

BIOSYNTENZA I ZMIANY ZAWARTOŚCI KWASÓW NUKLEINOWYCH ORAZ AKTYWNOŚĆ ENZYMÓW W OSIACH ZARODKOWYCH STARZEJĄCYCH SIĘ NASION GROCHU

Krzysztof Kulka, Tomasz Konopka

Instytut Biologii Roślin AR-T, Olsztyn

WSTĘP

Proces starzenia nasion objawia się zwykle zamieraniem tkanek merystematycznych oraz powstawaniem ośrodków nekrotycznych. Zmniejsza się wówczas energia, a następnie zdolność kiełkowania. Kiełki oraz siewki wyrosłe ze starych nasion są często nienormalne [2, 6, 7, 11, 14], co jest wynikiem uszkodzenia jąder komórkowych oraz związanych z nim aberracji chromosomowych [15, 20]. Następstwem tych defektów może być obniżenie plonu nasion [1].

Nateżenie zmian destrukcyjnych powodujących starzenie się nasion podczas ich przechowywania uwarunkowane jest w znacznej mierze właściwościami genetycznymi gatunku oraz czynnikami zewnętrznymi środowiska (wilgotność powietrza, temperatura).

Dla nasion większości gatunków mała wilgotność jest jednym z głównych czynników decydujących o długości ich życia. W nasionach długo przechowywanych w warunkach wilgotności krytycznej zachodzą procesy dysymilacyjne i oksydacyjne, prowadzące prawdopodobnie do nagromadzenia się w nich szkodliwych substancji: toksyn, inhibitorów, wolnych rodników i in. [1, 2, 9]. Przypuszcza się, że wytworzenie tych szkodliwych substancji w okresie starzenia nasion deformuje komórki zarodka pod względem strukturalnym i funkcjonalnym. Wyrazem tych procesów destrukcyjnych może być unieczynnienie wielu enzymów oraz zmiana właściwości genetycznych DNA w zamierających nasionach [9, 15, 16]. W rezultacie w nasionach niezdolnych do kiełkowania zostaje nieodwracalnie uszkodzony układ biosyntezy białka oraz zdegenerowany aparat genetyczny komórek.

Do chwili obecnej dość dobrze poznano biologię starzenia się nasion, natomiast biochemiczny mechanizm tego zjawiska został zbadany w nie-

wielkim stopniu. W piśmiennictwie naukowym niewiele jest danych na temat roli kwasów nukleinowych w omawianym procesie [7-12, 18]. Związki te, jak wiadomo odgrywają zasadniczą rolę w kierowaniu całym metabolizmem komórki.

Przytoczone uwagi stanowiły założenie niniejszej pracy, której celem było zbadanie dynamiki i biosyntezy kwasów nukleinowych (RNA i DNA) oraz aktywności nukleaz w osiach zarodkowych starzejących się nasion grochu. Spodziewano się, że otrzymane dane przyczynią się w pewnej mierze do wyjaśnienia związku pomiędzy aktywnością genetyczną kwasów nukleinowych a procesem starzenia się nasion.

MATERIAŁ I METODYKA

Do badań użyto nasion grochu (odmiany Delisa II) pochodzących z Zakładu IHAR — Biologii i Przechowalnictwa Nasion we Wrocławiu. W momencie zbioru tj. w 1966 r. wilgotność nasion wynosiła 15⁰%, a zdolność kiełkowania — 97,5⁰%. Nasiona te przechowywano w normalnych warunkach laboratoryjnych. Następnie badane nasiona umieszczono kolejno w dwóch higrostatach: 1) w celu podsuszenia nasion; wilgotność względna atmosfery higrostatu — 45-50⁰%, 2) w celu nawilgocenia nasion; wilgotność względna atmosfery higrostatu — 65-70⁰%.

Wilgotność nasion (2.XII 1967 r.) wynosiła w pierwszym przypadku 10,2⁰%, a w drugim — 13,9⁰%. Następnie nasiona umieszczono w szklanych słojach o szczelnym zamknięciu. Tak więc uzyskano dwie partie nasion grochu o różnej wilgotności i zdolności kiełkowania.

Po zamknięciu butelek badano zdolność kiełkowania nasion w poszczególnych latach przechowywania.

Nasiona badano w momencie znacznego obniżenia się żywotności partii II, tj. w 1970 r. Wówczas zdolność kiełkowania nasion partii I wynosiła 95,2⁰%, a wilgotność — 10,3⁰%; analogicznie dla partii II — 36,5⁰% i 13,9⁰%. Badanie procesów starzenia przeprowadzono na kiełkujących nasionach grochu o różnej żywotności. Następnie z nasion izolowano ręcznie osie zarodkowe, które dzielono z kolei na epikotyle i korzonki. W materiale tym badano ilość i biosyntezę NA (kwasów nukleinowych) oraz aktywność nukleaz.

