

Aneta Koseva-Chyła

BADANIA POZIOMU RNA PODCZAS KIEŁKOWANIA
I WZROSTU KORZENIA KUKURYDZY (*ZEA MAYS* L.)

IV. STOSUNEK POSZCZEGÓLNYCH RODZAJÓW RNA W CAŁYM KORZENIU
ORAZ W WIERZCHOŁKU KORZENIA

Stwierdzono, że podczas 14-dniowego okresu kiełkowania i rozwoju kukurydzy tempo przyrostu zawartości rRNA i tRNA w całym korzeniu jest jednakowe, a ich wzajemne proporcje nie ulegają zmianie. Nie ulegają zmianie również wzajemne proporcje obu frakcji rybosomowego RNA - r_1 RNA (26S) i r_2 RNA (18S) zarówno w całym korzeniu, jak i w wierzchołku korzenia. Wzajemne proporcje rRNA i tRNA zmieniają się tylko w wierzchołku korzenia. Zmiany te występują najwyraźniej pod koniec badanego okresu między 10 a 14 dniem. Są statystycznie znaczne w stosunku do wierzchołka korzenia kontrolnego (dwudniowego). Zaobserwowany wzrost stosunku tRNA/rRNA w wierzchołku korzenia nie jest skorelowany ze zmianami suchej masy.

WSTĘP

W piśmiennictwie naukowym poświęca się dużo miejsca zagadnieniom jakościowych i ilościowych zmian tRNA podczas rozwoju różnych organizmów. Stwierdzono, że populacja tRNA zmienia się wraz z rozwojem i różnicowaniem się komórek [19, 21, 40]. Wykazano również, że w różnych warunkach wzrostu komórek bakteryjnych zmienia się w nich znacznie stosunek tRNA/rRNA [18, 23], a jego wielkość uważana jest za wskaźnik aktywności metabolicznej komórki [29, 39]. Ilość cząsteczek tRNA przypadających na jeden rybosom jest np. o wiele mniejsza w szybko rosnących komórkach *E. co-*

Li aniżeli w komórkach charakteryzujących się wolnym wzrostem [30]. Podobną sytuację zaobserwowano u *Neurospora crassa* [1]. Zmiany w stosunku poszczególnych rodzajów RNA, które połączone były ze zmianami w stanie metabolicznym komórki zaobserwowano również i u roślin [16, 29, 38].

V a n d e r h o e f i K e y [38] wykazali, że stosunek tRNA/rRNA w intensywnie dzielących się komórkach merystematycznych korzenia grochu wzrasta prawie o 100%, kiedy przechodzą one ze stanu szybkich podziałów mitotycznych w stan elongacji i dyferencjacji. Podobne zjawisko wspomniani autorzy wykryli w callusie fasoli sojowej i w synchronicznie rosnących komórkach *Chlorelli* [39].

K u n g i W e s t [16] zaobserwowali wyraźny wzrost zawartości tRNA i jednocześnie spadek ilości rRNA, kiedy komórki wierzchołka korzenia grochu ulegały starzeniu lub przechodziły ze stanu podziału w stan elongacji. Stwierdzili oni, że w strefie wierzchołka korzenia wzrost poprzez zwiększenie ilości komórek jest pozytywnie skorelowany z wielkością stosunku tRNA/rRNA, a zawartość procentowa tRNA jest najniższa, gdy tempo wzrostu korzenia jest szybsze. Podobnie w hypokotylu soi podczas 6-dniowego okresu kiełkowania i wzrostu stosunek tRNA/rRNA wzrasta z 13,3 do 17 [29].

Celem niniejszej pracy było przebadanie, czy podczas kiełkowania i rozwoju korzenia kukurydzy zachodzą zmiany we wzajemnych proporcjach tRNA i rRNA oraz czy w miarę rozwoju korzenia wielkość stosunku tRNA/rRNA skorelowana jest z szybkością jego wzrostu.

MATERIAŁ I METODY

Do badań używano 2-, 4-, 6-, 8-, 10- i 14-dniowe korzenie kukurydzy (*Z. mays* L.) odmiana VIR-42.

RNA izolowano z całych korzeni oraz z wierzchołków korzeni kukurydzy metodą fenolową G e o r g i e v a [9].

Wysokocząsteczkowy (rRNA) i niskocząsteczkowy (tRNA) RNA otrzymywano z preparatów całkowitego RNA dwoma metodami: przez elektroforetyczne frakcjonowanie na żelu agarowym oraz metodą chromatografii kolumnowej na żelu Sephadex G-200 [7]. Elektrofo-

rezę przeprowadzano wg metody T s a n e v a [35] z zastosowaniem dodatkowego barwienia elektroforegramów mieszaniną oranżu akrydynowego (OA) i pyroniny B (10 mg OA i 10 mg pyroniny B na 100 ml buforu). Stosowano bufor weronalowocytrynianowy o pH 8,6, a zapis densytometryczny elektroforegramów wykonywano przy 510 nm.

W 2, 4, 6, 8, 10 i 14 dniu rozwoju kukurydzy oznaczano procentową zawartość poszczególnych rodzajów RNA i wielkość stosunku tRNA/rRNA w całym korzeniu oraz w jego 10-mm strefie wierzchołkowej.

Otrzymane wyniki opracowano statystycznie oznaczając:

- wartość średnią,
- błąd średniej,
- test istotności statystycznej dla dwóch średnich "t" wg Studenta-Fischera,
- współczynnik korelacji prostoliniowej r_{xy} ,
- współczynnik korelacji rangowej testem Spermana,
- aproksymację liniową wartości średnich.

Obliczenia statystyczne wykonano na maszynie matematycznej Odra-1305.

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

W wyniku chromatograficznego rozdziału RNA na żelu Sephadex-G-200 otrzymano dwie frakcje - frakcję wysokocząsteczkowego RNA (rRNA) i niskocząsteczkowego RNA (tRNA) (rys. 1, 2). Elektroforeza na żelu agarowym umożliwia dodatkowe rozfrakcjonowanie wysokocząsteczkowego rybosomowego RNA na dwie podfrakcje - r_1 RNA o stałej sedymentacji 26S i r_2 RNA o stałej sedymentacji 18S (rys. 3 i 4).

