

ELEKTROFORETYCZNA ANALIZA BIAŁEK OSI ZARODKOWYCH I LIŚCIENI SOI /GLYCINE MAX/ O PODWYŻSZONYM WIGORZE SPOWODOWANYM ZWIĘKSZENIEM WILGOTNOŚCI NASION

J. S. Knypl, Krystyna M. Janas i Anna Radziwonowska-Jóźwiak

Pracownia Regulatorów Wzrostu Roślin
Uniwersytetu Łódzkiego, Łódź

WSTĘP

Tolerancja nasion soi na stres chłodnowodny [6] silnie wzrasta po podniesieniu ich wyjściowej wilgotności do minimum 20% metodą osmokondycjonowania /OC/ lub "primingu" [3] w 25% roztworze glikolu polietylenowego /PEG/ 6000 [4], bądź ekspozycji w atmosferze nasyconej parą wodną /HRH/ [7]. Oba wymienione zabiegi obniżają wydzielanie elektrolitów, aminokwasów i cukrów przez nasiona pęczniejące w chłodnej wodzie [8], co zinterpretowano jako wyraz odzyskania właściwości selektywnej przepuszczalności przez membrany cytoplazmatyczne już podczas procesu kontrolowanego uwadniania.

Stwierdzono, iż podczas OC nasion sałaty, selera i in. może zachodzić biochemiczna aktywacja w zarodkach [5]. Celem tej pracy było uzyskanie odpowiedzi na pytanie czy wzrost wigoru nasion soi obserwowany po ekspozycji HRH i OC powodowany jest wyłącznie przez zmiany struktury membran cytoplazmatycznych, czy też w czasie kontrolowanego uwadniania zachodzić może w nasionach aktywacja, przejawiająca się bądź to zmianami proporcji poszczególnych frakcji białek rozdzielanych elektroforetycznie, bądź zmianami szybkości włączania aminokwasów do polipeptydów.

MATERIAŁ I METODY

Obiektem analiz były nasiona soi (Glycine max /L./ Merr.) odm. Warszawska, zebrane w 1977 r. i przechowywane w temp. 7-8°C przez 6-9 miesięcy. Do osmokondycjonowania partie po 20 g nasion umieszczano w pojemnikach plastikowych, wyłożonych bibułą filtracyjną

Whatman No 1 /pow. 110 cm^2 /, zwilżoną 20 ml 25% PEG /potencjał osmotyczny ok. $-8,5$ bara/ z dodatkiem 0,2% fungicydu tiuramu i 1200 U ml^{-1} penicyliny G. Nasiona całkowicie zwilżano roztworem PEG przez delikatne przetaczanie, pojemniki przykrywano, uszczelniano parafilmem M i umieszczano w ciemności przy temp. 10°C . Po 4 dniach nasiona szybko płukano wodą, obsuszano bibułą i używano do analiz.

W doświadczeniach nad włączaniem znakowanej leucyny do białek podczas OC roztwór PEG uzupełniano 185 KBq ml^{-1} [$^{14}\text{C-U}$]-L-leucyny /spec. akt. $7,7 \text{ TBq mol}^{-1}$; UVVVR, Praga/ i osmokondycjonowano przez 2 dni w temp. 10°C , a następnie przez 4 dni w temp. 25°C .

Ekspozycję HRH przez 5 dni w 25°C , elektroprzewodnictwo wód nastoinowych w 10°C oraz kiełkowanie w 10°C przy ciągłym oświetleniu przeprowadzano, jak opisano w sąsiedniej pracy [8].

EKSTRAKCJA BIAŁEK I ELEKTROFOREZA

Osie zarodkowe i liście oddzielano ręcznie, proszkowano w płynnym azocie i odlipidowywano w acetonie z dodatkiem NH_4OH [11]. Mączkę suszono pod próżnią i ekstrahowano 2,5% NaCl w 0,02 M buforze fosforanowym, pH 7,4 [10]. Elektroforezę w żelu poliakrylamidowym o stężeniu 5, 7 lub 10% w nieciągłym układzie buforowym przeprowadzano wg Davisa [2] z nieznacznymi modyfikacjami [10]. Prążki białkowe wykrywano przez pozytywowe barwienie błękitem brylantowym Coomassie /CBB/ G-250 w 3,5% PCA [10].

