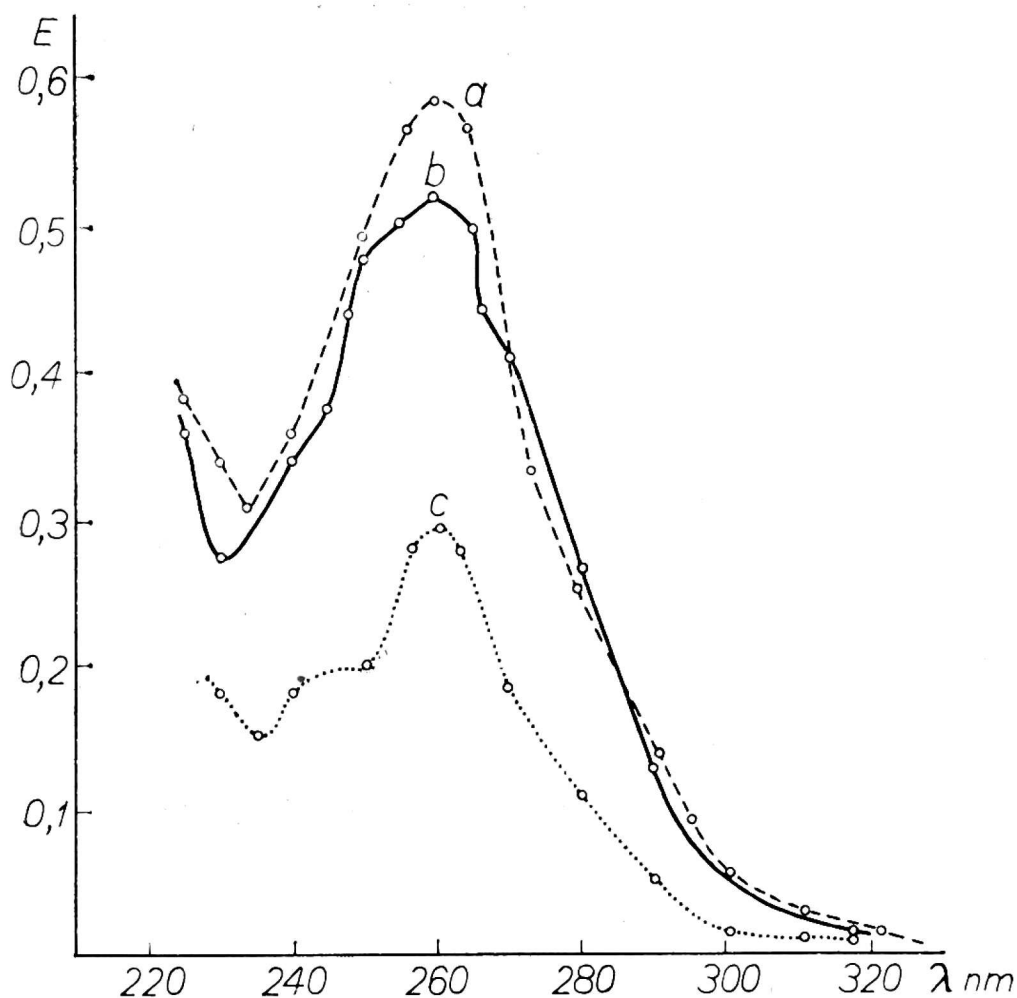
Rys. 1. Profile chromatograficzne, rozdzielonych na kolumnie MAK, kwasów nukleinowych wyizolowanych z zarodków ziarna jęczmienia jarego o dojrzałości woskowej (A) i pełnej (B)

obu rodzajów kwasów nukleinowych. Doświadczalnie wykryto występowanie w roślinach naturalnych kompleksów DNA-RNA. Przypuszcza się, że mogą one spełniać rolę pośredników w przenoszeniu informacji genetycznej z DNA na RNA [43].

Trzecią frakcją zaznaczającą się najbardziej w profilu chromatograficznym była mieszanina rybosomalnych RNA oraz pewna część informacyjnego RNA (mRNA). W obrębie tej frakcji zaznaczyły się szczyty: 18S RNA, 25S RNA oraz nie zawsze wyraźny szczyt mRNA [29, 38]. Dokładniejsze zlokalizowanie szczytu mRNA wymaga stosowania pierwiastków znakowanych. Według danych literaturowych [3, 14, 15, 24, 29], pewna ilość mRNA występuje we frakcji „mocno związanej z kolumną” (TB-RNA), która wymywa się dokładniej 0,5 M NaOH, 1,5 M NH₄OH lub też 1,5 M NaCl.