Poszczególne frakcje RNA otrzymane po elektroforezie na żelu agarowym identyfikowałam na podstawie wzorca elektroforetycznego ustalonego wcześniej przez T s a n e v a [34] dla RNA izolowanego w temperaturze 0-4°C z wątroby szczura oraz K o l e v e j [14] dla RNA wierzchołka korzenia kukurydzy izolowanego w tych samych warunkach. Dodatkowo również przeprowadziłam doświadczenia z wysalaniem RNA 1 M NaCl, które powoduje wytrącenie wysokocząsteczkowego RNA w postaci osadu, w roztworze na-

tomiaśt pozostaje frakcja rozpuszczalnego niskocząsteczkowego RNA [22].

Po takim wysoleniu całkowitego preparatu RNA i naniesieniu na żel każdej z obu otrzymanych frakcji stwierdziłam, że:

1) Frakcja wysokocząsteczkowego strącającego się 1 M NaCl RNA podczas elektroforezy w żelu agarowym zlokalizowana była głównie w dwóch blisko siebie położonych pasmach elektroforetycznych o barwie czerwono-ceglastej i żółtej. Ich wielkość i lokalizacja zgadzały się z pierwszymi dwoma pasmami otrzymanymi podczas frakcjonowania preparatu całkowitego RNA. Odpowiadają one obu frakcjom rybosomowego RNA (r_1 RNA i r_2 RNA).

2) Frakcja niskocząsteczkowego RNA znajdującego się w roztworze po wysoleniu 1 M NaCl podczas elektroforezy zlokalizowana była głównie w jednym pasmie, wykazującym pod lampą UV silną seledynowo-żółtą fluorescencję. Równoległa elektroforeza tej frakcji RNA i całkowitego RNA korzenia kukurydzy wykazała, że lokalizacją i barwą odpowiada ona frakcji najszybciej wędrującego niskocząsteczkowego RNA (tRNA).

W celu sprawdzenia czy frakcje RNA otrzymane metodą chromatografii kolumnowej są adekwatne do otrzymanych po elektroforezie RNA wykonałam następujące doświadczenie: sumaryczny preparat rRNA otrzymany z kolumny nanosiłam na żel i poddawałam elektroforezie w tych samych warunkach, w których frakcjonowałam preparaty całkowitego RNA. Identyczną analizę wykonałam dla sumarycznej frakcji tRNA.

Rybosomowy RNA otrzymany z chromatografii kolumnowej na żelu Sephadex G-200 podczas elektroforezy został rozdzielony na dwie frakcje odpowiadające wielkością, kolorem i lokalizacją frakcjom r_1 RNA i r_2 RNA w elektroforegramach całkowitego RNA korzenia. tRNA natomiast wędrował cały czas jako jedno pasmo odpowiadające tRNA w elektroforegramach całkowitego RNA. Wydaje się więc, że wyniki dotyczące względnej zawartości rRNA i tRNA w preparatach całkowitego RNA otrzymane przy użyciu wspomnianych metod* odnoszą się do tych samych frakcji RNA i w rozważaniach ilościowych mogą być porównywalne.

Z uzyskanych elektroforegramów całkowitego RNA oznaczałam procentową zawartość poszczególnych jego frakcji. Wyniki z tych oznaczeń dla RNA otrzymanego z całego korzenia umieszczone są w

T a b e l a 1

Procentowa zawartość poszczególnych frakcji RNA otrzymanych po elektroforetycznym rozfrakcjonowaniu całkowitego RNA na żelu agarowym. Wyniki dotyczą preparatów RNA izolowanych z całego korzenia kukurydzy

The percent content of the individual RNA fractions obtained after the electroforetic fractionation of the total RNA on the agar gel. The results concern the RNA samples isolated from the whole root

Wiek kielek w dniach	rRNA	r ₁ RNA	r ₂ RNA	tRNA	$\frac{r_1 \text{ RNA}}{r_2 \text{ RNA}}$	$\frac{\text{rRNA}}{\text{tRNA}} \times 100$
2	82,41 $\pm$ 0,94	52,92 $\pm$ 2,26	28,98 $\pm$ 0,86	17,92 $\pm$ 0,63	1,82 $\pm$ 0,07	21,55 $\pm$ 1,42
4	81,79 $\pm$ 0,63	50,25 $\pm$ 0,58	31,06 $\pm$ 0,24	18,68 $\pm$ 0,68	1,70 $\pm$ 0,06	23,30 $\pm$ 1,22
6	81,09 $\pm$ 1,47	51,03 $\pm$ 0,44	30,05 $\pm$ 1,49	18,90 $\pm$ 1,47	1,72 $\pm$ 0,09	23,56 $\pm$ 2,24
8	79,81 $\pm$ 0,92	50,26 $\pm$ 0,99	30,46 $\pm$ 0,40	20,18 $\pm$ 0,92	1,71 $\pm$ 0,08	25,38 $\pm$ 1,45
10	80,48 $\pm$ 0,47	51,46 $\pm$ 0,84	30,10 $\pm$ 0,55	19,51 $\pm$ 0,47	1,70 $\pm$ 0,03	24,28 $\pm$ 0,73
14	80,86 $\pm$ 0,66	51,02 $\pm$ 0,82	29,84 $\pm$ 0,93	19,13 $\pm$ 0,66	1,71 $\pm$ 0,07	23,71 $\pm$ 1,01

tab. 1, a dane dotyczące RNA izolowanego z wierzchołka korzenia - w tab. 3.

Główna część RNA zarówno w preparatach otrzymanych z całego korzenia jak i w tych z wierzchołka korzenia stanowił rybosomowy RNA. Zajmuje on 79,81-82,41% całkowitego RNA korzenia i 78,90-87,73% całkowitego RNA wierzchołka korzenia, przy czym 50,26-52,92% przypada na ciężką frakcję rybosomowego RNA - r_1 RNA, a pozostałe 28,98-31,06% na frakcję lekką - r_2 RNA (tab. 1).

