

PORÓWNANIE ZAWARTOŚCI CAŁKOWITEGO KWASU
RYBONUKLEINOWEGO W DWÓCH ODMIANACH TYTONIU*Maria Kamińska-Żyła*

Pracownia Wirusologii Zakładu Fizjologii Roślin PAN

WSTĘP

Z metodycznego punktu widzenia ekstrakcja i oznaczanie zawartości całkowitego kwasu rybonukleinowego w roślinach było przedmiotem wielu publikacji. Przegląd ich przedstawili Holdgate i Goodwin [6]. Uczenni ci opierając się o dotychczasowe osiągnięcia w tej dziedzinie opracowali zmodyfikowaną metodę określania zawartości roślinnego kwasu rybonukleinowego, wymagającą jednak długiego czasu i bardzo pracochłonną. Połączenie metod Holdgate'a, Goodwina oraz Smillie [14] z pewną nieznaczną modyfikacją opisaną przez Fräsera [2] daje natomiast dobre rezultaty i skraca czas trwania analizy.

Celem niniejszej pracy było stwierdzenie czy istnieją jakieś różnice w zawartości całkowitego kwasu rybonukleinowego między dwoma odmianami *Nicotiana tabacum*: Ambalema Bergerac i Ambalema Gembloux oraz między roślinami porażonymi wirusem X ziemniaka, a nie porażonymi tym wirusem (kontrolnymi) w obrębie każdej z tych dwóch odmian.

Odmiany tytoniu Ambalema Bergerac i Ambalema Gembloux są interesujące ze względu na ich odmienną reakcję na zakażenie wirusem X ziemniaka [10] oraz na różną zawartość nikotyny, co jest przedmiotem tych badań. Ponadto stwierdzono, że alkaloid nikotyna podawany z zewnątrz działa hamująco na własności infekcyjne soku wyciśniętego z liści tytoniu zakażonych wirusem X, jak i oczyszczonego wirusa [7]. Ponieważ wymienione odmiany tytoniu mają różną zawartość nikotyny, co może mieć powiązanie z podatnością na zakażenie wirusem, badanie zawartości ogólnego RNA w roślinach reprezentujących te odmiany wydaje się celowe dlatego, że ten związek chemiczny odgrywa bezspornie dużą rolę w metabolizmie roślin i może rzucić światło na przemiany biochemiczne związane z odpornością i syntezą wirusową.