Podobne rozmieszczenie poszczególnych frakcji RNA otrzymali Vold i Sypherd [40] oraz Walton i Soofi [41], badając na MAK-u kwasy nukleinowe izolowane z zarodków pęczniejącego ziarna pszenicy.

Na rysunku 2 przedstawiono widma absorpcyjne NA tworzących szczyty (sRNA, DNA-RNA, rRNA + mRNA) w profilu chromatograficznym. Są to wyniki widm absorpcyjnych kwasów nukleinowych powstających w okresie dojrzałości pełnej. Wskazują one dość wyraźnie, że najsilniejszą absorpcję obserwowano w paśmie 260 nm. Świadczy to o dobrym oczyszczeniu preparatów kwasów nukleinowych nanoszonych na kolumnę MAK w celu ich rozdzielania.



Rys. 2. Widma absorpcyjne kwasów nukleinowych tworzących szczyty w profilu chromatograficznym

a — rRNA + mRNA, b — DNA — RNA, c — sRNA

Tabela 4

Procentowa zawartość poszczególnych frakcji kwasów nukleinowych w zarodkach dojrzewającego ziarna jęczmienia jarego

Dojrzałość ziarna	sRNA	DNA-RNA	rRNA+mRNA	Razem
Woskowa	25,11	24,57	50,32	100
Pełna	20,01	22,31	57,68	100

Wyniki zamieszczone w tabeli 3 i 4 obrazują dość istotne różnice w zawartości poszczególnych frakcji NA w zależności od stanu dojrzałości ziarna. Śledząc dynamikę zawartości frakcji sRNA, należy podkreślić jej nieznaczny ilościowy wzrost (w przeliczeniu na 100 zarodków) w okresie dojrzałości pełnej. Jednakże procentowy udział tej frakcji przeważał znacznie w okresie dojrzałości woskowej. Większy udział względnej zawartości niskocząsteczkowych RNA w zarodkach w okresie dojrzałości woskowej niż w pełnej wskazuje na bardziej intensywną biosyntezę białek

w tym okresie. Przemawia za tym także fakt intensywnego gromadzenia materiałów zapasowych, a w tym i białek, w trzecim etapie ontogenezy ziarniaka, tj. w okresie dojrzałości woskowej [6, 7]. Warto dodać, że dynamika NA w nasionach wiąże się ściśle z przemianami białkowymi. Między biosyntezą białek a nagromadzeniem RNA istnieje ścisły związek [11, 20, 26]. Tempo biosyntezy białek jest jednak o wiele wyższe od biosyntezy RNA. Stosunek RNA-białko w miarę rozwoju nasion maleje, natomiast stosunek DNA-białko wzrasta, osiągając wartość maksymalną w połowie okresu dojrzewania [21]. Zdaniem Grzesiuka [6], zmiany wartości stosunku RNA do białka świadczą o tym, że w poszczególnych fazach dojrzewania nasion zmienia się w pewnym stopniu rola fizjologiczna RNA. Być może zmniejszenie stosunku RNA-białko wynika także ze wzmożonej aktywności rybonukleaz.

Poziom frakcji DNA-RNA był wyższy w okresie dojrzałości woskowej. Jednakże jej procentowy udział kształtował się odwrotnie. Stwierdzono, że kompleks ten prawdopodobnie uczestniczy w inicjacji syntezy RNA podczas wykształcania i rozwoju nowych komórek [13].

Największy ilościowy i procentowy udział w badanym materiale zajmowała frakcja rRNA + mRNA. Wzrost zawartości omawianej grupy RNA w zarodkach pochodzących z ziarna o dojrzałości pełnej wskazuje na jej syntezę w końcowych etapach dojrzewania. Okazuje się więc, że w miarę rozwoju ziarniaków zwiększała się w nich ta ilość RNA, która przypuszczalnie była związana z tworzeniem się nowych struktur cytoplazmatycznych [10, 18, 21].

W dojrzewających nasionach zmienia się też forma RNA. Według Kornariewa [17], w zależności od stopnia rozwoju komórki RNA może tworzyć z jej organellami mniej lub bardziej trwałe połączenia lub też występować w stanie wolnym. Tkanki embrionalne zawierają głównie labilne formy RNA, zaś tkanki zróżnicowane — trwałe postacie tego związku.