T a b e l a 2

Zawartość procentowa rRNA i tRNA w preparatach całkowitego RNA izolowanego z całych korzeni kukurydzy w różnych dniach ich rozwoju. Zamieszczone w tabeli dane dotyczą wyników uzyskanych po chromatograficznym rozdzieleniu RNA na żelu Sephadex G-200

The percent content of the individual fractions of RNA obtained after the electrophoretic fractionation on the agar gel. The results concern the RNA samples isolated from the root tips

Wiek kiełków w dniach	rRNA%	tRNA%	$\frac{tRNA}{rRNA} \times 100$
2	83,20 $\pm$ 0,93	16,79 $\pm$ 0,93	20,35 $\pm$ 1,36
4	80,59 $\pm$ 0,88	19,40 $\pm$ 0,88	24,13 $\pm$ 1,37
6	81,87 $\pm$ 0,38	18,10 $\pm$ 0,37	22,12 $\pm$ 0,56
8	81,43 $\pm$ 0,85	18,56 $\pm$ 0,85	22,83 $\pm$ 1,29
10	78,48 $\pm$ 1,04	21,51 $\pm$ 1,04	27,53 $\pm$ 1,69
14	79,35 $\pm$ 0,93	20,64 $\pm$ 0,93	24,88 $\pm$ 1,24

Podobnie przedstawiają się względne zawartości obu frakcji rybosomowego RNA w preparatach otrzymanych z wierzchołka korzenia, gdzie 50,64-54,93% zajmuje frakcja ciężka rRNA - r_1 RNA, a 28,26-32,80% - frakcja lekka rRNA - r_2 RNA (tab. 3).

Wszystkie otrzymane preparaty RNA charakteryzowały się prawidłowym stosunkiem obu frakcji rRNA wynoszącym średnio 1,7-1,8 zarówno dla preparatów RNA całego korzenia, jak i dla tych z

T a b e l a 3

Procentowa zawartość poszczególnych rodzajów RNA
otrzymanych po elektroforetycznym rozfrakcjonowaniu całkowitego RNA na żelu agarowym.
Wyniki dotyczą preparatów RNA izolowanych z wierzchołków korzeni kukurydzy

The percent content of rRNA and tRNA in the total RNA samples isolated
from the whole corn roots during different days of growth.

The data in the table concern the results obtained after chromatography fractionation of RNA
on Sephadex G-200 gel.

Wiek kłąków w dniach	rRNA	r ₁ RNA	r ₂ RNA	tRNA	$\frac{r_1 \text{ RNA}}{r_2 \text{ RNA}}$	$\frac{t \text{ RNA}}{r \text{ RNA}} \times 100$
2	87,73 $\pm$ 0,69	54,93 $\pm$ 1,25	32,80 $\pm$ 1,15	12,26 $\pm$ 0,69	1,69 $\pm$ 0,09	13,96 $\pm$ 0,91
4	85,81 $\pm$ 0,84	53,84 $\pm$ 0,78	31,97 $\pm$ 0,68	14,18 $\pm$ 0,84	1,68 $\pm$ 0,05	16,55 $\pm$ 1,17
6	85,43 $\pm$ 0,76	54,76 $\pm$ 1,04	30,33 $\pm$ 0,94	14,56 $\pm$ 0,76	1,81 $\pm$ 0,08	17,05 $\pm$ 1,03
8	85,55 $\pm$ 0,90	54,24 $\pm$ 0,37	31,13 $\pm$ 0,78	14,64 $\pm$ 0,90	1,74 $\pm$ 0,04	17,18 $\pm$ 1,27
10	80,26 $\pm$ 0,70	52,03 $\pm$ 0,42	29,12 $\pm$ 0,70	19,73 $\pm$ 0,70	1,76 $\pm$ 0,06	24,58 $\pm$ 1,08
14	78,90 $\pm$ 0,69	50,64 $\pm$ 0,89	28,26 $\pm$ 0,88	21,09 $\pm$ 0,69	1,80 $\pm$ 0,08	26,73 $\pm$ 1,11

wierzchołka korzenia. Wartości te zgodne są z danymi literaturowymi dotyczącymi czystych niezdegradowanych preparatów RNA [6, 30, 31]. Frakcja niskocząsteczkowego tRNA stanowiła 17,92-20,18% całkowitego RNA korzenia (tab. 1) i 12,26-21,09% RNA wierzchołka korzenia (tab. 3).

Analogiczne wartości dla tRNA otrzymanego z chromatografii kolumnowej wynosiły:

- w preparatach RNA z całego korzenia kukurydzy 16,79-21,51%
- w preparatach RNA z wierzchołka korzenia 13,95-21,51% (tab. 2 i tab. 4).

T a b e l a 4

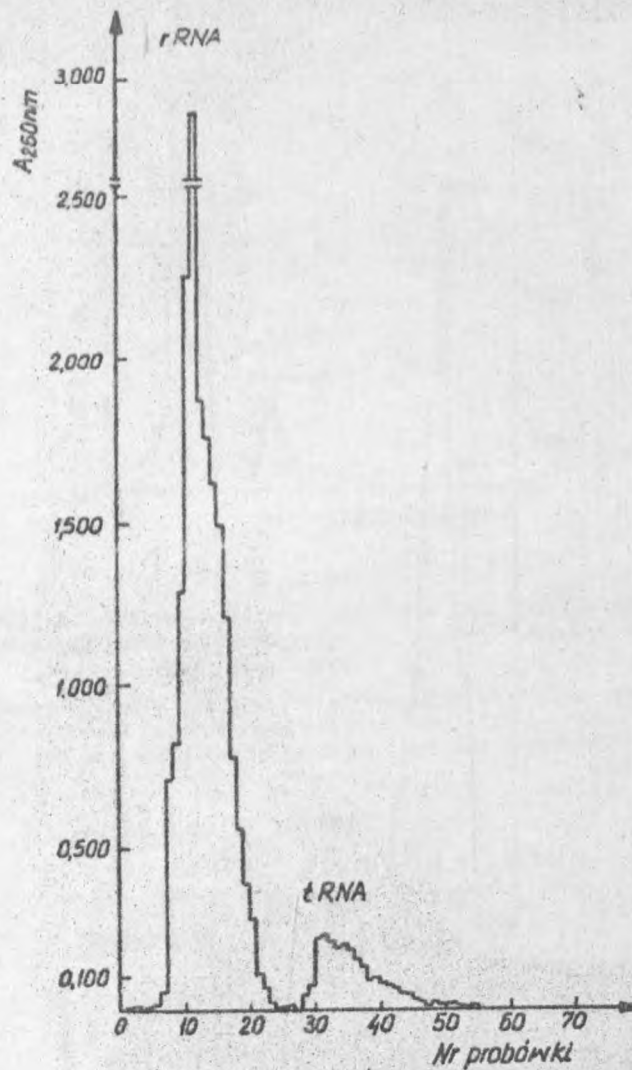
Zawartość procentowa rRNA i tRNA w preparatach całkowitego RNA izolowanego z wierzchołków korzeni kukurydzy w różnych dniach rozwoju. Zamieszczone w tabeli dane dotyczą wyników uzyskanych po chromatograficznym rozdziale RNA na żelu Sephadex G-200.