WARUNKI KIEŁKOWANIA NASION

Nasiona przed kiełkowaniem przemywano 75⁰% etanolem przez 20 sekund, a następnie wodą redestylowaną. Tak przygotowane nasiona układano po 100 sztuk na czterowarstwowym rulonie z bibuły filtracyjnej,

uprzednio nasyconej wodnym roztworem $\text{Na}_2\text{H}^{32}\text{PO}_4$, o radioaktywności właściwej $0,3 \mu\text{Ci/ml}$. Kiełkowanie nasion trwające 16 godzin przeprowadzono w temperaturze $+5^\circ\text{C}$ w ciemności, celem zbadania stanu wyjściowego NA i nukleaz. Natomiast kiełkowanie trwające 72 i 120 godzin przeprowadzono w temperaturze 21°C , także w ciemności. Po zakończeniu kiełkowania nasiona przemywano wodą redestylowaną (dezaktywacja). Próby do badań z obu partii nasion pobierano po 16, 72, 120 godzinach kiełkowania.

ANALIZA KWASÓW NUKLEINOWYCH

Do analizy kwasów nukleinowych użyto wodnego roztworu ortofosforanu sodowego ^{32}P z dodatkiem nośnika (pH 7) w ilości 1 mg P/ml roztworu, o czystości radiochemicznej 98⁰/₀ i stężeniu promieniotwórczym wynoszącym $5,2 \mu\text{Ci/ml}$.

Radioaktywność próbek badano przy pomocy licznika scyntylicyjnego (typ studzienkowy) SE-2 i przelicznika typu PEL-5 A (produkcji krajowej).

Świeże osie zarodkowe wypreparowane z nasienia rozcierano w móżdżerze z 8⁰/₀ kwasem trójchlorooctowym (TCA) w temperaturze $0-4^\circ\text{C}$. Po odwirowaniu (4500 g przez 15') odrzucono supernatant z fosforem kwasorozpuszczalnym; przemywając następnie osad dwukrotnie chłodnym 1⁰/₀ TCA, dwukrotnie wodą destylowaną i etanolem.

W dalszej ekstrakcji usuwano fosfolipidy, traktując osad mieszaniną eteru i etanolu (1 : 2), którą utrzymywano w stanie wrzenia przez 30 minut, po czym przemywano eterem i suszono przy temperaturze 40°C . Następnie osad inkubowano z 0,5 n KOH przez 18 godzin przy temperaturze 37°C . Po odwirowaniu, w supernatancie rozdzielono RNA od DNA według metody Schmidta i Thannhausera w modyfikacji Wollgiehna i Partiera [23]. Z hydrolizatu DNA wytrącano za pomocą 60⁰/₀ HClO_4 w temperaturze 0°C . Supernatant spalano z 10 N H_2SO_4 i oznaczano fosfor RNA metodą Fiske-Subbarowa. W tym samym supernatancie oznaczano stopień inkorporacji ^{32}P do RNA przy pomocy scyntyлятора (Plato — 675 V). W tym celu nanoszono supernatanty kolejnych prób w ilości 0,5 ml na miseczki aluminiowe. Celem równomiernego rozkładu radioaktywności tych prób, suszono je przez 2 godziny w odległości około 20 cm od promienników ciepłych. Po określeniu tła licznika scyntylicyjnego na kolejny dzień mierzono radioaktywność danej próby.

Z osadu DNA ekstrahowano 0,5 N HClO_4 (80°C przez 30'). W kolejnym supernatancie po spaleniu oznaczono fosfor DNA metodą Fiske-Subbarowa a jego radioaktywność analogicznie jak w przypadku RNA.

OZNACZANIE AKTYWNOŚCI NUKLEAZ

Do oznaczenia aktywności rybonukleazy używano wysokopolimeryzowanego RNA śledziowego, uprzednio oczyszczonego z form niskopolimerycznych.

Homogenat zarodków przygotowywano w temperaturze pokojowej na 1 M buforze octanowym o pH 6,2. Aktywność rybonukleazy oznaczano metodą Tuve i Anfinsena [19], stosując jednak inne proporcje związków wchodzących w reakcje. Do 2 ml 0,2% roztworu RNA (śledziowego), w 0,1 M buforze octanowym o pH 6,2 dodawano 0,5 ml badanego roztworu zawierającego enzym. Próbkę inkubowano przez 1 godzinę w temperaturze 37°C. Reakcję przerywano przez dodanie 1 ml 0,75% octanu uranilu w 25% HClO₄. Próbki pozostawiono przez 1 godzinę w zamrażalniku (-10°C), a następnie odwirowywano od białka i nierozłożonego RNA przy 6000 g w czasie 10 minut. Z supernatantu pobierano próbki po 0,2 ml; do każdej próbki dodawano po 4 ml H₂O i mierzono ekstynkcję przy 260 nm w warstwie 1-centymetrowej. Wielkość ekstynkcji odczytywano wobec próby kontrolnej (zerowy czas inkubacji mieszaniny).