Elektroforezę w obecności siarczanu dodecyłu /SDS-PAGE/ przeprowadzano wg Savoya [11], podgrzewając próbki białkowe w buforze rozpuszczalnikowym [11] z 1% SDS przez 2 h w 37°C [9]. Żele wybarwiano przez noc w 0,25% CBB w mieszaninie 45,4% metanolu i 1,08% kwasu octowego z następnym odbarwianiem w 7,5% kwasie octowym z dodatkiem 5% metanolu [11].

Na żele przy PAGE i SDS-PAGE nakraplano 30-50 μg białka w objętości 50 μl .

SYNTEZA BIAŁKA IN VIVO

Osie zarodkowe i liście nasion osmokondycjonowanych w obecności ^{14}C -leucyny proszkowano w płynnym azocie z kolejnymi odlipidowaniami /2 razy po 20 min/ acetonem z dodatkiem NH_4OH [11], n-heksanem, 90% etanolem oraz mieszaniną etanolu z eterem /3:1, v/v/. Białka ekstrahowano 2,5% NaCl w 0,02 M buforze fosforanowym, pH 7,4 [10], a następnie wytrącano zimnym 10% TCA, przemywano kolejno zimnym 10% TCA, dwukrotnie 1 mM roztworem leucyny w 96% etanolu, etanolem, i rozpuszczano w 0,1 N NaOH. Radioaktywność mierzono w mieszaninie scyntylacyjnej "Tritosol" przy użyciu spektrometru LKB-Wallac.

Izolowane osie zarodkowe z nasion kontrolnych /tj. nie poddawanych zabiegom wstępnego uwodnienia/, osmokondycjonowanych /4 dni/ lub eksponowanych HRH /5 dni/ umieszczano

w 2 ml [$^{14}\text{C-U}$]-L-leucyny /185 KBq ml $^{-1}$ / w 0,5 mM KCl z dodatkiem 0,01% Tween 20 i 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ penicyliny G. Po 3-godz. inkubacji w 30°C z wstrząsaniem osie zarodkowe płu- kano nadmiarem 1 mM leucyny, rozcierano w zimnym 80% etanolu zawierającym 1 mM leucy- ny i odwirowywano w 0-4°C. Osad przemywano kolejno /w temp. 0-4°C/ 80% etanolem z do- datkiem 1 mM leucyny /trzykrotnie/, 96% etanolem /dwukrotnie/, etanolem:eterem /3:1; dwu- krotnie/ i eterem /dwukrotnie/. Białko z osadu rozpuszczano w 1 N NaOH /7 min we wrzą- cej łaźni wodnej/. Do jednej obj. ekstraktu białka dodawano 2 obj. zimnego 4 N TCA i osad powstały po 60 min w 0°C odwirowywano, rozpuszczano w 0,1 N NaOH i używano do ozna- czeń radionukleotydów polipeptydów precypitujących w TCA.

WYNIKI

Zarówno OC jak i ekspozycja HRH obniżyły wydzielanie elektrolitów do wód nastoinowych, skróciły o połowę czas niezbędny do skielkowania 50% nasion w 10°C oraz więcej niż podwoi- ły indeks wigoru /tab. 1/. Mimo tak silnych efektów fizjologicznych żaden z wymienionych zabiegów nie spowodował zmian jakościowych białek osi zarodkowych lub liścieni, analizowa- nych metodą PAGE.

Tabela 1

Wzrost wigoru nasion soi po ekspozycji w atmosferze nasyconej parą wodną /HRH/ lub osmokondycjonowaniu /OC/ w 25% PEG