The percent content of rRNA and tRNA in the total RNA samples isolated from the corn root tips in different days of germination and growth. The data in the table concern the results obtained after chromatography of RNA on Sephadex G-200 gel

Wiek kiełków w dniach	rRNA%	tRNA%	$\frac{tRNA}{rRNA} \times 100$
2	85,08 $\pm$ 0,73	14,91 $\pm$ 0,73	17,53 $\pm$ 1,01
4	86,05 $\pm$ 0,76	13,95 $\pm$ 0,76	16,21 $\pm$ 1,04
6	84,51 $\pm$ 0,78	15,48 $\pm$ 0,78	18,31 $\pm$ 1,09
8	81,43 $\pm$ 0,85	18,56 $\pm$ 0,85	22,83 $\pm$ 1,29
10	78,48 $\pm$ 1,04	21,51 $\pm$ 1,04	27,53 $\pm$ 1,69
14	79,71 $\pm$ 0,97	20,28 $\pm$ 0,97	25,50 $\pm$ 1,57

Zawartość rRNA dla tych samych preparatów wynosiła odpowiednio 78,48-83,20% (tab. 2) i 78,48-86,05% (tab. 4).

Podczas badanego okresu rozwoju w całym korzeniu nie stwierdzono statystycznie znamiennych różnic w wielkości stosunku obu rodzajów RNA w poszczególnych dniach rozwoju w stosunku do kon-

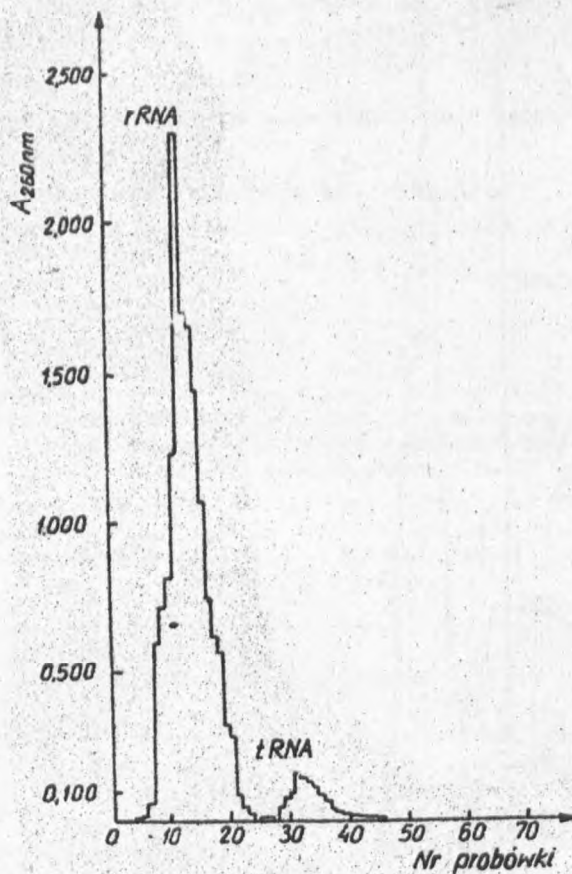


Rys. 1

Przykładowy rozdział chromatograficzny preparatu RNA na żelu Sephadex G-200. RNA izolowano z całego korzenia kukurydzy. Rozmiary kolumny: 15 x 500 mm; Eluent: 0,05 M NaCl; Wpływ: 0,3 ml/min

An exemplary chromatography of the RNA sample on Sephadex G-200 gel. The RNA was isolated from the whole corn root. The column used: 15 x 500 mm, eluted by 0.05 M NaCl with the rate of 0.3 ml/min

troli (korzeń dwudniowy) (tab. 5). Wyjątek stanowi jedynie wzrost tRNA/rRNA w 10 dniu w porównaniu z kontrolą, oznaczony po chro-

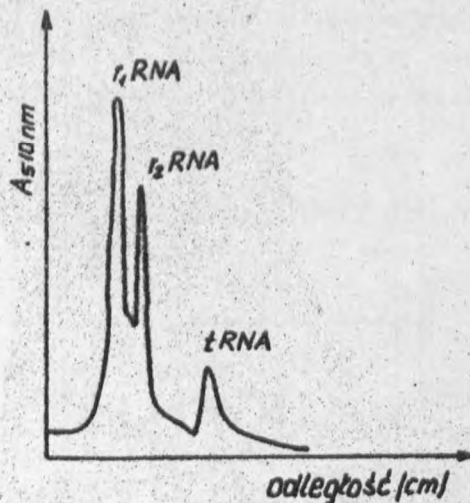


Rys. 2

Przykładowy rozdział chromatograficzny preparatu RNA na żelu Sephadex G-200. RNA izolowano z wierzchołka korzenia kukurydzy. Rozmiary kolumny: 15 x 500 mm; Eluent: 0,05 M NaCl; Wpływ: 0,3 ml/min

An exemplary chromatography of the RNA sample on Sephadex G-200 gel. The RNA was isolated from the corn root tip. The column used: 15 x 500 mm eluted by 0.05 M NaCl with the rate of 0.3 ml/min

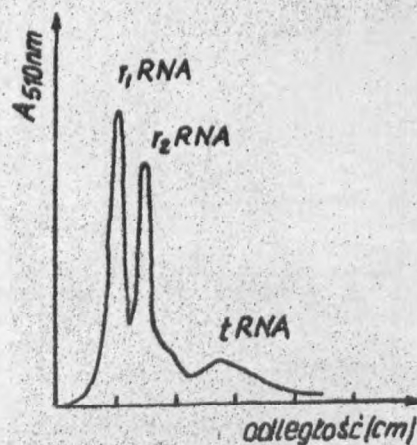
matograficznym rozdziale całkowitego RNA na żelu Sephadex G-200. Wielkość stosunku tRNA/rRNA wykazuje znamieny statystycznie przyrost w wierzchołku korzenia 10- i 14-dniowego w porównaniu z kontrolą (wierzchołek korzenia dwudniowego), niezależnie od



Rys. 3

Przykładowy rozdział elektroforetyczny preparatu RNA izolowanego z całego korzenia kukurydzy. Warunki elektroforezy: 1,25% żel agarowy, 100 min, 8 V/cm. Wiek korzeni - 2 dni

An exemplary electrophoresis of the RNA sample isolated from the whole corn root. The electrophoresis process was carried in 1.25% agarose gel during 100 min, 8 V/cm. The roots were two days old