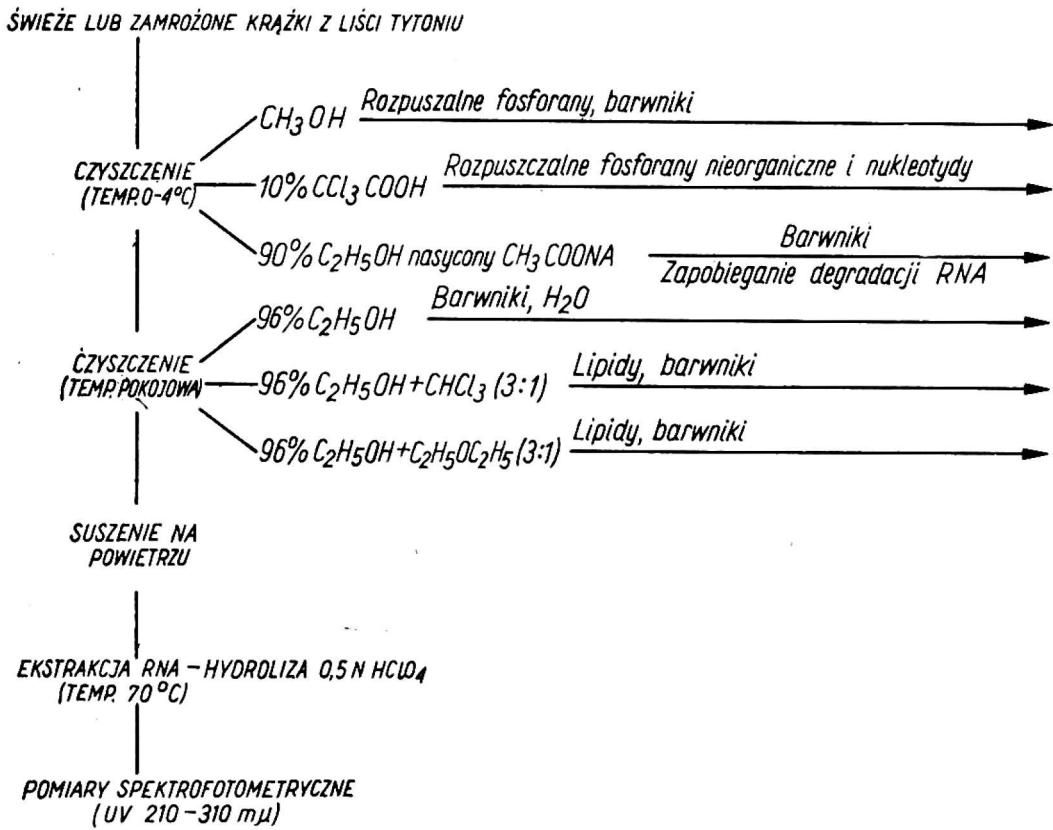
MATERIAŁ I METODY

Przedmiotem doświadczeń były odmiany tytoniu (*Nicotiana tabacum*) Ambalema Bergerac i Ambalema Gembloux, będące w stadium rozwojowym 10 do 12 liści. Ambalema Gembloux pochodzi z Holandii (1951 r.). Odkryta wcześniej w Kolumbii przez Nolla w 1929 r., odznacza się pewną odpornością na wirus mozaiki tytoniu, mniejszą jednak niż Ambalema Bergerac. Ta ostatnia odmiana odkryta również w Kolumbii przez Nolla i Roque [5] w 1933 r., została dokładnie przebadana przez Nolla w latach 1935-1939 [11, 12]. Odporność jej na wirus TMV jest uwarunkowana genetycznie. W wypadku zakażenia Ambalema Gembloux wirusem X ziemniaka, na liściach występują bardzo dobrze widoczne zmiany chlorotyczne, dużo wyraźniejsze niż na liściach Ambalema Bergerac.

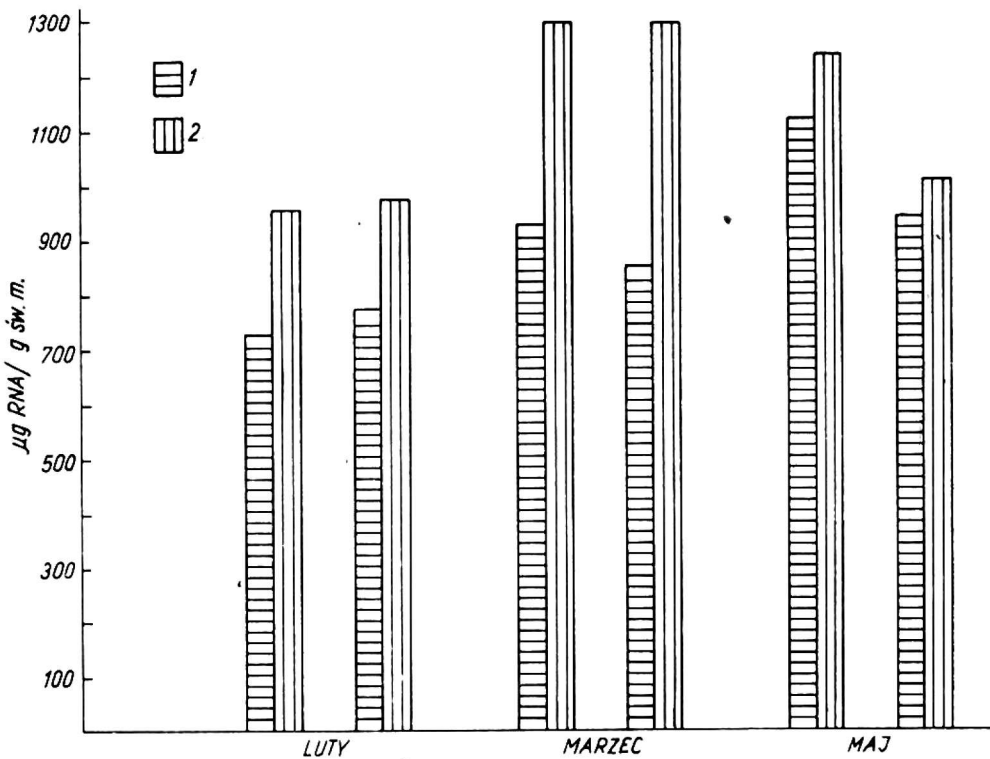
Zbiór liści do analiz następował w okresie od lutego do maja 1972 r., każdorazowo w 8 dniu od momentu zakażenia wirusem X ziemniaka (szcep nekrotyczny z ziemniaków odmiany Bintie). Po upływie ośmiu dni od infekcji wpływ patogena na metabolizm rośliny był już wyraźny, a zatem powinny być widoczne różnice w syntezie RNA w roślinach zakażonych i kontrolnych. W każdym doświadczeniu do analiz przeznaczono 5 zdrowych roślin (kontrolnych), oraz analogiczną liczbę roślin zakażonych wirusem X z obydwu badanych odmian. Ze wszystkich roślin odcinano po 7 liści, pozostawiając tylko 4 dolne oraz najmniejsze wierzchołkowe. Z każdego odciętego liścia wycinano 5 krążków i rozkładano je do oddzielnych szalek. W rezultacie, w każdej szalce znajdowało się 35 krążków (7 liści \times 5 roślin). Uzyskiwano więc 5 analogicznych próbek reprezentujących 7 kolejnych liści na pięciu roślinach wybranych losowo z dużej grupy będącej kombinacją doświadczalną. Materiał analityczny zbierany w ten sposób zapewnia otrzymanie wiarygodnych średnich. Wszystkie próbki po dokładnym zważeniu zamrażano w temperaturze -18°C . Całkowity kwas rybonukleinowy oznaczano metodą Frasera wg schematu przedstawionego na rysunku 1.