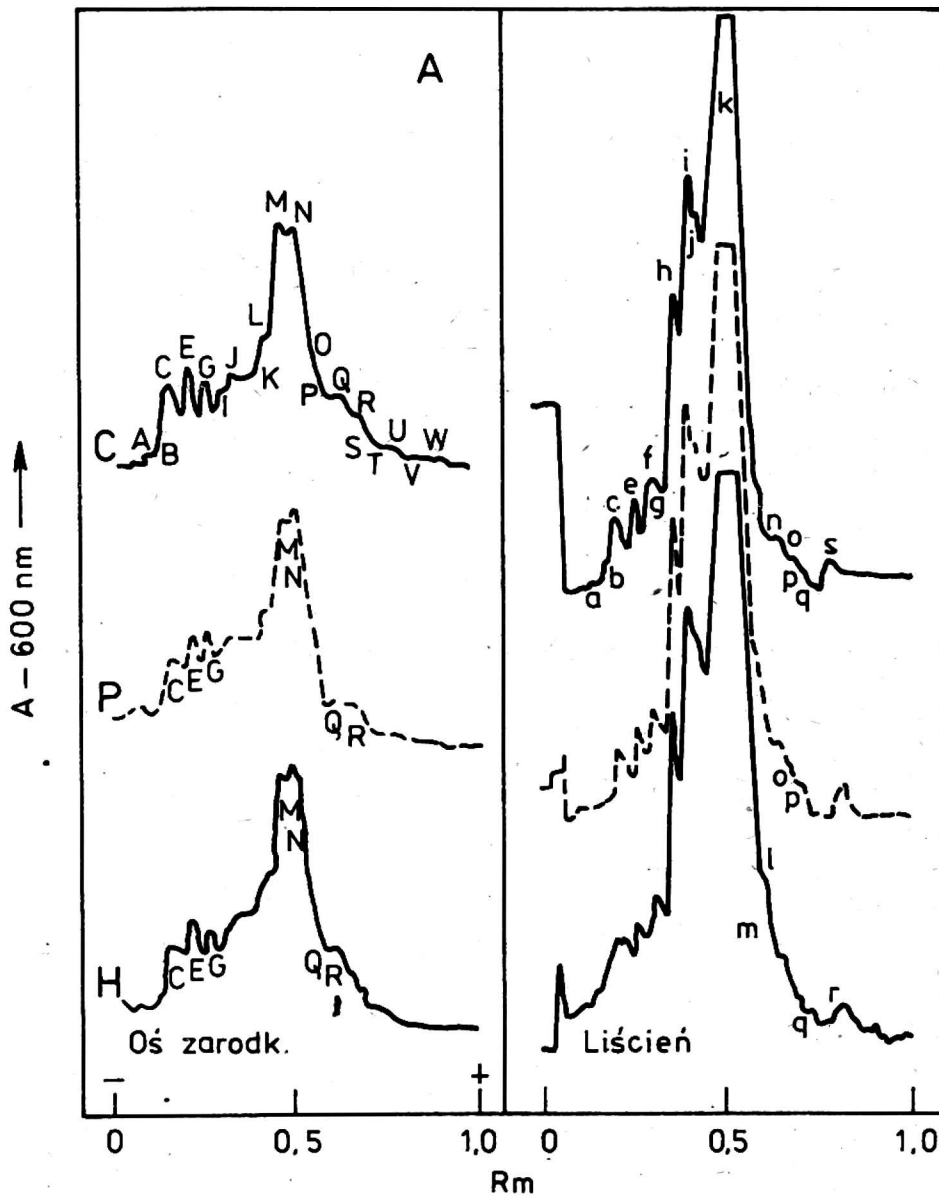
Wyszczególnienie	C	HRH	OC
Wilgotność, % suchej masy ¹	9,5a	21,5b	59,5c
Przewodnictwo ² , $\mu\text{S cm}^{-1}$	350a	190b	170b
Dni do skielkowania 50% nasion w 10°C	7,6a	3,5b	3,6b
VI ³	510a	1240b	1250b

¹ Suchą masę oznaczano po 48h w 105°C.

² Grupy po 30 nasion moczo w 150 ml wody 3-destylowanej w 10°C; EP mierzone po 24 h w tej samej temp.