Jako jednostkę aktywności rybonukleazy przyjęto tę ilość enzymu, która w podanych wyżej warunkach doświadczenia i przy podanych rozcieńczeniach powodowała przyrost ekstynkcji w supernatancie:

$$\Delta E_{260\text{nm}}^{1\text{cm}} = 0,01$$

Aktywność dezoksyrybonukleazy oznaczano metodą analogiczną jak aktywność RN-azy, używając jako substratu wysokopolimeryzowanego DNA z drożdży.

OMÓWIENIE WYNIKÓW

SUCHA MASA OSI ZARODKOWYCH NASION GROCHU O RÓŻNEJ ŻYWOTNOŚCI PODCZAS KIEŁKOWANIA

Nasiona grochu zawierające więcej wody (13,9%), przechowywane w hermetycznie zamkniętych słojach, w miarę upływu czasu traciły żywotność. Obniżanie się żywotności starzejących się nasion przejawiało się w spadku zdolności kiełkowania z 96,7 do 36,5% (tab. 1). Natomiast nasiona grochu zawierające 10,3% wody podczas ich trzyletniego przechowywania w hermetycznie zamkniętych słojach nie traciły żywotności.

Sucha masa osi zarodkowych wskazuje, że w okresie 5-dniowego kiełkowania nasion grochu o normalnej żywotności zwiększa się wyraźnie ciężar 100 korzonków i epikotyli (tab. 2). Przytoczone wyniki znajdują potwierdzenie w badaniach procesu kiełkowania nasion grochu [3].

Tabela 1

Zdolność kiełkowania nasion grochu podczas przechowywania

Data badania	Zdolność kiełkowania w %	
	partia I	partia II
12.VII 1968	96,2	96,7
18.XI 1968	98,4	92,7
17.IV 1969	97,7	76,7
1.VII 1970	95,2	36,5

partia I — nasiona o normalnej żywotności, partia II — nasiona o obniżonej żywotności

Natomiast w nasionach o obniżonej żywotności, lecz jeszcze kiełkujących, obserwuje się nieznaczny przyrost suchej masy dopiero po 5 dniach kiełkowania (tab. 2). Wyrosłe z takich nasion kiełki miały krótsze łodyżki nadliścieniowe i korzonki.

W nasionach grochu o całkowitym zaniku żywotności stwierdzono znaczny ubytek suchej masy osi zarodkowych podczas kilkudniowego pęcznienia. Wyniki te świadczą o zatrzymaniu biosyntezy związków konstytucjonalnych w zarodkach grochu.

KWASY NUKLEINOWE

Zmniejszenie żywotności nasion grochu do 36,5% nie spowodowało większych zmian w ilości DNA i RNA w osiach zarodkowych w porównaniu z materiałem w pełni żywotnym (po 16 godzinach pęcznienia, tab 3). Również inni autorzy nie stwierdzili istotnych zmian ilości NA w starzejących się komórkach zwierzęcych [22] oraz w tkankach nasion tracących żywotność w czasie przechowywania [6-8]. Nie można się zatem zgodzić z poglądem niektórych badaczy, że żywotność nasion uzależniona jest od poziomu RNA i DNA w ich osiach zarodkowych [16, 17].

W celu porównania aktywności genetycznej nasion o różnej żywotności prześlędzono dynamikę i biosyntezę RNA i DNA w okresie kiełkowania (tab. 4 i 5). Podczas kiełkowania nasion grochu w pełni żywotnych poziom DNA i RNA systematycznie wzrastał (tab. 4 i 5), co zgodne jest z danymi literatury [3, 8, 21]. Zwiększenie zawartości DNA i RNA w rosnącym kiełku było w dużym stopniu wynikiem syntezy NA *de novo*, na co wskazywało natężenie inkorporacji ^{32}P w wymienione związki (tab. 4 i 5). W miarę kiełkowania nasion grochu obserwowano wzrost zarówno aktywności właściwej jak i całkowitej obu rodzajów NA, co najwyraźniej zaznaczyło się w korzeniach osi zarodkowych.