Rozwój całego ziarna w znacznym stopniu zależy od metabolizmu NA. Porównanie danych liczbowych tabeli 2 i 3 wskazuje na istotną korelację między poziomem kwasów nukleinowych w zarodkach a przyrostem ich suchej masy. Biorąc pod uwagę wzrost poziomu frakcji rRNA + mRNA w pełnej dojrzałości, wydaje się, że przyrost suchej masy ziarniaków w końcowych etapach dojrzewania w znacznym stopniu był uzależniony od dynamiki tej frakcji. W oparciu o to spostrzeżenie można przypuszczać, że zmiany ilościowe w obrębie frakcji rRNA były ściśle związane z kształtowaniem się suchej masy dojrzewającego ziarna.

Informacje zawarte w tabeli 3 skłaniają z kolei do twierdzenia, że zwiększenie zawartości RNA w zarodkach ziarna zbóż w końcowym okresie dojrzewania było przede wszystkim wynikiem syntezy frakcji rRNA + mRNA a częściowo także — sRNA. Do podobnego wniosku doszli Mil-

Ierd i Whitfeld [28] badając NA z rozwijających się liścieni bobiku. Badacze ci, stosując znakowaną urydynę i adenozyne, stwierdzili, że wzrost ilości RNA był wynikiem wzmożonej syntezy 25S RNA, 18S RNA oraz tRNA.

Reasumując należy stwierdzić, że proporcje ilościowe między frakcjami sRNA, DNA-RNA oraz rRNA + mRNA zmieniały się podczas dojrzwania jęczmienia. Świadczy to o istnieniu zmian w ich wzajemnych stosunkach i o fizjologicznym znaczeniu różnych frakcji RNA w końcowych etapach dojrzwania ziarna. Z badań Grzesiuka [5], Rejowskiego [32] i Sójki [36] wiadomo, że dojrzwające ziarno zbóż posiada zmienną aktywność fizjologiczną. Największą witalność wykazują ziarniaki w okresie dojrzałości woskowej. W tym okresie ziarno posiada największą energię i zdolność kiełkowania (tab. 1) związaną z jego wysoką aktywnością metaboliczną. Zaobserwowany w niniejszych badaniach niższy poziom NA w zarodkach dojrzałości woskowej niż w pełnej pozwala sądzić, że żywotność ziarna nie wiązała się bezpośrednio z ogólną ilością kwasów nukleinowych. Nie można się więc zgodzić z poglądem badaczy włoskich [34], według których poziom DNA w zarodkach decyduje o żywotności nasion. Wydaje się, że przyczyną zmiennej żywotności ziarna mogły być raczej zmiany we wzajemnych stosunkach poszczególnych frakcji RNA. To ostatnie przypuszczenie potwierdza fakt, że w zarodkach ziarna nie w pełni dojrzałego udział frakcji sRNA był wyższy niż w okresie dojrzałości pełnej. Natomiast w okresie pełnej dojrzałości znacznie wzrastał udział frakcji rRNA, która prawdopodobnie wiązała się ze strukturami cytoplazmatycznymi [10]. Na podstawie powyższych uwag można wnioskować, że dynamika frakcji sRNA znajduje odzwierciedlenie w wartości biologicznej i żywotności dojrzwających nasion.

Wyniki analiz NA w zarodkach dojrzwającego ziarna jęczmienia nie tłumaczą więc w pełni, różnej (zazwyczaj zwiększonej w okresie dojrzałości woskowej) ich żywotności. Dokładniejsze wyjaśnienie omawianego zagadnienia wymaga dalszych badań. Z kwasami nukleinowymi wiąże się ściśle metabolizm związków białkowych i być może wnikliwe prześledzenie ich metabolizmu pozwoliłoby bliżej poznać nieznaną dotąd mechanizm zmiennej aktywności fizjologicznej dojrzwających nasion.

WNIOSKI

1. Najwyższą żywotność mają ziarniaki jęczmienia jarego w okresie dojrzałości woskowej. Ich sucha masa zwiększa się dość równomiernie do końca okresu dojrzwania ziarna.

2. Najwyższą ogólną zawartość kwasów nukleinowych mają zarodki w pełnej dojrzałości morfologicznej. Intensywnemu wzrostowi suchej ma-

sy endospermu i zarodka towarzyszy największy wzrost ilości kwasów nukleinowych w zarodkach.