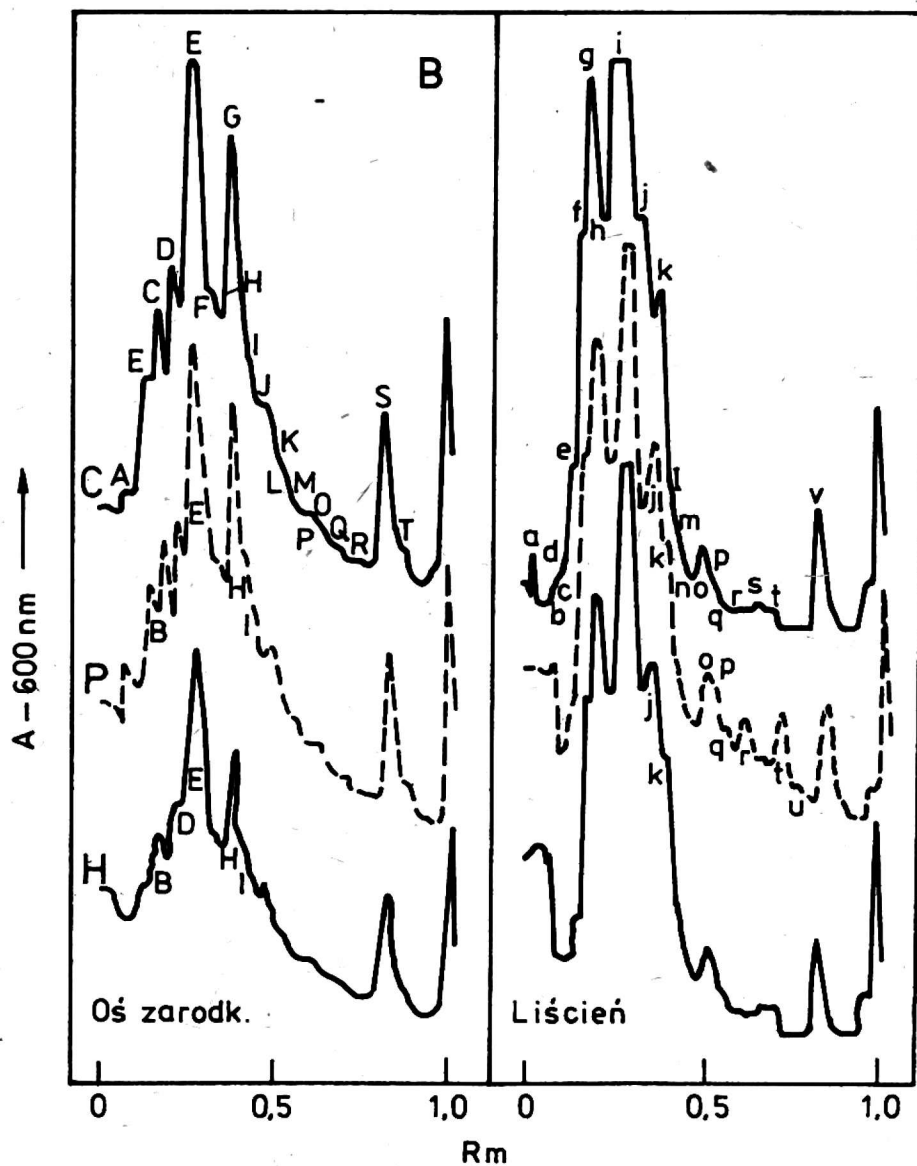
³ Indeks wigoru, VI = [(% skielkowań żywotnych) x (mm długości siewki) po 10 dniach w 10°C]. Różnice pomiędzy wartościami zaznaczonymi różnymi literami w każdej linii są istot- ne przy $p = 0,01$. C - Kontrola.

Występują natomiast drobne zmiany ilościowe poszczególnych prążków białkowych. W 5% żelu na elektroferogramach białek osi zarodkowych po OC i HRH stwierdza się nieznaczne obniżenie frakcji C, E i G w porównaniu z kontrolą; podobnie rzecz się ma ze względną wysokością prążków M, N i R /rys. 1A/. W 7% żelu prążek B jest wyraźniejszy w przypadku osi zarodkowych po OC i HRH niż w kontroli /rys. 1B/. Względna wysokość prążków D do E oraz G do H ulega zmianom w 10% żelu /rys. 1C/.