Tabela 2

Sucha i świeża masa osi zarodkowych oraz liścieni nasion grochu o różnej żywotności po 16, 72 i 120 godzinach kiełkowania

	16 godz.		72 godz.		120 godz.	
	świeża	sucha	świeża	sucha	świeża	sucha
	masa	masa	masa	masa	masa	masa
	w g na 100 części					
	Nasiona o obniżonej żywotności (36,5%)					
Epikotyle z nasion kiełkujących	0,288	0,084	0,380	0,065	0,841	0,097
Korzonki z nasion kiełkujących	0,332	0,110	0,685	0,102	0,991	0,128
Całe osie zarodkowe w nasionach kiełkujących	0,620	0,194	1,065	0,167	1,832	0,225
Epikotyle z nasion niekiełkujących			0,178	0,062	0,184	0,057
Korzonki z nasion niekiełkujących			0,219	0,082	0,213	0,073
Całe osie zarodkowe z nasion niekiełkujących			0,397	0,144	0,397	0,130
Liścienie z nasion kiełkujących	42,700	14,720	52,100	17,440	53,840	15,450
Liścienie z nasion niekiełkujących			51,200	12,810	43,700	12,040
	Nasiona o normalnej żywotności (95,2%)					
Epikotyle	0,282	0,078	1,993	0,240	5,900	0,386
Korzonki	0,386	0,126	3,620	0,314	6,630	0,488
Całe osie zarodkowe	0,668	0,204	5,613	0,554	12,530	0,874
Liścienie	41,160	14,900	46,630	14,447	40,880	17,770

Tabela 3
Zawartość RNA i DNA w osiach zarodkowych po 16 godzinach pęcznienia nasion grochu o różnej żywotności. Poziom NA podano w $\mu\text{g P}/100$ części

	RNA			DNA		
	$\mu\text{g P}/1 \text{ g}$ świeżej masy	$\mu\text{g P}/1 \text{ g}$ suchej masy	$\mu\text{g P}/100$ części	$\mu\text{g P}/1 \text{ g}$ świeżej masy	$\mu\text{g P}/1 \text{ g}$ suchej masy	$\mu\text{g P}/100$ części
	Nasiona o obniżonej żywotności (36,5%)					
Epikotyle	1458	5000	420	403	1380	116
Korzonki	1747	5272	580	410	1236	136
Całe osie zarodkowe	1602	5136	1000	406	1308	252
	Nasiona o normalnej żywotności (95,2%)					
Epikotyle	2057	7436	580	468	1692	132
Korzonki	1451	5159	560	311	952	120
Całe osie zarodkowe	1754	6297	1140	389	1322	252

Tabela 4

Biosynteza RNA i DNA w osiach zarodkowych nasion grochu o różnej żywotności po 72 godzinach pęcznienia

	RNA				DNA					
	$\mu\text{g P}/1\text{g}$ świeżej masy	$\mu\text{g P}/1\text{g}$ suchej masy	$\mu\text{g P}/100$ części	imp/100 części	imp/1 mg P	$\mu\text{g P}/1\text{g}$ świeżej masy	$\mu\text{g P}/1\text{g}$ suchej masy	$\mu\text{g P}/100$ części	imp/100 części	imp/1 mg P
Nasiona o obniżonej żywotności (36,5%)										
Epikotyle z nasion kielkujących	1833	8692	565	355	600	421	2461	160	56	330
Korzonki z nasion kielkujących	1022	6832	700	400	540	204	1372	140	80	570
Cale osie zarodkowe z nasion kielkujących	1452	7762	1265	755	570	312	1916	300	136	450
Epikotyle z nasion niekielkujących	2415	6935	430	220	480	534	1532	95	20	180
Korzonki z nasion niekielkujących	2100	5609	460	100	200	597	1585	130	30	225
Cale osie zarodkowe z nasion niekielkujących	2257	6272	890	320	340	565	1558	225	50	202
Nasiona o normalnej żywotności (95,2%)										
Epikotyle	388	3125	750	3500	4600	129	1041	250	990	4100
Korzonki	185	2133	670	4300	6500	41	477	150	1500	10000
Cale osie zarodkowe	286	2629	1420	7800	5500	85	759	400	2490	7050

Tabela 5

Biosynteza RNA i DNA w osiach zarodkowych po 120 godzinach pęcznienia nasion grochu o różnej żywotności