WYNIKI

Wyniki są średnimi reprezentatywnymi z populacji roślin w poszczególnych doświadczeniach. Z przeprowadzonych analiz wynika, że istnieją wyraźne różnice w zawartości całkowitego RNA w liściach zdrowych, nie zakażonych wirusem X u Ambalema Bergerac, w porównaniu z Ambalema Gembloux, na korzyść tej pierwszej odmiany (rys. 2). We wszystkich bowiem seriach doświadczeń liście niezakażone pochodzące z tytoniu odmiany Ambalema Bergerac odznaczają się wyższą zawartością całkowitego RNA. Ilość kwasu rybonukleinowego jest większa w miesiącach późniejszych (marzec, maj) — o dłuższym dniu, a zatem z przedłużonym okresem naturalnego oświetlenia, niż w lutym. Zależność tę stwierdzono u obu badanych odmian. Kozłowska [8] wykazała podobną



Rys. 1. Schemat oznaczania kwasu rybonukleinowego metodą Frasera

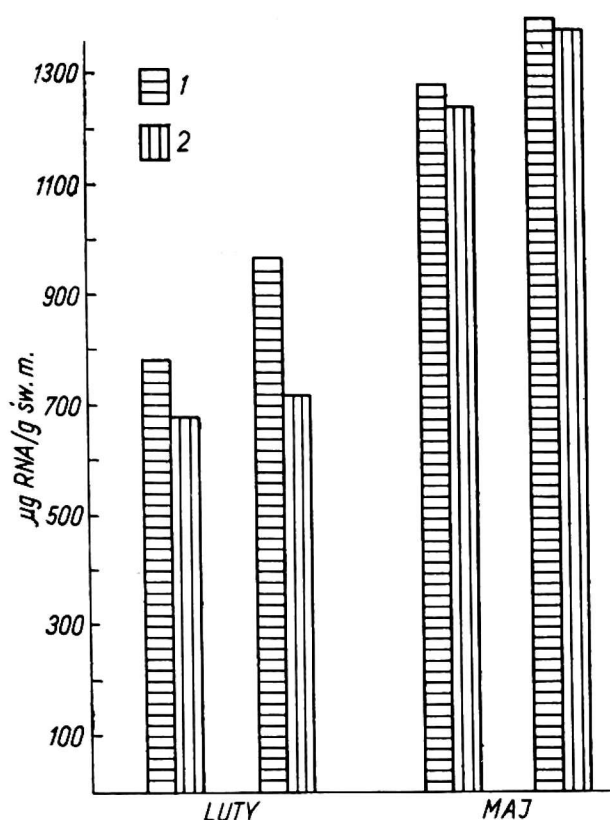


Rys. 2. Różnice w zawartości całkowitego kwasu rybonukleinowego w zdrowych liściach tytoniu
1 — odmiana Ambalema Gembloux, 2 — odmiana Ambalema Bergerac

zależność w ilości całkowitego RNA w odmianach tytoniu Bel i Ambalema przy zastosowaniu innej metody.