Rys. 1. Skaninge elektroferogramów w 5% /A/, 7% /B/ i 10% /C/ żelu poliakrylamidowym białek osi zarodkowych i liścieni nasion kontrolnych /C/, osmokondycjonowanych /P/ i ekspozowanych HRH /H/ nasion soi. Prążki białkowe, zmodyfikowane w wyniku kontrolowanego uwadniania, zaznaczono pod odpowiednimi pikami

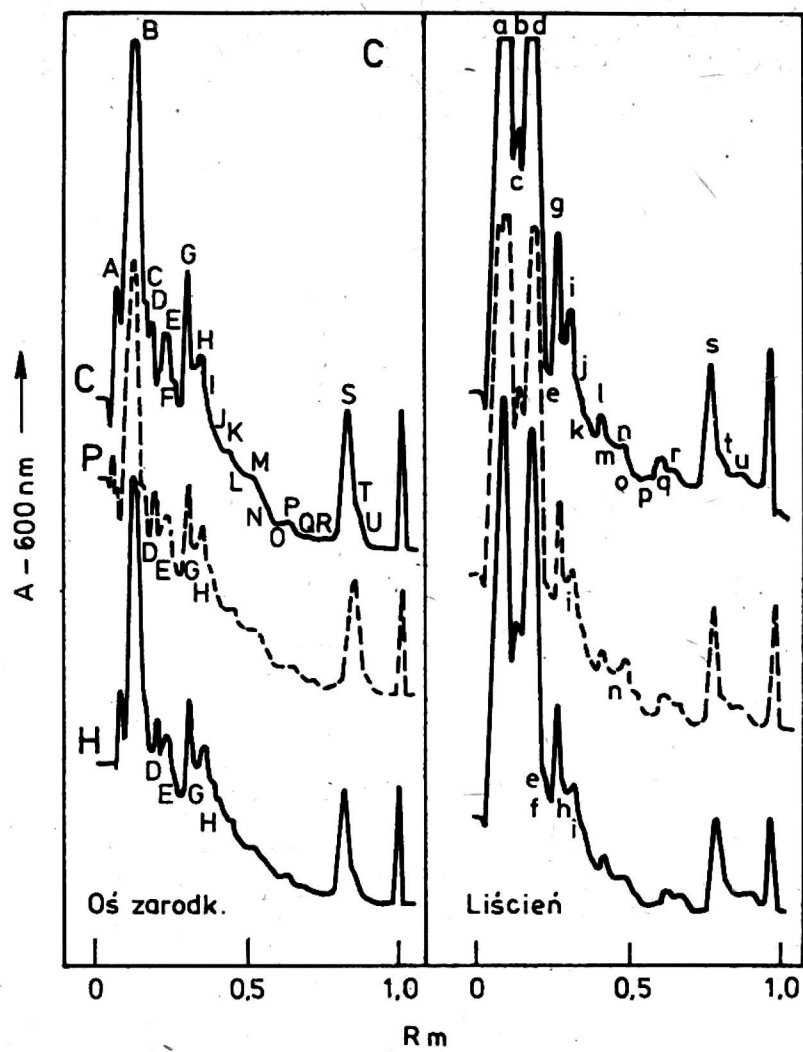
Fig. 1. Scanning profiles of proteins in 5% /A/, 7% /B/ and 10% /C/ polyacrylamide gels after electrophoresis of total extract of embryo axes and cotyledons of control /C/, osmoconditioned /P/ and HRH exposed /H/ seeds of soybean. Protein bands modified in a result of the treatments are denoted below the proper peaks