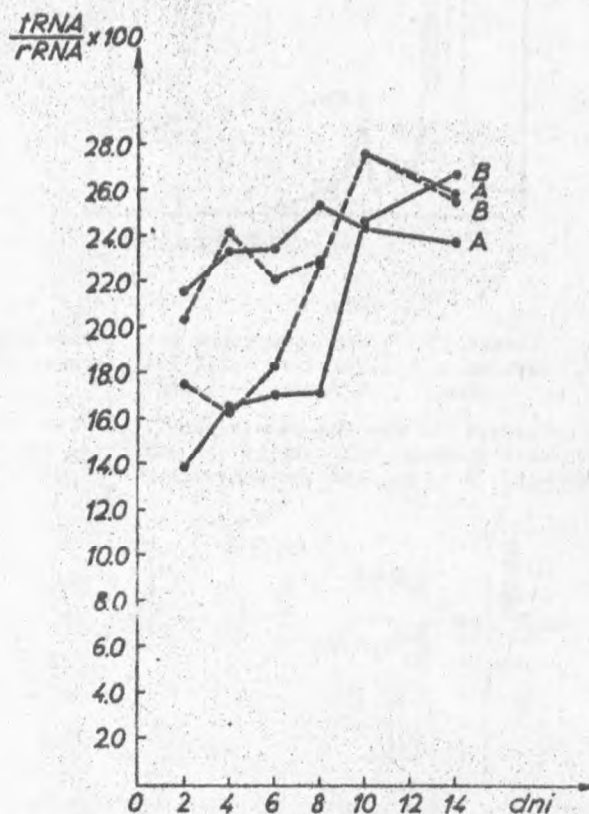


Rys. 4

Przykładowy rozdział elektroforetyczny preparatu RNA izolowanego z wierzchołka korzenia kukurydzy. Warunki elektroforezy: 1,25% żel agarowy, 90 min, 9 V/cm. Wiek korzeni - 6 dni

An exemplary electrophoresis of the RNA isolated from the corn root tip. The electrophoresis process was carried in 1.25% agarose gel during 90 min, 9 V/cm. The roots were 6 days old

stosowanej metody frakcjonowania całkowitego RNA (rys. 5, tab. 6). W wynikach otrzymanych z chromatografii kolumnowej stwierdzono również istotny przyrost wielkości stosunku tRNA/rRNA w wierzchołku 8-dniowym.



Rys. 5

Stosunek tRNA/rRNA w poszczególnych dniach rozwoju A - całego korzenia kukurydzy, B - wierzchołka korzenia kukurydzy; ——— wyniki uzyskane z elektroforetycznego frakcjonowania całkowitego RNA na żelu agarowym, ----- wyniki uzyskane z chromatograficznego frakcjonowania całkowitego RNA na żelu Sephadex G-200

The ratio of tRNA/rRNA in different days of growth A - the whole corn root, B - the corn root tip; ——— the results obtained from electrophoretic fractionation of the total RNA on the agar gel, ----- the results obtained from the chromatography fractionation of the total RNA on Sephadex G-200 gel

Tabela 5

Test istotności statystycznej procentowej zawartości poszczególnych rodzajów RNA w preparatach całkowitego RNA izolowanego z całych korzeni kukurydzy oraz wielkości stosunku tRNA/rRNA

The statistical significance test of the percent content of different kinds of RNA in the total RNA samples isolated from whole corn roots together with the ratio tRNA/rRNA

Dni kieł- ko- wania	Elektroforeza					Sephadex G-200			
	rRNA%	r ₁ RNA%	r ₂ RNA%	tRNA%	tRNA rRNA	rRNA%	tRNA%	tRNA rRNA	tRNA x 100 rRNA
zmiany w kolejnych dwudniowych okresach rozwoju									
2-4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4-6	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6-8	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8-10	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10-14	-	-	-	-	-	-	-	-	-
zmiany w stosunku do kontroli									
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	0,02 < p < 0,05	0,02 < p < 0,05	0,02 < p < 0,05	0,02 < p < 0,05
14	-	-	-	-	-	0,02 < p < 0,05	0,02 < p < 0,05	0,02 < p < 0,05	-

Tabela 6

Test istotności statystycznej procentowej zawartości poszczególnych rodzajów RNA w preparatach całkowitego RNA izolowanego z wierzchołków korzeni kukurydzy oraz wielkości stosunku tRNA/rRNA

The statistical significance test of the percent content of the different kinds of RNA in the total RNA samples isolated from the corn root tips together with the ratio of tRNA/rRNA

Dni kielkowania	Elektroforeza					Sephadex G-200		
	rRNA%	r ₁ RNA%	r ₂ RNA%	tRNA	tRNA/rRNA x 100	rRNA%	tRNA%	tRNA/rRNA x 100
zmiany w kolejnych dwudniowych okresach rozwoju								
2-4	-	-	-	-	-	-	-	-
4-6	-	-	-	-	-	-	-	-
6-8	-	-	-	-	-	-	-	-
8-10	0,005 < p < 0,01	0,01 < p < 0,02	-	0,005 < p < 0,01	0,005 < p < 0,01	-	-	-
10-14	-	-	-	-	-	-	-	-
zmiany w stosunku do kontroli								
4	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-	-	-
10	p < 0,001	-	-	p < 0,001	0,001 < p < 0,002	0,005 < p < 0,01	0,02 < p < 0,05	0,02 < p < 0,05
14	p < 0,001	-	0,02 < p < 0,05	p < 0,001	p < 0,001	0,01 < p < 0,02	0,05 < p < 0,01	0,005 < p < 0,001

Tabela 7

Wartości współczynników korelacji i test istotności współczynników korelacji między zawartością suchej masy całego korzenia i wierzchołka korzenia oraz wielkością stosunku $tRNA/rRNA$ w poszczególnych dniach rozwoju korzenia kukurydzy; P - wartości współczynników korelacji prostoliniowej, R - wartości współczynników korelacji rangowej

The values of the correlation coefficient and the significance test of the correlation coefficient between the dry mass content of the whole root and the root tip together with the ratio of $tRNA/rRNA$ during different days of the root growth; P - the value of the linear correlation coefficient, R - the value of the rang correlation coefficient