	RNA						DNA						
	$\mu\text{g P}/1\text{ g}$ świeżej masy	$\mu\text{g P}/1\text{ g}$ suchej masy	$\mu\text{g P}/100$ części	imp/100 części	imp/1 mg P	$\mu\text{g P}/1\text{ g}$ świeżej masy	$\mu\text{g P}/1\text{ g}$ suchej masy	$\mu\text{g P}/100$ części	imp/100 części	imp 1/mg P	$\mu\text{g P}/100$ części	imp/100 części	imp 1/mg P
Nasiona o obniżonej żywotności (36,5%)													
Epikotyle z nasion kielkujących	7372	6391	620	1240	2000	265	2319	225	190	1010	225	190	1010
Korzonki z nasion kielkujących	686	5312	680	2260	4350	222	1718	220	430	2420	220	430	2420
Całe osie zarodkowe z nasion kielkujących	4029	5851	1300	3440	3175	243	2018	445	620	1715	445	620	1715
Epikotyle z nasion niekielkujących	13587	4385	250	190	750	408	1315	75	41	550	75	41	550
Korzonki z nasion niekielkujących	1643	4794	350	150	430	371	1082	79	54	670	79	54	670
Całe osie zarodkowe z nasion niekielkujących	7615	4589	600	340	590	389	1198	154	95	610	154	95	610
Nasiona o normalnej żywotności (95,2%)													
Epikotyle	197	3005	1160	3800	3500	48	739	285	1350	4750	285	1350	4750
Korzonki	151	2049	1000	8300	8400	38	522	255	2500	10000	255	2500	10000
Całe osie zarodkowe	174	2527	2160	12100	5950	43	630	540	3850	7375	540	3850	7375

Tabela 6

Aktywność enzymów nukleolitycznych w osiach zarodkowych nasion grochu o różnej żywotności po 16 godzinach pęcznienia. Wyniki podano w jednostkach rybonukleazowych

	RN-aza		DN-aza	
	na 1 g suchej masy	na 100 części	na 1 g suchej masy	na 100 części
Nasiona o obniżonej żywotności (36,5)%				
Epikotyle z nasion kiełkujących i niekiełkujących	35,7	3,0	4,8	0,4
Korzonki z nasion kiełkujących i niekiełkujących	71,0	7,8	34,5	3,8
Całe osie zarodkowe z nasion kiełkujących i niekiełkujących	53,3	10,8	19,6	4,2
Liścienie z nasion kiełkujących	13,4	150,0	2,4	35,0
Nasiona o normalnej żywotności (95,2%)				
Epikotyle	77,0	6,0	0,0	0,0
Korzonki	28,6	3,6	0,0	0,0
Całe osie zarodkowe	52,8	9,6	0,0	0,0
Liścienie	11,4	17,0	0,0	0,0

Tabela 7

Aktywność enzymów nukleolitycznych w osiach zarodkowych nasion grochu o różnej żywotności po 72 godzinach pęcznienia. Wyniki podano w jednostkach rybonukleazowych

	RN-aza		DN-aza	
	na 1 g suchej masy	na 100 części	na 1 g suchej masy	na 100 części
Nasiona o obniżonej żywotności (36,5%)				
Epikotyle z nasion kiełkujących	341,0	22,2	67,7	4,4
Korzonki z nasion kiełkujących	200,0	20,4	49,0	5,0
Całe osie zarodkowe z nasion kiełkujących	270,5	42,6	58,3	9,4
Epikotyle z nasion niekiełkujących	143,0	8,9	24,2	1,5
Korzonki z nasion niekiełkujących	41,0	3,4	30,2	2,1
Całe osie zarodkowe z nasion niekiełkujących	92,0	12,3	27,2	3,6
Nasiona o normalnej żywotności (95,2%)				
Epikotyle	500,0	120,0	46,6	11,2
Korzonki	455,0	140,0	42,3	13,3
Całe osie zarodkowe	477,0	260,0	44,4	24,5

W pęczniejących kilkudniowych nasionach grochu, które całkowicie utraciły żywotność (nie kiełkujące), zauważono postępującą degradację zarówno DNA jak i RNA (tab. 3-5).

Depolimeryzacja kwasów nukleinowych zachodzi prawdopodobnie pod wpływem enzymów nukleolitycznych (RNA-azy i DN-azy), przejawiających swą aktywność nawet w starych nasionach grochu (tab. 6-8).

Tabela 8

Aktywność enzymów nukleolitycznych w osiach zarodkowych nasion grochu po 120 godzinach pęcznienia. Wyniki podano w jednostkach rybonukleazowych

	RN-aza		DN-aza	
	na 1 g suchej masy	na 100 części	na 1 g suchej masy	na 100 części
Nasiona o obniżonej żywotności (36,5%)				
Epikotyle z nasion kiełkujących	434,1	42,1	86,5	8,4
Korzonki z nasion kiełkujących	292,9	37,5	51,5	6,6
Całe osie zarodkowe z nasion kiełkujących	363,5	79,6	69,0	15,0
Epikotyle z nasion niekiełkujących	29,8	1,7	35,0	2,0
Korzonki z nasion niekiełkujących	120,5	8,8	56,0	3,7
Całe osie zarodkowe z nasion niekiełkujących	75,1	10,5	45,5	5,7
Nasiona o normalnej żywotności (95,2%)				
Epikotyle	414,0	160,0	67,0	26,0
Korzonki	256,0	125,0	51,0	25,0
Całe osie zarodkowe	335,0	285,0	59,0	51,0

Odmiennie kształtuje się dynamika i natężenie biosyntezy NA w starzejących się nasionach grochu podczas pęcznienia i kiełkowania. Roberts i Osborn [16] stwierdzili, że utrata żywotności ziarna wiąże się z postępującą degradacją DNA w zarodkach do niskomolekularnych fragmentów (oligonukleotydów) oraz ze stopniowym rozpadem frakcji rybosomalnego RNA o stałej sedimentacji 18 S.