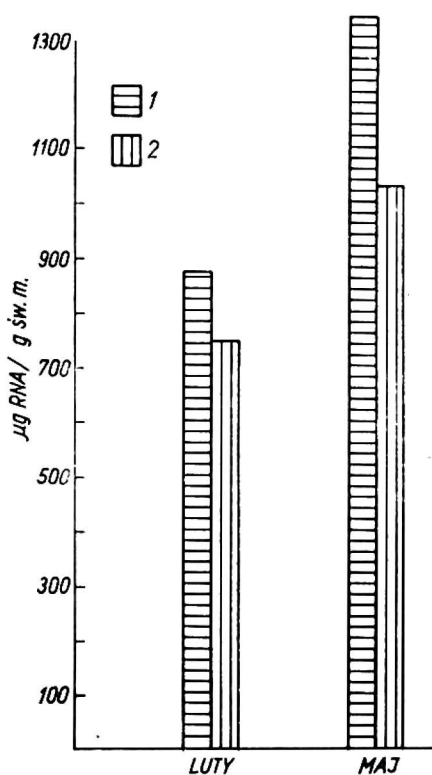
Różnice w poziomie ogólnego RNA w liściach zakażonych wirusem X ziemniaka, pochodzących z prowadzonych równocześnie doświadczeń pomiędzy odmianami tytoniu przedstawiono na rysunku 3. W lutym wystąpiło trudne do wytłumaczenia zjawisko zmniejszania się ilości RNA u Ambalema Bergerac, w stosunku do Ambalema Gembloux w obydwu

seriach doświadczeń. W doświadczeniu przeprowadzonym w maju różnice te natomiast prawie się zacierają.



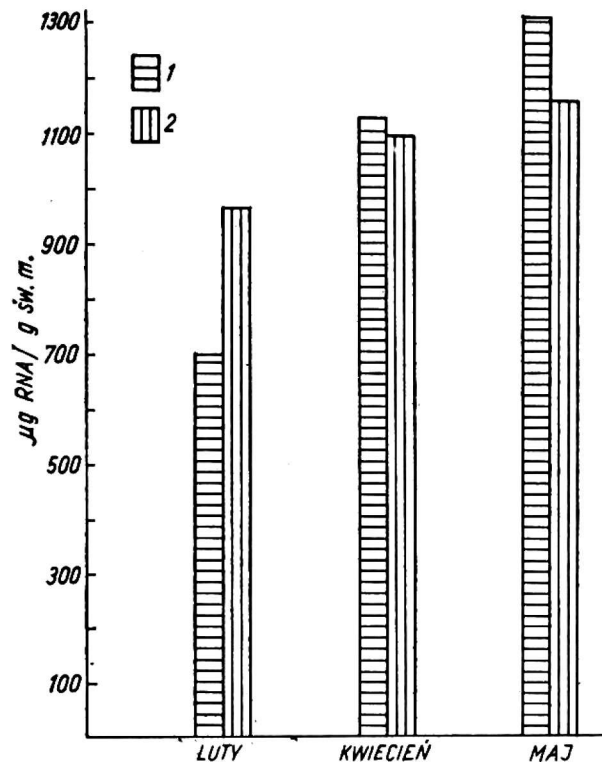
Rys. 3. Różnice w zawartości całkowitego kwasu rybonukleinowego w liściach tytoniu zakażonych wirusem X ziemniaka
1 — odmiana Ambalema Gembloux, 2 — odmiana Ambalema Bergerac

Różnice w zawartości całkowitego RNA w liściach tytoniu Ambalema Gembloux zakażonych wirusem X, w stosunku do kontroli, którą stanowiły liście niezakażone tym wirusem przedstawiono na rysunku 4. Jak



Rys. 4. Różnice w zawartości całkowitego kwasu rybonukleinowego w liściach tytoniu Ambalema Gembloux zakażonych wirusem X ziemniaka w porównaniu z niezakażonymi
1 — liście zakażone, 2 — liście niezakażone

widać, ilość kwasu rybonukleinowego jest większa w liściach zawirusowanych, niż w kontroli. Tą samą zależność, ale w odniesieniu do Ambalema Bergerac obrazuje rysunek 5. W tym wypadku ilość RNA w liściach



Rys. 5. Różnice w zawartości całkowitego kwasu rybonukleinowego w liściach tytoniu Ambalema Bergerac zakażonych wirusem X ziemniaka w porównaniu z niezakażonymi
1 — liście zakażone, 2 — liście niezakażone

zakażonych w lutym jest mniejsza niż w kontroli, natomiast w kwietniu następuje nieznaczny przyrost zawartości kwasu rybonukleinowego, zaś w maju obserwujemy już podobny obraz jak u Ambalema Gembloux, różnice jednak są tutaj nieco mniej wyraźne.