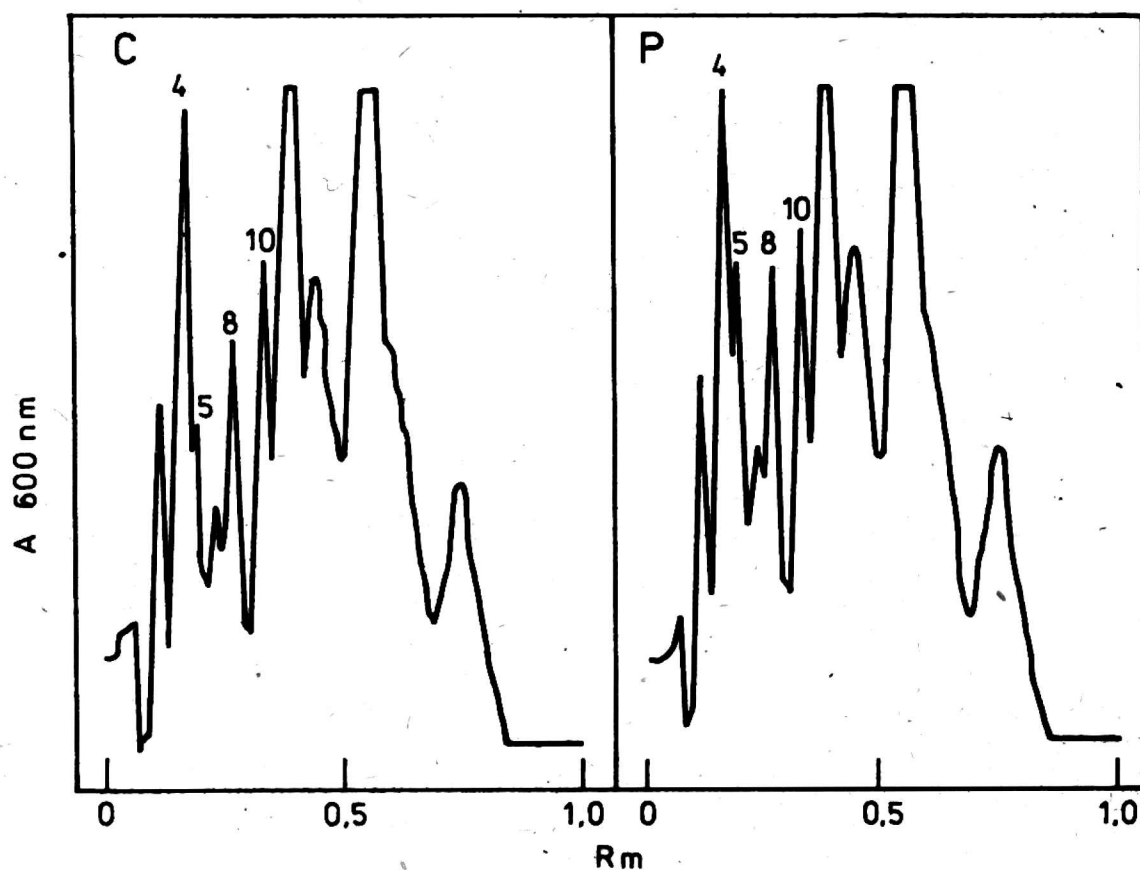
Rys. 1 B

Natomiast w liściach OC i ekspozycja HRH spowodowały wyraźną zmianę prążków j i k /elektroforeza w 7% żelu/, a OC spowodowało obniżenie się frakcji i i wzrost frakcji n /analiza w 10% żelu; rys. 1C/.

Analizy SDS-PAGE białek liścieni wykazały, iż OC oraz ekspozycja HRH powodują wzrost frakcji 5 względem frakcji 4 oraz frakcji 5 względem frakcji 8 i 10 /rys. 2/. Przybliżoną masę molową frakcji 4, 5, 8 i 10 wyznaczono odpowiednio na ok. 80 000, 71 000, 54 000 i 45 000 daltonów [9]. OC i HRH spowodowały również drobne obniżenie zawartości frakcji d /m. mol. 71 000 D/, wzrost frakcji x /m. mol. 9500-12 000 D/ oraz wzrost wzajemnego stosunku frakcji g do h /m. mol. 45 000 i 36 000 daltonów/ w przypadku białek osi zarodkowych /dane nie ilustrowane/.



Rys. 1 C



Rys. 2. SDS-PAGE białek liścieni wyizolowanych z kontrolnych /C/ i osmokondycjonowanych /P/ nasion soi. Numerami oznaczono tylko prążki zmodyfikowane w czasie OC

Fig. 2. Scanning profiles of proteins in SDS-polyacrylamide gels after electrophoresis of the total extracts of cotyledons of control /C/ and osmoconditioned /P/ soybean seeds. Only the peaks modified by OC are denoted with numerals

Znakowana leucyna przenika z roztworu PEG do nasion soi podczas osmokondycjonowania, przy czym 1,9 oraz 7% pobranej radioaktywności wykryto we frakcji białek wytrącających się TCA z liścieni i zarodków /tab. 2/. Chromatografia na żelach Sephadex oraz dializa wykazały, iż radioaktywność ta związana jest z polipeptydami o masie mol. ponad 12 000 D /dane nie przedstawiane/.