Badania nasze wskazują na całkowite niemal zahamowanie replikacji DNA oraz biosyntezy RNA w martwych nasionach (tab. 3). Spostrzeżenia te potwierdziły również badania z radioaktywnym fosforem (tab. 4 i 5). Włączanie ^{32}P w DNA osi zarodkowych (epikotyli i korzonków) było bardzo niskie (imp/100 osi zarodkowych).

W osiach zarodkowych kiełkujących nasion grochu pochodzącego z partii nasion o obniżonej żywotności (36,5%) tempo biosyntezy obu ty-

pów NA było wolniejsze niż w nasionach o pełnej żywotności wynoszącej 95,2% (tab. 3-5).

Niełatwo jest odpowiedzieć na pytanie, co powoduje zatrzymanie podwojenia się DNA (faza S), a tym samym zahamowanie podziałów mitotycznych komórek merystematycznych w starych nasionach grochu podczas pęcznienia i kiełkowania.

Zanik replikacji DNA w starych nasionach o ustępującej żywotności mógł być prawdopodobnie spowodowany jedną z podanych przyczyn: 1) modyfikacją strukturalną cząsteczki DNA [15] oraz denaturacją białka histonowego, co uniemożliwia rozplątanie się podwójnej helisy DNA [9], 2) inaktywacją polimerazy DNA (nukleotydylotransferazy), 3) wynikiem rozkładania się stymulatorów wzrostu, a szczególnie cytokinin [5], 3) zaburzeniami w syntezie specyficznych białek, która winna wyprzedzać replikację DNA [10], 5) uszkodzeniami własności genetycznych DNA przez wolne rodniki ($\cdot\text{OOH}$; $\cdot\text{OH}$) występujące jako produkty autooksydacji lipidów [9, 12].

Natomiast zahamowanie syntezy RNA w starych nasionach grochu mogło być spowodowane utratą aktywności polimerazy RNA lub zablokowaniem aktywności aparatu genetycznego przez toksyny procesu autooksydacji fosfolipidów [12].

Brak syntezy RNA w starych pęczniejących nasionach uniemożliwia formowanie się nowych rybosomów jako jednego z ważnych elementów biosyntezy białka.

AKTYWNOŚĆ ENZYMÓW NUKLEOLITYCZNYCH

RYBONUKLEAZY ROŚLINNE — NUKLEOTYDO-2-TRANSFERAZY RYBONUKLEINIANOWE. EC.2.7.7.17

Rola wewnątrzcząsteczkowych nukleaz nie została dotychczas dokładnie wyjaśniona. Uważa się, że poza degradacją RNA, RN-azy biorą udział w przebudowie oraz dojrzewaniu różnych form RNA. Nie wyklucza się również udziału tych enzymów w regulacji syntezy białka. Według Borisowej i Niezgoworowej [4] enzymy rybonukleolityczne są niezbędnym czynnikiem inicjującym złożony metabolizm pęczniejących nasion (trigger mechanizm).

Podczas pęcznienia (przez 16 godzin w temp. $+5^{\circ}\text{C}$ — stan wyjściowy) nasion grochu o różnej żywotności nie stwierdzono ujemnych zmian (wywołanych starzeniem) w czynności katalitycznej rybonukleaz w osiach zarodkowych i liścieniach.

Wyraźne zróżnicowanie aktywności enzymów depolimeryzujących RNA wystąpiło dopiero podczas kiełkowania nasion o różnej żywotności (tab. 7 i 8). W miarę kiełkowania w pełni żywotnych nasion aktywność

RN-azy w osiach zarodkowych gwałtownie wzrastała. Natomiast podczas 5-dniowego pęcznienia nie obserwowano w epikotylach i korzonkach martwych nasion grochu zwiększenia się aktywności badanych enzymów. Blokowanie aktywności RN-azy wykryto również w starzejących się nasionach soi [13] oraz w ziarnie żyta i jęczmienia [11].

Przedstawione wyżej wyniki wykazują, że stare nasiona na skutek zaburzeń w funkcjonowaniu ich aparatu genetycznego nie są zdolne do biosyntezy rybonukleaz. Nasza wiedza o funkcji i mechanizmie działania dezoksyrybonukleazy roślinnej (oligonukleotydo-hydrolazy dezoksyrybonukleinianu, EC.3.1.4.5) jest znacznie uboższa niż o rybonukleazie.