3. Względna zawartość frakcji sRNA jest wyższa w ziarniakach o dojrzałości woskowej niż w ziarniakach o dojrzałości pełnej. Jednakże jej ilość bezwzględna (w 100 zarodkach) jest nieco wyższa w okresie pełnej dojrzałości. Również zawartość frakcji rRNA + mRNA jest znacznie większa w okresie dojrzałości pełnej niż w woskowej.

Wzrost ogólnej ilości RNA w zarodkach w końcowych etapach dojrzewania ziarniaków jest wynikiem przede wszystkim intensywnej syntezy frakcji rRNA. Zwiększanie się zawartości kwasów nukleinowych (rRNA) wiąże się ściśle z szybkim wzrostem suchej masy dojrzewających nasion.

4. Ilościowe proporcje różnych frakcji NA (sRNA, DNA-RNA, rRNA + mRNA) zmieniają się podczas dojrzewania ziarna. Prawdopodobnie wskazuje to na odmienną rolę fizjologiczną kwasów nukleinowych w procesie rozwoju i dojrzewania nasion. Mechanizm zmiennej aktywności fizjologicznej nasion nie zależy jednak od ogólnej zawartości RNA, lecz wiąże się raczej ze zmianami we wzajemnych stosunkach frakcji sRNA i rRNA + mRNA.

5. Przedstawione w pracy tej wyniki badań nie tłumaczą w pełni przyczyn zwiększonej witalności ziarna zbóż w okresie dojrzałości woskowej. Dokładniejsze poznanie tych zagadnień wymaga dalszych badań, szczególnie białek, których synteza i aktywność zależą od NA.

LITERATURA

1. Chang Chong W.: Incorporation of phosphorus-32 into nucleic acids during embryonic development of barley. *Nature*, 1963, 198, s. 1167-1169.
2. Fiedina A. B., Kułajewa O. N.: Usłowia wydieleniya rybonukleinowej kisloty iz prorostkow i listiew rastienij. *Fizjol. Rast.*, 1966, 13, s. 368-373.
3. Filek W.: Fractions of nucleic acids in seedlings and leaves of winter wheat in the vegetative and generative development phases. *Acta Soc. Bot. Pol.*, 1973, 42, s. 209-222.
4. Fot Ł. W.: Nukleinowyje kisloty w razwiwajuszczysja siemienach ozimoi pszenicy. *Tr. Charkow. Sielchoz. Inst.*, 1971, 158, s. 7-9.
5. Grzesiuk S.: Studia nad fizjologią dojrzewającego ziarna zbóż. *Zesz. nauk. WSR Olsztyn*, 1961, 11 (104), s. 3-127.
6. Grzesiuk S.: *Fizjologia nasion*. PWRiL, Warszawa 1967.
7. Grzesiuk S.: Fizjologiczne i biochemiczne przemiany w dojrzewających nasionach. *Zesz. probl. Post. Nauk rol.*, 1971, z. 113, s. 29-67.
8. Grzesiuk S.: Aktualne zagadnienia dojrzewania i spoczynku późniejszego ziarna zbóż. *Zesz. probl. Post. Nauk rol.*, 1972, z. 125, s. 401-415.
9. Hock B.: Nature of rapidly labelled RNA fraction described in higher plants. *Plant Physiol.*, 1967, 42, s. 1149-1152.