Dni kieł- kowa- nia		Cały korzeń		Wierzchołek korzenia	
		$\frac{tRNA}{rRNA} \times 100$ elektroforeza	$\frac{tRNA}{rRNA} \times 100$ Sephadex G-200	$\frac{tRNA}{rRNA} \times 100$ elektroforeza	$\frac{tRNA}{rRNA} \times 100$ Sephadex G-200
2	P	-	-	-	-0,803
	R	-	-	-	-
4	P	-	-	-	-
	R	-	-	-	-
6	P	-	-	-	-0,883
	R	-	-	-	0,942
8	P	-	-	-	-
	R	-	-	-	-
10	P	-	-	-	-
	R	-	-	-	-
14	P	-	-	0,813	-
	R	-	-	-	-

Tabela 8

Wartości średnich suchej masy obliczone z aproksymacji liniowej dla zależności między zmianami zawartości suchej masy a wielkością stosunku tRNA/rRNA, wartości współczynników korelacji i test istotności współczynników korelacji między zmianami suchej masy a zmianami stosunku tRNA/rRNA podczas rozwoju korzenia kukurydzy

The average values of the dry mass estimated from the linear approximation for the dependence of changes of the dry mass content and the ratio of tRNA/rRNA, the values of the correlation coefficient and the significance test of the correlation coefficient between the changes of the dry mass and changes of the ratio tRNA/rRNA during the root growth

Metoda	Współczynnik korelacji	$\bar{x}$ m.s.-dośw.	$\bar{x}$ m.s.-obliczone
cały korzeń			
tRNA/rRNA	-	3,60 $\pm$ 0,15	2,58 $\pm$ 0,14
Elektroforeza	0,910	6,56 $\pm$ 0,09	5,94 $\pm$ 0,31
		13,18 $\pm$ 0,33	13,78 $\pm$ 0,15
		16,03 $\pm$ 0,28	17,29 $\pm$ 0,98
		19,43 $\pm$ 0,42	20,33 $\pm$ 0,16
		27,23 $\pm$ 0,32	25,85 $\pm$ 0,93
tRNA/rRNA	-	3,60 $\pm$ 0,15	3,00 $\pm$ 0,08
Sephadex G-200	0,938	6,56 $\pm$ 0,09	5,76 $\pm$ 0,24
		13,18 $\pm$ 0,33	13,92 $\pm$ 0,16
		16,03 $\pm$ 0,28	16,87 $\pm$ 0,20
		19,43 $\pm$ 0,42	20,55 $\pm$ 0,39
		27,23 $\pm$ 0,32	26,01 $\pm$ 0,43
wierzchołek korzenia			
tRNA/rRNA	-	0,67 $\pm$ 0,01	0,61 $\pm$ 0,05
Elektroforeza	0,921	0,59 $\pm$ 0,01	0,55 $\pm$ 0,03
		0,53 $\pm$ 0,01	0,54 $\pm$ 0,01
		0,44 $\pm$ 0,01	0,53 $\pm$ 0,09
		0,37 $\pm$ 0,01	0,35 $\pm$ 0,01
		0,31 $\pm$ 0,00	0,30 $\pm$ 0,00
tRNA/rRNA	-	0,67 $\pm$ 0,01	0,58 $\pm$ 0,08
Sephadex G-200	0,942	0,59 $\pm$ 0,01	0,62 $\pm$ 0,03
		0,53 $\pm$ 0,01	0,56 $\pm$ 0,03
		0,44 $\pm$ 0,01	0,44 $\pm$ 0,00
		0,37 $\pm$ 0,01	0,31 $\pm$ 0,05
		0,31 $\pm$ 0,01	0,31 $\pm$ 0,00

W całym korzeniu nie stwierdzono korelacji między wielkością stosunku tRNA/rRNA a poziomem suchej masy, w wierzchołku korzenia natomiast stwierdzono taką korelację w 2, 6 i 14 dniu rozwoju (tab. 7).

Aby stwierdzić, czy istnieje liniowa zależność między zmianami poziomu suchej masy a zmianami w wielkości stosunku tRNA/rRNA były przeprowadzone obliczenia aproksymacji liniowej wartości średnich porównywanych parametrów dla badanego okresu rozwoju korzenia. Wartości otrzymanych współczynników korelacji oraz test ich istotności wykazały, że zmiany wielkości stosunku tRNA/rRNA w miarę rozwoju kukurydzy ani w całym korzeniu, ani w wierzchołku korzenia nie są skorelowane ze zmianami suchej masy. Między zmianami wspomnianych parametrów nie istnieje również zależność liniowa (tab. 8).

DYSKUSJA

Na podstawie szczegółowej analizy i zestawienia moich wyników z wynikami innych autorów można przypuszczać, że na zaobserwowaną podczas rozwoju wierzchołka korzenia kukurydzy zmianę stosunku tRNA/rRNA mogą mieć wpływ następujące czynniki:

- częściowa degradacja nukleolityczna preparatów RNA spowodowana dużą aktywnością RN-azy w młodej rosnącej tkance roślinnej,
- różnice w szybkości wzrostu korzenia w poszczególnych okresach rozwoju i związane z tym różnice w aktywności metabolicznej jego komórek,
- sukcesywne różnicowanie się komórek merystematycznych wierzchołka korzenia w miarę rozwoju.

Bardzo istotnym czynnikiem jest homogenność frakcji tRNA. W warunkach stosowanej przeze mnie elektroforezy frakcja niskocząsteczkowego tRNA jest częściowo zanieczyszczona przez 5S RNA, który wędruje razem z 4S RNA. Wydaje się jednak, że zaobserwowany w miarę rozwoju korzenia wzrost ilości tRNA dotyczy w głównej mierze, jeżeli nie wyłącznie, frakcji 4S RNA ze względu na to, że 5S RNA zajmuje niewielki procent frakcji niskocząsteczkowego RNA.

W badaniach nad stosunkiem tRNA/rRNA w różnych pod względem morfologicznym komórkach metodą elektroforezy na żelu poliakryl-

amidowym stwierdzono, że w komórkach merystematycznych korzenia grochu 5S RNA stanowi 10% frakcji rozpuszczalnej w 3,0 M octanie sodu, a tylko 5% w komórkach wydłużających się i w komórkach zróżnicowanych. Ponadto dodatkowe rozfrakcjonowanie frakcji niskocząsteczkowego RNA na 4S i 5S RNA wykazało, że poziom 5S RNA zmienia się równolegle z poziomem rybosomalnego RNA [36].

Wyniki licznych badań świadczą o tym, że w roślinach nukleazy są niezwykle aktywne i trudne do inaktywacji, a aktywność RN-azy wzrasta wraz z rozwojem i starzeniem się tkanki [4, 5, 8, 10, 17, 26, 28, 31, 43].