W badanym materiale aktywność DN-azy była przeważnie wielokrotnie mniejsza niż RN-azy (tab. 6-8). Powodem tego była prawdopodobnie niższa zawartość DNA w tkankach oraz jego większa trwałość metaboliczna. Rozpatrując wyniki analiz zawarte w tabeli 6 warto zauważyć, że epikotyle i korzonki nasion grochu przejawiające pełną żywotność nie wykazały aktywności dezoksyrybonukleazowej podczas 16-godzinnego pęcznienia w temperaturze 2°C. Natomiast martwe osie zarodkowe oraz liścienie wykazywały znaczną aktywność DN-azy.

Można więc przyjąć, że postępująca degradacja DNA, zachodząca w części osiowej zarodka podczas wielodniowego pęcznienia nasion o zerowej zdolności kiełkowania (tab. 4-6) była wynikiem działania dezoksyrybonukleazy. Jednak w miarę pęcznienia starych nasion aktywność DN-azy nie zwiększała się, co świadczy o zablokowaniu jej biosyntezy. Odmienne kształtowała się biosynteza tego enzymu w nasionach w pełni żywotnych, w których w toku kiełkowania wyraźnie wzrastała czynność katalityczna DN-azy (tab. 7 i 8).

W konkluzji należy stwierdzić, iż w nasionach starych początkowo wysoka aktywność DN-azy powodująca degradację DNA w miarę upływu czasu kiełkowania ma tendencje spadkowe (świadczy to o zablokowaniu jej biosyntezy); w przeciwieństwie do nasion o normalnej żywotności, w których aktywność DN-azy wzrastała podczas kiełkowania.

LITERATURA

1. Abdalla F. H., Roberts E. H.: The effects of seed storage conditions on the growth and yield barley, broad beans and peas. *Ann. Bot.*, 1969, 33, s. 143-153.
2. Barton L. V.: *Seed preservation and longevity*. London 1961.
3. Beevers L., Guernsey F. S.: Changes in some nitrogenous components during the germination of pea seeds. *Plant. Physiol.*, 1966, 41, s. 1455-1458.
4. Borisowa N. N.: Niezgoworowa L. A.: K woprosu o puskowom mechanizmie prorastajuszczich siemian. IV. Rastworimyje bielki i ribonukleaznaja aktiwnost. *Fizjol. Rast.*, 1969, 16, s. 452-462.

5. Ching T. M.: Biochemical aspects of seed vigor. *Seed Sc. Technol.*, 1973, 1, s. 73-89.
6. Grzesiuk St.: *Fizjologia nasion*. PWRiL, Warszawa 1967.
7. Grzesiuk St., Kulka K.: Nucleic acids and nucleases in cereal seeds of various age. *Bull. Acad. Pol. Sc., Ser. Sc. Biol.*, 1971, 19, s. 363-366.
8. Grzesiuk St., Łuczyńska J.: Nucleic acid and proteins in artificially ageing soya bean seeds. *Bull. Acad. Pol. Sc., Ser. Sc. Biol.*, 1972, 20, s. 891-896.
9. Harrington J. F.: Biochemical basis of seed longevity. *Seed Sc. Technol.*, 1973, 1, s. 453-463.
10. Hecker M. V.: Untersuchung über die Protein, RNA-und DNA-synthese in gealterten Samen. *Biol. Rund.*, 1964, 4, s. 277-280.
11. Kulka K.: Biochemiczne aspekty starzenia się ziarna owsa i jęczmienia. *Zesz. nauk. WSR Olsztyn*, 1971, 6, s. 2-89.
12. Kulka K.: Fizjologiczne i biochemiczne mechanizmy starzenia się nasion. *Biul. IHAR*, 1973, 5-6, s. 37-44.
13. Łuczyńska J.: Activity of some enzymes from soya bean seeds ageing at various air humidities. *Bull. Acad. Pol. Sc., Ser. Sc. Biol.*, 1973, 21, s. 155-159.
14. Mierzwińska T.: Influence of gibberellic acid on hydrolytic enzymes activity in germinating different-aged lupin seeds. *Acta Soc. Bot. Pol.*, 1973, 42, s. 509-520.
15. Roberts E. H.: Loss of seed viability: Chromosomal and genetic aspects. *Seed Sc. Technol.*, 1973, 1, s. 515-529.
16. Roberts B. E., Osborne D. J.: Protein synthesis and viability in rye grains. *Seed ecology*. London 1973.
17. Scerano M., Morales C.: Nucleic acid content and viability of wheat seed. *Rev. Espan. Fizjol.*, 1967, 34, s. 227-235.
18. Szczotka Z.: Changes in the metabolism of nucleic acid in embryo axes of Northern red oak and English oak acorns during storage under controlled conditions. *Arboretum Kórnickie*, 1973, 18, s. 171-181.
19. Tuve T. W., Anfinsen C. B.: Preparation and properties of spinach ribonuclease. *J. Biol. Chem.*, 1960, 235, s. 3437-3441.
20. Villiers T. A.: Ageing and longevity of seeds in field conditions. *Seed ecology*. London 1973.
21. Walton D. C., Soofi G. S.: Germination of *Phaseolus vulg.* The role of nucleic acid and protein synthesis in the initiation of axis elongation. *Plant and Cell Physiol.*, 1969, 10, 307-315.
22. Wilenczik M. M.: Puskowyje molekularnyje miechanizmy starienija. *Usp. Sowr. Biol.*, 1970, 69, s. 389-397.
23. Wollgiehn R., Parthier B.: Ein Beitrag zur quantitativen Bestimmung von Ribonukleinsäure und Protein in Blätter. *Flora*, 1964, 154, s. 325-348.