10. Howard T., Weeb D. P., Wareing P. F.: Seed dormancy in *Acer* maturation in relation to dormancy in *Acer pseudoplatanus* L. *J. Exp. Bot.*, 1973, 82, s. 958-967.
11. Ingle I., Beitz D., Hageman R. H.: Changes in composition during development and maturation of maize seeds. *Plant Physiol.*, 1965, 40, s. 835-839.
12. Jennings A. C., Morton R. K.: Changes in nucleic acids and other phosphorus-containing compounds of developing wheat grain. *Austral. J. Biol. Sci.*, 1963, 16, s. 332-341.
13. Julien R., Guitton Y.: Rapidly labelled DNA-RNA complex in radish seedlings. *Nucleic acids and proteins in higher plants*. vol. 13, s. 33-41 (symp. Biol. Hung.).
14. Kabanow W. W., Cenow E. I., Stragonow B. P.: Wljanije NaCl na sodierżanije nukleinowych kisłot w listiach gorocha. *Fizjol. Rast.*, 1973, 20, s. 466-472.
15. Klimowickaja Z. M., Łobanowa Z. I., Prokopiwniuk L. M.: Sootnoszenie nizkomolekularnoj i wysokomolekularnoj RNK u rastienij pri mangancewom chłorozie. *Fizjol. i biochim. kult. rastienij*, 1973, 5, s. 131-135.
16. Kirby K. S.: A new method for the isolation of ribonucleic acids from mammalian tissue. *Biochem. J.* 1956, 64, s. 405-408.
17. Konariew W. G.: Nukleinowyje kisłoty, ich sostojanije i rol w obmienie wieszczestw u rastienij. *Biologia nukleinowo obmiena u rastienij*. Moskwa 1964.
18. Konopska L.: Niektóre zagadnienia biochemii rozwoju nasion. *Wiad. bot.*, 1970, 14, s. 181-289.
19. Kulka K.: Kwasy nukleinowe w rozwijającym się ziarnie żyta. Cz. I. Ogólna zawartość kwasów nukleinowych w formującym się ziarniaku. *Acta Soc. Bot. Pol.*, 1966, 35, s. 17-24.
20. Kulka K.: 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.*, 1966, 35, s. 59-68.
21. Kulka K., Grzesiuk S.: Kwasy nukleinowe i ich fizjologiczne funkcje w roślinach. *Post. Nauk rol.*, 1965, 4, s. 19-51.
22. Kulka K., Sójka E.: Zmiany ilościowe KN w dojrzewających nasionach i strączkach bobiku (*Vicia faba* L. ssp. *minor*). *Rocz. Nauk rol.*, 1966, ser. A, t. 92, z. 2, s. 251-263.
23. Kulka K., Sobieraj B.: Cukry i związki fosforowe w procesie posprzętnego dojrzewania ziarna jęczmienia jarego (Browarny PZHR). *Acta Soc. Bot. Pol.*, 1969, 38, s. 93-102.
24. Kulajewa O. N., Fiedina A. B., Seliwankina S. Ju., Kursanow A. Ł.: Osobiennosti wozrastnych izmienienij metabolizmu RNK w srezannyh listiach i listiach na rastienij. *Fizjol. Rast.*, 1967, 14, s. 972-981.
25. Mandell I. D., Hershey A. D.: A fractionating column analysis of nucleic acids. *Anal. Biochem.*, 1960, 1, s. 66-77.
26. Matoszka I. W., Bułko A. P.: Nukleinowsia kisłoty pospiawainczaga i porastoinczata nasiennaja łubinaŕ. *Izw. AN BSSR*, 1971, Ser. bioł., 4, s. 31-35.
27. Mierzwińska T.: Zmiany biochemiczne w dojrzewających nasionach bobiku w czasie osiągnięcia pełnej dojrzałości fizjologicznej. *Zesz. probl. Post. Nauk rol.*, 1971, z. 113, s. 97-110.
28. Millerd A., Whitfeld P. R.: Deoxyribonucleic acids and ribonucleic acids synthesis during the cell expansion phase of cotyledon development in *Vicia faba* L. *Plant Physiol.*, 1973, 51, s. 1005-1010.
29. Porokło W. I., Żemkowa L. N., Maszkińska L. G., Szarowa N. E.: Frakcjonowanie