DYSKUSJA

Powołując się na najnowszą pracę Fräsera [3] należy stwierdzić, że wahania w poziomie ogólnego RNA w liściach są zależne od wielu czynników, między innymi od ich wielkości (długości), oraz czasu, który upłynął od momentu inokulacji wirusem. Wcześniejsze badania zmian RNA po infekcji wirusem mozaiki tytoniu wykazywały zazwyczaj lekki wzrost ilości całkowitego kwasu rybonukleinowego w następstwie zakażenia [4, 12]. Późniejsze badania, podobnie jak wspomniana praca Fräsera, były związane z metabolizmem specyficznym różnych typów RNA. Babos [1] nie stwierdził różnicy w poziomie rybosomalnego RNA w roślinach zdrowych i zakażonych wirusem mozaiki tytoniu. Fräser zakażając 5 centymetrowe liście tytoniu odmiany Samsun wykazał, że akumulacja rRNA i tRNA gospodarza w kilka dni po infekcji albo pozostała nienaruszona, mimo odbywającej się syntezy wirusowego TMV RNA, albo nawet początkowo się zwiększała.

W niniejszej pracy wszystkie liście były zbierane w 8 dniu po zakażeniu. Nie badano więc wpływu czasu, który upłynął od chwili zakażenia, na poziom RNA. Trudne do wytłumaczenia zjawisko spadku zawartości kwasu rybonukleinowego w liściach Ambalema Bergerac zakażonych wirusem X, w porównaniu z kontrolą w doświadczeniu z lutego można wytłumaczyć tym, że akurat w 8 dniu po inokulacji następowało zmniejszenie syntezy któregoś z typów RNA i stąd spadek ogólnej ilości tego związku. Można to wytłumaczyć faktem, że tytoń odmiany Ambalema Bergerac odznacza się mniejszą podatnością na zakażenie zarówno wirusem mozaiki tytoniu — Melchers [9], jak i wirusem X ziemniaka i może również wykazać ograniczoną syntezę poszczególnych typów RNA, a także wirusowego PVX-RNA w stosunkowo krótkim czasie po zakażeniu. Stąd też mogą wynikać mniejsze różnice w zawartości całkowitego kwasu rybonukleinowego w zawirusowanych liściach tej odmiany, w odniesieniu do kontroli.

U Ambalema Gembloux odznaczającej się większą podatnością na zakażenie wirusem X podobne różnice uwidaczniają się znacznie wyraźniej. Powiązanie różnic w zawartości RNA u obu badanych odmian w efekcie porażenia wirusem z podatnością ich na zakażenie wirusem X jest interesujące i wymaga dalszych badań poszczególnych frakcji RNA.

Trudno obecnie stwierdzić, czy zawartość całkowitego kwasu rybonukleinowego może się bezpośrednio łączyć z odpornością rośliny na wirusa. Większość sugestii, które spotyka się w literaturze skłania do przypuszczeń, że odporność na porażenie wirusem jest wykładnikiem przemian enzymatycznych zachodzących w tkance roślinnej wskutek zakażenia.

W niniejszej pracy materiał roślinny przeznaczony do analiz zbierano z 7 liści kilku roślin, przy czym najmniejszy liść miał długość około 6 cm. Wyeliminowano więc wpływ wielkości liścia na zawartość kwasu rybonukleinowego tym bardziej, że nie zbierano liści bardzo małych (ok. 2 cm), a więc tych w których jak to stwierdził Fraser, w następstwie porażenia wirusem istnieją duże wahania w poziomie RNA. Wyniki analiz miały na celu zobrazowanie średniej zawartości ogólnego RNA w roślinie, gdyż nie brano pod uwagę wieku liści. Celem pracy było bowiem zorientowanie się jaka jest średnia ilość RNA w dwóch odmianach tytoniu, które mają być przedmiotem dalszych i bardziej szczegółowych badań.