Кшиштоф Кулька, Томаш Конопка

БИОСИНТЕЗ И ИЗМЕНЕНИЯ В СОДЕРЖИМОМ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ А ТАКЖЕ АКТИВНОСТЬ ЭНЗИМОВ В ЗАРОДЫШЕВЫХ ОСЯХ СТАРЕЮЩИХСЯ СЕМЯН ГОРОХА

Резюме

В работе представлены результаты исследований, касающиеся поведения и биосинтеза *de novo* нуклеиновых кислот, а также активности нуклеолитических энзимов в зародышевых осях двух партий семян гороха с разной жизненностью.

Обе партии семян с дифференцированным содержанием воды хранились более трех лет в стеклянных, плотно закрытых банках, в комнатной температуре. После трехлетнего периода хранения вохожесть семян с большим содержанием воды (13,9%) снизилась до 36,5%, а в то же время жизнность второй партии семян (с влажностью 10,3%) практически не изменилась по отношению к первичному состоянию (95,2%).

Исследования NA и нуклеаз проведены на зародышевых осях набухших и прорастающих семян в период 16, 72 и 120 часов. Констатировано, что:

1. Старение клеток зародышевых осей семян гороха не связано с изменением количества DNA и RNA. Изменения уровня DNA и RNA выступают в зародышах только во время разбухания и прорастания семян разной жизнности.

2. В зародышевых осях (надсемядольное колено и корешок) старение связано с задержкой репликации DNA и биосинтеза RNA (данные из инкорпорации ^{32}P). Потеря способности к биосинтезу DNA и RNA вероятно является одной из главных причин отмирания жизнности семян гороха. Приведенные данные подтверждают в известной степени гипотезу инволюционной репрессии генетического аппарата стареющих клеток.

3. Показана значительная активность DN-зы и RN-зы в надсемядольных коленах и корешках семян гороха, лишенных способности прорастания. Предполагается, что эти нуклеазы вызывают в старых, разбухающих семенах деполимеризацию DNA и RNA.

Krzysztof Kulka, Tomasz Konopka

BIOSYNTHESIS AND CHANGES OF NUCLEIC ACIDS AND ACTIVITY OF ENZYMES IN GERMINAL AXES OF AGEING PEA SEEDS

Summary

The results of investigations on the behaviour and the *de novo* biosynthesis of nucleic acids of nucleolytic enzymes in germinal axes of two batches of pea seeds with different vitality are presented in the work.

Both batches of seeds with different moisture content have been stored for over 3 years in tightly closed glass jars, at the room temperature. After the 3-year storage period the germination ability of seeds with higher moisture content decreased to 36.5%, while the vitality of another batch of seeds (with the moisture content of 10.3%) did not change practically in relation to an initial state (95.2%).

The investigations of NA and nucleases were carried out in germinal axes of swollen and germinating seeds during 16, 72 and 120 hours. It has been found as follows:

1. Ageing of cells of the germinal axes in pea seeds during storage is not connected with the change of DNA and RNA amounts. The DNA and RNA changes occur in germs only during swelling and germination of seeds with different vitality.

2. In germinal axes (epicotyl and rootlet) the ageing is connected with a halt of the DNA replication and the RNA biosynthesis (data from the ^{32}P incorporation).

The loss of the DNA and RNA biosynthesis ability is probably one of the main causes of vanishing of the vitality of pea seeds. The data quoted confirm to a certain extent the hypothesis of an involutive repression of the genetic apparatus of ageing cells.

3. A considerable activity of DN-ase and RN-ase in epicotyl and rootlets deprived of the germination ability was found. It can be presumed that the above nucleases would cause in old, swelling seeds a depolymerization of DNA and RNA.