Trapy i wsp. [34] stwierdzili, że rybosomowy RNA izolowany z tkanki merystematycznej korzenia fasoli jest częściowo zdegradowany przez endonukleazy związane z rybosomowym RNA i nie dające się zinaktywować przez stosowane powszechnie inhibitory. Ich zdaniem, pomimo że ilość tych nukleaz jest znikoma, ich obecność rzutuje na własności otrzymanych preparatów. RNA ekstrahowany z rybosomów kukurydzy przy użyciu zimnego fenolu i SLŚ zazwyczaj zawiera spore ilości heterogennego RNA o niskim ciężarze cząsteczkowym. Degradacja jest tym większa, im starszą tkankę użyto do preparatyki [12].

W pracy swojej nie przeprowadzałam równoległych oznaczeń aktywności RN-azy w badanym okresie rozwoju korzenia, jak również i innych dodatkowych badań, na podstawie których mogłabym zdecydowanie wykluczyć częściową nukleolityczną degradację RNA podczas preparatyki. Uzyskane wyniki dostarczają jednak pewnych dowodów pozwalających sądzić, że preparaty RNA nie były zdegradowane, jeżeli nawet występowała pewna degradacja, której nie udało się stwierdzić powyższymi metodami, była ona minimalna i nie powinna powodować tak znacznego wzrostu zawartości niskocząsteczkowego tRNA. Otrzymany obraz zarówno z frakcjonowania chromatograficznego, jak i elektroforetycznego preparatów całkowitego RNA nie wykazywał obecności produktów degradacji. Uzyskane rozdziały elektroforetyczne charakteryzowały się ostrym rozgraniczeniem poszczególnych pasm, podczas gdy zdegradowane preparaty RNA w warunkach stosowanej przeze mnie elektroforezy dają odmienny obraz [15]. Mimo to nie wykluczam, że część produktów degradacji mogłaby wędrować razem z frakcją niskocząsteczkowego RNA.

Hadziov i wsp. [11] badali odporność poszczególnych frakcji RNA izolowanego z wątroby szczura na działanie pod-

wyższej temperatury i stwierdzili, że najbardziej wrażliwy na degradację jest rybosomowy 28S RNA. Jednocześnie produkty jego degradacji powodowały znaczny wzrost zawartości frakcji niskocząsteczkowego RNA i połączone z tym naruszenie wzajemnych proporcji tRNA/rRNA. Podobne badania zostały przeprowadzone przez innych autorów [42]. Możliwe więc, że zmiana we wzajemnych proporcjach tRNA/rRNA w moich badaniach również mogła być spowodowana zwiększeniem ilości frakcji tRNA przez produkty degradacji rRNA. Przeciwno takiej interpretacji wyników przemawiają otrzymane wartości stosunku obu frakcji rybosomowego RNA - 26S RNA (r_1 RNA) i 18S RNA (r_2 RNA), które zawarte były w granicach 1,7-1,8 zarówno dla preparatów RNA otrzymanych z całych korzeni, jak i dla preparatów izolowanych z wierzchołków korzeni. Otrzymane wartości - jak już zostało omówione wcześniej - są zgodne z danymi literaturowymi dotyczącymi czystych niezdegradowanych preparatów RNA [11, 32-34]. W żadnym z badanych okresów rozwoju korzenia nie stwierdziłam zmiany we wzajemnych proporcjach r_1 RNA i r_2 RNA. Również w żadnym z badanych okresów rozwoju wzrost zawartości tRNA nie był połączony z preferencyjnym spadkiem bardziej labilnej frakcji r_1 RNA. Poza tym zastanawiające jest to, że różnice we wzajemnych proporcjach tRNA i rRNA występowały stale w tym samym czasie (powyżej 8 dnia). Znamienność statystyczna tych zmian również świadczy o tym, że nie są one przypadkowe.

W literaturze naukowej można znaleźć doniesienia, w których stwierdzono, że szybkość wzrostu wpływa na zmianę stosunku tRNA/rRNA [1, 16, 17, 23, 29, 38, 39]. W moich badaniach wartość stosunku tRNA/rRNA i zawartość tRNA były również najniższe na początku badanego okresu rozwoju, wtedy gdy tempo wzrostu korzenia, sądząc po przyroście jego suchej masy, było największe. Zmiany suchej masy jednak zarówno w całym korzeniu, jak i w jego wierzchołku nie były skorelowane ze zmianami stosunku tRNA/rRNA (tab. 7). Obliczenie aproksymacji liniowej wartości średnich nie wykazało liniowych zależności dla wymienionych parametrów oraz braku korelacji między zmianami suchej masy a zmianą stosunku tRNA/rRNA (tab. 8). Wyniki te pozwalają sądzić, że szybkość wzrostu korzenia, mierzona przyrostem suchej masy, nie ma wpływu na wzrost stosunku tRNA/rRNA. W związku z tym można przypuszczać, że wzrost zawartości tRNA oraz wielkości stosunku tRNA/rRNA w moich badaniach może być częściowo spowodowany stopniowym różni-

cowaniem się komórek merystematycznych wierzchołka korzenia w miarę rozwoju. W licznych pracach stwierdzono, że wraz z rozwojem i różnicowaniem się komórek zmienia się również populacja tRNA [19, 21, 40]. Badania te nasunęły przypuszczenie, że tRNA może odgrywać rolę substancji regulującej metabolizm różnicowania komórkowego na poziomie translacji [2, 3, 24, 25, 27, 40, 41, 42]. Do wyłącznie takiej interpretacji moich wyników należy jednak podchodzić z dużą ostrożnością, gdyż w całym korzeniu stwierdzono rozbieżności w istotności zaobserwowanych zmian w zależności od stosowanej metody frakcjonowania RNA [tab. 5]. W badaniach nad okresem półtrwania tRNA w wierzchołku kukurydzy Klemm i Klämbt [13] stwierdzili, że okres półtrwania tRNA zwiększa się wraz z rozwojem korzenia. W 10-mm wierzchołkach 6-dniowych korzeni kukurydzy był on dłuższy niż w wierzchołkach korzeni młodszych. Ich zdaniem zmiany te spowodowane są sukcesywnym różnicowaniem się komórek merystematycznych wierzchołka korzenia w miarę rozwoju. Swoje badania wspomniani autorzy przeprowadzili na 10-mm wierzchołku korzenia. Podobny fragment o tej samej długości używałam w niniejszej pracy. Wydaje się jednak, że konieczne jest potwierdzenie tych wyników na bardziej jednorodnym pod względem morfologicznym materiale, np. na mniejszym fragmencie, zawierającym wyłącznie komórki merystematyczne, gdyż komórki wierzchołka korzenia są bardzo różne w swoim stopniu zróżnicowania i aktywności metabolicznej. Stwarza to wiele trudności w podobnych badaniach nad roślinami wyższymi. Dlatego dokładniejsze poznanie przyczyn powodujących wspomniane zmiany we względnych proporcjach tRNA i rRNA oraz stosunku tRNA/rRNA wymaga dalszych bardziej szczegółowych badań popartych analizą cytologiczną.