Pragnę wyrazić serdeczne podziękowanie mgr inż. Ewie Dębowskiej za pomoc w prowadzeniu doświadczeń i opracowaniu wyników.

LITERATURA

1. Babos P.: Ribonucleic acid turnover in tobacco leaves infected with tobacco mosaic virus. *Nature*. 1966, t. 211, s. 972-974

2. Fraser R. S. S.: Extraction and assay by polyacrylamide gel electrophoresis of TMV — RNA and plant nucleic acids from TMV infected tobacco leaves (w druku)
3. Fraser R. S. S.: Effects of two strains of tobacco mosaic virus on growth and RNA content of tobacco leaves. *Virology*. 1972, t. 47, s. 261-269
4. Fry P. R., Matthews R. E. F.: Timing of some early events following inoculation with tobacco mosaic virus. *Virology*. 1963, t. 19, s. 461-469
5. Gimpu V.: Recherches cytogenetiques des *Nicotiana* resistants a la mosaïque. Inst. exp. Tabac (SEITA) 1942, Bergerac
6. Holdgate D. P., Goodwin T. W.: Quantitative extraction and estimation of plant nucleic acids. *Phytochemistry*, 1965, z. 4, s. 831-843
7. Kamińska-Żyła M.: Wpływ alkaloidów efedryny i nikotyny na własności infekcyjne soku z liści tytoniu porażonych wirusem X *Solanum virus 1* Smith. Zesz. probl. Post. Nauk rol. 1972, z. 133, s. 13-22
8. Kozłowska A.: Effect of factors stimulating virus multiplication in resistant and susceptible tobacco varieties. Zesz. probl. Post. Nauk rol. 1970, z. 111, 103-110
9. Melchers G.: Max-Planck-Institut, Tübingen (ustna informacja)
10. Mikulska-Macheta A.: Podatność liści tytoniu *Nicotiana tabacum* odmian Ambalema i White Burley na zakażenie ziemniaczanym wirusem X. Zesz. probl. Post. Nauk rol. 1971, z. 115, s. 25-30
11. Nolla J. A. B.: Studies on diseases resistance. A tobacco resistant to ordinary mosaic. *J. agric.* 1935, Univ. Puerto Rico (SEITA)
12. Nolla J. A. B.: Description of tobacco strains resistants to ordinary tobacco mosaic. *Acto Nicotiana*. 1939 (SEITA)
13. Röttger B.: Ribonucleic acids of healthy and tobacco mosaic virus infected tobacco leaves. *Acta Biochem. Biophys.* 1965, t. 95, s. 525-531
14. Smillie R. M., Krotkov G.: The estimation of nucleic acids in some Algae and higher plants. *Can. J. Bot.* 1966, t. 38, s. 972-974

Марья Каменьска-Жила

СРАВНЕНИЕ ПОЛНОГО СОДЕРЖАНИЯ РИБОНУКЛЕИНОВОЙ КИСЛОТЫ В ДВУХ СОРТАХ ТАБАКА

Резюме

В работе сравнивалось полное содержание рибонуклеиновой кислоты в листьях двух сортов табака вида *Nicotiana tabacum* сорт Амбалема Бергерац и Амбалема Гемблукс здоровых и зараженных вирусом X картофеля. Установлен заметный рост количества RNA в здоровых листьях у Амбалемы по отношению к Амбалеме Гемблукс. В случае листьев, зараженных вирусом X, различия в полном содержании рибонуклеиновой кислоты более отчетливо выступают у Амбалемы Гемблукс, чем у Амбалемы Бергерац по отношению к здоровым (контрольным) листьям.

Maria Kamińska-Żyła

COMPARISON OF TOTAL RIBONUCLEIC ACID CONTENT IN TWO TOBACCO VARIETIES

S u m m a r y

Total ribonucleic acid content was compared in the leaves of two tobacco varieties of the species *Nicotiana tabacum* var. Ambalema Bergerac and Ambalema Gembloux when healthy and when infected with potato virus X. A markedly higher increase total RNA content was noted in healthy leaves in the var. Ambalema Bergerac as compared with that in Ambalema Gembloux. In the case of leaves infected with virus X the differences in total RNA content are more pronounced in Ambalema Gembloux than in Ambalema Bergerac as compared with the content in healthy (control) leaves.