Tabela 2

Włączanie ^{14}C -leucyny do białek nasion soi podczas osmokondycjonowania

Nasiona osmokondycjonowano w 25% PEG z dodatkiem $185 \text{ KBq ml}^{-1} [^{14}\text{C-U}]\text{-L-leucyny}$ przez 2 dni w 10°C , a następnie przez 4 dni w 25°C . Aktywność specyficzna = dpm mg^{-1} białka.

Wyszczególnienie	Radioaktywność $\text{dpm} \times 10^{-3}$	
	para liścieni	oś zarodkowa
Całkowite pobieranie ^{14}C	2 370 /100%/	110 /100%/
Białko	45 /1,9%/	7,6 /7%/
Aktywność specyficzna	0,62	2,24

Specyficzna radioaktywność białek liścieni i osi zarodkowych po OC wynosiła odpowiednio 620 i 2240 dpm mg^{-1} białka, co świadczy iż synteza de novo polipeptydów w osiach zarodkowych była znacznie intensywniejsza niż w liścieniach.

Tabela 3

Synteza białka w osiach zarodkowych nasion soi, poddanych kontrolowanemu uwodnieniu drogą ekspozycji HRH lub OC

Zarodki izolowano z nasion kontrolnych /C/, poddanych ekspozycji HRH przez 5 dni w 25°C lub osmokondycjonowanych przez 4 dni w 10°C ; inkubowano je przez 3 h z ^{14}C -leucyną w 0,05 mM KCl i 0,01% Tween 20. Radioaktywność przedstawiono w $\text{dpm} \times 10^{-3}$ w przeliczeniu na jedną oś zarodkową.

Wyszczególnienie	C	HRH	OC
Całkowite pobieranie ^{14}C	80a	100b	99b
Radioaktywność w białku	2,3a	3,4b	5,0c
Radioaktywność w białku, procent			
Radioaktywności całkowitej	2,8a	3,4b	5,0c

Specyficzna radioaktywność białek liścieni i osi zarodkowych po OC wynosiła odpowiednio 620 i 2240 dpm mg^{-1} białka, co świadczy iż synteza de novo polipeptydów w osiach zarodkowych była znacznie intensywniejsza niż w liściach.

Osie zarodkowe nasion po OC i ekspozycji HRH pobrały ok. 20% więcej leucyny w porównaniu z kontrolą /tab. 3/. Jednak stopień włączenia pobranego aminokwasu do polipeptydów wytrącających się TCA wzrósł do 220 i 150% w porównaniu z kontrolą, przyjętej za 100%. Z ogólnej radioaktywności osie zarodkowe nasion kontrolnych włączyły 2,8% do polipeptydów, podczas gdy analogiczne wartości dla osi zarodkowych nasion eksponowanych HRH lub osmokondycjonowanych wynosiły 3,4% oraz 5% /tab. 3/. Świadczy to o silnej aktywacji układu biosyntezy białka w nasionach pod koniec okresu kontrolowanego uwadniania.

DYSKUSJA

W nasionach po osmokondycjonowaniu lub ekspozycji HRH stwierdza się nieznaczne zmiany ilościowe zawartości niektórych frakcji białkowych. Są to zmiany zbyt skromne, aby miały być przyczyną zwiększonego wigoru nasion /por. 7/. Bardziej znaczący jest fakt, iż do osmokondycjonowanych nasion przenika leucyna z roztworu PEG, przy czym pewna jej część włącza się do polipeptydów, zwłaszcza w osiach zarodkowych. Osie zarodkowe nasion po OC lub ekspozycji HRH również intensywniej włączają znakowany aminokwas do polipeptydów w porównaniu z osiami zarodkowymi nasion kontrolnych. Występuje dodatnia korelacja intensywności syntezy białek ze stopniem uwodnienia nasion, ponieważ nasiona kontrolne, eksponowane HRH i OC miały 9,5, 21,5 oraz 60% wilgotności w odniesieniu do suchej masy /tab. 1, 3/. Można więc wnioskować, że proces kontrolowanego uwadniania nasion pociąga za sobą biochemiczną aktywację, zwłaszcza w osiach zarodkowych. Tłumaczy to częściowo, zwiększenie odporności nasion na stres chłodnowodny. Drugim czynnikiem odpowiedzialnym za wzrost wigoru nasion po kontrolowanym uwodnieniu jest prawdopodobnie zmiana struktury membran cytoplazmatycznych [por. 1, 12], manifestująca się zmniejszonym wydzielaniem elektrolitów, aminokwasów i cukrów do roztworu zewnętrznego podczas pęcznienia [7, 8].