LITERATURA

- [1] Alberghina F. A. M., Sturani E., 1975, J. Biol. Chem., 250, 4381.
- [2] Ames B. N., Hartman P. E., 1963, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 28, 349.

- [3] Andron L. A., Strehler B. L., 1973, Mech. Age. Dev., 2, 97.
- [4] Barker G. R., Bray C. M., Walter T., 1974, Biochem. J., 142, 211.
- [5] Birmingham B. C., McLachlan G. A., 1972, Plant Physiol., 49, 371.
- [6] Click R. E., Tint B. L., 1967, J. Mol. Biol., 25, 111.
- [7] Dirheimer G., Weil J. H., Ebel J. R., 1962, Compt. Rend. Acad. Sci., 225, 2312.
- [8] Dove L. D., 1973, Phytochemistry, 12, 2561.
- [9] Georgiev G. P., 1959, Biochimija, 24, 472.
- [10] Gosh B. N., Głownikowska A., Milikan D. F., 1971, Bull. Acad. Polon. Sci., Ser. Sci. Biol., 19, 605.
- [11] Hadjoloov A. A., Venkov P. V., Tsanev R., 1966, Analyt. Biochem., 17, 263.
- [12] Hsiao T. C., 1968, Plant Physiol., 43, 1355.
- [13] Klemen F., Klämbt D., 1974, Physiol. Plant., 31, 186.
- [14] Koleva S. T., 1972, Dokl. Bułg. AN, 25, 121.
- [15] Kotzeva-Chyła A., Tyrawska-Spychałowa D., Halicz B., 1973, Zesz. Nauk. UŁ, S. II, 53, 25.
- [16] Kung H. K., West S. H., 1968, Physiol. Plant., 21, 827.
- [17] Kurland C., Maaloe O., 1962, J. Mol. Biol., 4, 193.
- [18] Lazar G., Farkas G. L., 1970, Acta Biol. Acad. Sci. Hung., 21, 389.
- [19] Legocki A., Wojciechowska K., 1970, Bull. Acad. Polon. Sci., 18, 7.
- [20] Masłowski P., Masłowska H., Wierzbicka M., 1966, Acta Soc. Bot. Polon., 35, 231.
- [21] Mettler J. I., Romani R. J., 1976, Phytochemistry, 15, 25.
- [22] Milman L. S., 1960, Biochimija, 25, 797.
- [23] Niedhardt F., Eidlic L., 1962, Biochim. Biophys. Acta, 68, 380.
- [24] Osborne D. J., Roberts B. E., Payne P. I., Sen S., 1974, Bulletin 12, 805-812, The Royal Society of New Zealand, Wellington.
- [25] Patel V. H., Pillay D. T. N., 1976, Phytochemistry, 15, 401.

- [26] Phillips D. R., Fletcher R. A., 1969, *Physiol. Plant.*, 22, 764.
- [27] Pilet P. E., 1972, *Symp. Biol. Hungarica*, Vol. 13, Budapest, 313.
- [28] Sahulka J., 1971, *Biol. Plant.*, 13, 243.
- [29] Satouchi K., Mori T., Matsushita S., 1973, *Agr. Biol. Chem.*, 37, 175.
- [30] Skijod A. C., Jaurez H., Hedgecoth C., 1973, *J. Bacteriol.*, 115, 177.
- [31] Spencer P. W., Titus J. S., 1972, *Plant Physiol.*, 49, 746.
- [32] Spirin A. S., 1969, *Eur. J. Biochem.*, 10, 20.
- [33] Spirin A. S., Gavrilova L. P., 1969, *The ribosome*, 1-161, Springer-Verlag, Viena.
- [34] Trapy G., Esnault R., Zuily-Fodil Y., 1974, *Compt. Rend. Acad. Sci., Ser. D*, 279, 1785.
- [35] Tsanev R., 1965, *Biochimija*, 30, 124.
- [36] Tsanev R., 1965, *Biochim. Biophys. Acta*, 103, 374.
- [37] Tsanev R., Markov G., Dessev G., 1966, *Biochem. J.*, 100, 204.
- [38] Vanderhoeft L. N., Key J. L., 1970, *Plant Physiol.*, 46, 294.
- [39] Vanderhoeft L. N., Key J. L., 1971, *Biochim. Biophys. Acta*, 240, 62.
- [40] Vold S. E., Sypherd P. S., 1968, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 59, 453.
- [41] Weiss J. E., Kelmers A. D., 1967, *Biochemistry*, 6, 2507.
- [42] White B. N., Tener G. M., Holden J., Susuki D. T., 1973, *Develop. Biol.*, 74, 635.
- [43] Yatsu L. I., Jacks T. J., 1972, *Plant Physiol.*, 49, 937.

Zakład Biofizyki
Instytut Biochemii i Biofizyki UŁ

Aneta Koceva-Chyła

THE INVESTIGATION OF THE RNA LEVEL DURING GERMINATION
AND GROWTH OF THE CORN ROOT (*ZEa MAYS* L.)

IV. THE RATIO OF THE DIFFERENT KINDS OF RNA
IN THE WHOLE ROOT AND IN THE ROOT TIP

It has been found that during the 14 days period of germination and growth of a corn plant the rate of the increment of the rRNA and tRNA content in the whole root is equal, and the proportion between them does not change. The proportion of the two fractions of the ribosomal RNA - r_1 RNA (26S) and r_2 RNA (18S) do not change in the whole root as well as in the root tip. The proportion of rRNA and tRNA in the root tip changed together with the ratio of tRNA/rRNA. The changes appear most apparently by the end of the test time that is between the 10 and 14 day and they are statistically significant in relation to the control root tip (two days old). The observed increase of the ratio tRNA/rRNA in the root tip is not correlated with the changes of the dry mass.