- nukleinowych kwasów jęczmienia na rozlicznych jonoobmiennych kołunkach. *Fizjol. Rast.*, 1974, 21, s. 418-426.
30. Ralph R. K., Bellamy A. R.: Extraction and purification of undegraded ribonucleic acids. *Biochim. Biophys. Acta*, 1964, 87, s. 9-16.
 31. Rejowski A.: Fizjologia i biochemia dojrzewającego ziarna pszenicy. Cz. I. Morfologia rozwoju oraz fizjologiczne właściwości dojrzewającego ziarna. *Rocz. Nauk rol.*, 1961, ser. A, t. 85, z. 2, s. 293-305.
 32. Rejowski A.: Fizjologia i biochemia dojrzewającego ziarna pszenicy. Cz. II. Cukrowce rozwijającego się ziarna pszenicy. *Rocz. Nauk rol.*, 1961, ser. A, t. 85, z. 3, s. 37-110.
 33. Siemienienko G. I.: Obmien nukleinowych kwasów i sintez białka pri prorstaniu i sozrewanii siemian. *Ucz. Zapiski Charkowsk. Un-ta*, t. 137. *Trudy N-iss. Inst. Biol. i Biol. Fak.*, 1963, 35, s. 85-97.
 34. Scerano M., Morales C.: Nucleic acid content and viability of wheat seeds. *Rev. Espan. Fizjol.*, 1967, 34, s. 227-235.
 35. Smith D. L.: Nucleic acid, protein and starch synthesis in developing cotyledons of *Pisum arvense* L. *Ann. Bot.*, 1973, 37, 152, s. 795-804.
 36. Sójka E.: Badania nad fizjologią i biochemią rozwijającego się ziarna żyta (*Secale cereale* L.). Cz. I. Morfologia rozwoju oraz fizjologiczne właściwości dojrzewającego ziarna. *Hod. Roś. Aklim. Nas.*, 1961, 5, s. 689-703.
 37. Sójka E.: Badania nad fizjologią i biochemią rozwijającego się ziarna żyta (*Secale cereale* L.). Cz. II. Związki azotowe w dojrzewającym ziarnie. *Hod. Roś. Aklim. Nas.*, 1961, 5, s. 705-720.
 38. Te May Ching: Metabolism of germinating seeds. *Seed Biology* Edited by T. T. Kozłowski, Acad. Press New York, London 1972, vol. II, s. 103-219.
 39. Vedel F., Guitton Y: Mise an evidence d'un RNA ribosomal de faible poids molecularie dans les jeunes germinations de *Raphanus sativus* et de *Phaseolus vulgaris*. *Physiol. Plantarum*, 1968, 21, s. 242-250.
 40. Vold B. S., Syphered P. S.: Changes in soluble RNA and ribonuclease activity during germination of wheat. *Plant Physiol.*, 1968, 43, s. 1221-1226.
 41. Walton D. C., Soofi G. S.: Germination of *phaseolus vulgaris*. III. The role nucleic acid and protein synthesis in the initiation of axis elongation. *Plant and Cell Physiol.*, 1969, 10, s. 307-315.
 42. Wheeler L. C. T., Boulton D.: Nucleic acids of developing seeds of *Vicia faba* L. *J. Exp. Bot.*, 1967, 18, s. 229-240.
 43. Zawadzka-Rejman E.: Metabolizm KN w kiełkującym ziarnie pszenicy. Praca doktorska. Zakład Biochemii Roślin Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN, Warszawa, 1972.

Рышард Гурецки, Станислав Гжесюк

НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ В КОНЕЧНЫХ ФАЗАХ СОЗРЕВАНИЯ ЗЕРНА ЯРОВОГО ЯЧМЕНЯ

Резюме

Целью работы было представить, до какой степени жизненность созревающего зерна зерновых культур зависит от динамики изменений фракции нуклеиновых кислот. Исследования были проведены на зерновках ячменя, про-

исходящих из восковой и полной зрелости. Изменения фракции нуклеиновых кислот исследовались при помощи метода колонной хроматографии МАК. Доказано, что наибольшей жизненностью обладают зерновки ячменя восковой зрелости. Количество нуклеиновых кислот в зародышах увеличивалось до конца созревания. Этот рост был результатом интенсивного синтеза фракции rRNA, а частично также и sRNA. Увеличение содержимого этих типов RNA (sRNA, rRNA) было связано с быстрым ростом сухой массы созревающих зерновок. Количественные пропорции разных фракций RNA изменялись во время созревания зерна. По всей вероятности это указывает на различную физиологическую роль отдельных фракций нуклеиновых кислот в процессе развития и созревания семян.

Кажется, что механизм переменной физиологической активности зерна не зависит от общего содержимого RNA, а вернее связан с изменениями взаимоотношений фракций sRNA и rRNA + mRNA.

Ryszard Górecki, Stanisław Grzesiuk

NUCLEIC ACIDS AT FINAL RIPENING STAGES OF SUMMER BARLEY GRAIN

Summary

The aim of the work was to find, to what degree the vitality of ripening grain of cereals would depend on the dynamics of changes of particular fractions of nucleic acids. The investigations were carried out on barley grains taken at the wax ripeness or full ripeness stage. The changes of fractions of nucleic acids were determined by the column chromatography method MAK. It has been proved that with the strongest vitality distinguish themselves barley grains at the wax ripeness stage. The amount of nucleic acids in germs increased up to the ripening and partly also the sRNA fraction. The increase of the content of the above RNA and partly also the sRNA fraction. The increase of the content of the above RNA types (sRNA, rRNA) was connected with a rapid growth of dry matter in the ripening grains. Quantitative proportions of different RNA fractions changed during ripening of the grain. It proves, probably, a different physiological role of particular fractions of nucleic acids in the process of development and ripening of grains.

It seems that the mechanism of changeable physiological activity would not depend on the total RNA content, but would be connected rather with the changes in mutual relationships of sRNA and rRNA + mRNA fractions.