LITERATURA

1. Bramlage W. J., Leopold A. C. and Parrish D. J.: *Plant Physiol.* 1978, 61, 525-529.
2. Davis B. J.: *Ann. New York Acad. Sci.* 1964, 121, 404-327.
3. Heydecker W., Higgins J. and Gulliver R. L.: *Nature /Lond./* 1973, 246, 42-44.
4. Khan A. A. and Knypl J. S.: *Plant Physiol. Suppl.* 1977, 59, 33.
5. Khan A. A. Tao K.-L., Knypl J. S., Borkowska B. and Powell L. E.: *Acta Hort.* 1978, 83, 267-278.

6. Knypl J. S.: Zesz. Probl. Post. Nauk Roln. /ten numer, w druku/.
7. Knypl J. S. and Janas K. M.: Biol. Plant. /Praga/ 21 /w druku/, 1979.
8. Knypl J. S., Janas K. M.: Zesz. Probl. Post. Nauk Roln. /w druku/.
9. Knypl J. S., Janas K. M., Radziwonowska-Józwiak A.: Biochem. Physiol. Pflanzen /w druku/ 1979.
10. Lassociński W. and Knypl J. S.: Acta Soc. Bot. Polon. 1978, 47, 371-378.
11. Savoy C. F.: Can. J. Bot. 1977, 55, 2245-2250.
12. Webster B. D. and Leopold A. C.: Amer. J. Bot. 1977, 64, 1286-1293.

Я.С.Кныплъ, К.М.Янас, А.Радзиwonовска-Дзвѣк

ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ БЕЛКОВ ЗАРОДЫШЕВЫХ ОСЕЙ И
СЕМЯДОЛЕЙ СОИ / GLYCINE MAX. / С ПОВЫШЕННОЙ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬЮ
ПОД ВЛИЯНИЕМ ПОВЫШЕНИЯ ВЛАЖНОСТИ СЕМЯН

Р е з ю м е

Семена сои держали в атмосфере насыщенной водяным паром /HRH/, или осмекондиционировали /OC/ в 15%-ном растворе полиэтиленового гликоля 600. Повышение исходной влажности семян до свыше 20% сухого вещества вызвало снижение электропроводимости настоек вод, ускорение прорастания в температуре 10⁰С и повышение показателя жизнеспособности семян. Спектр белков семядолей и зародышевых осей подвергался небольшим качественным модификациям. В ходе ОС ¹⁴С лейцин усваивался семенами и включался в полипептиды. Биосинтез белка в зародышевых осях семян после экспозиции HRH и ОС повышался до 150 и 220% по отношению к контрольной величине принятой за 100%. Предполагается, что в ходе HRH и ОС в семенах происходит биохимическая активация, частично ответственная за рост толерантности сои к низким температурам.

J. S. Knypl, Krystyna M. Janas and Anna Radziwonowska-Józwiak

ELECTROPHORETIC PROTEIN PATTERN AND PROTEIN SYNTHESIS IN COTYLEDONS
AND EMBRYO AXES OF SOYBEAN /GLYCINE MAX/ WHOSE VIGOUR WAS
ENHANCED BY INCREASED HYDRATION LEVEL OF SEEDS

Summary

Soybean seeds were exposed to water saturated atmosphere /HRH/ or osmoconditioned in 25% polyethylene glycol 6000 /OC/. Both treatments halved conductivity of seed leachates, enhanced germination at 10°C, doubled the seed vigour index and caused inconsiderable quantitative modifications in electrophoretic patterns of seed proteins. In a course of OC labelled leucine was taken up by the seeds and incorporated into polypeptides of both cotyledons and embryo axes. Protein synthesis in embryo axes was accelerated by 150 and 220% of the control value taken for 100%, as tested at the end of HRH exposure and OC, respectively. Protein synthesis seems to be activated in the seeds subjected to controlled hydration by means of either HRH exposure or OC, the event being responsible in part for the increased seed vigour.