

Synthese von DNA im Gammapflänzchen von Weizen

DNA-synthesis in Gamma-plantlets of Wheat

Hartmut Kern

Institut für Botanik und Mikrobiologie,
Kernforschungsanlage Jülich

(Z. Naturforsch. 30 c, 300–301 [1975]; eingegangen
am 2. Dezember 1974)

Wheat, DNA-synthesis, Irradiation

Plants, arising from irradiated (300 kR) caryopses of wheat, exhibit a low incorporation of [³H]thymidine into the DNA, which, as shown by sedimentation on sucrose gradients, does not indicate tendencies of normalization.

Unter Gammapflänzchen versteht man Keimpflanzen, die aus Saatgut hervorgehen, das im trockenen Zustand hohen Dosen ionisierender Strahlung (γ - oder Röntgenstrahlen) ausgesetzt wurde. Durch die Bestrahlung, die 500 kR und mehr betragen kann, wird die DNA-Synthese fast völlig gehemmt¹, da sich die embryonalen Zellen ausdifferenzieren und nur noch wenige Mitosen ablaufen². Gammapflänzchen sind zum Wachstum befähigt, das ausschließlich durch Zellstreckung zustandekommt. Seit Haber und Luippold³ diesen Beweis geführt haben, finden Gammapflänzchen, vorwiegend von Weizen, häufig Verwendung für spezielle physiologische Fragestellungen^{1, 3–7}. Es gilt als erwiesen, daß eine auffallende Ähnlichkeit hinsichtlich stoffwechselphysiologischer Vorgänge zwischen normalen Pflanzen und Gammapflänzchen besteht⁷. Unter weitgehender Ausschaltung von Prozessen, die mit DNA-Synthese und Mitose verknüpft sind, bieten daher diese Pflänzchen u. a. die Möglichkeit, eine kausale Beziehung zwischen den durch Phytohormone bedingten Effekten (Zellstreckung u. a.) und Ereignissen auf der Basis von Transkription und Translation herzustellen.

In eigenen Arbeiten, die sich mit der durch Gibberellinsäure bewirkten Zellstreckung in den Coleoptilen von Gammapflänzchen aus Weizen (*Triticum aestivum*) beschäftigen, stellte sich u. a. die Frage, wieweit eine Bestrahlung trockener Weizenkaryoppen mit 300 kR einer Röntgenquelle in den entsprechenden Keimlingen noch eine DNA-Synthese zuläßt² und ob in Abhängigkeit von der Keimdauer wieder eine Normalisierung (Repair) der DNA erfolgt. Zu diesem Zweck wurden die Karyoppen nach erfolgter Bestrahlung einer Oberflächensterilisation mit einer Lösung von Calciumhypochlorit unterworfen und die Sterilität während der Keimung durch

Sonderdruckanforderungen an H. Kern, D-5170 Jülich,
Institut für Botanik und Mikrobiologie, Postfach 365.

zwischengeschaltete Behandlungen mit einem Gemisch verschiedener Antibiotica aufrechterhalten⁸. Nach verschiedenen Keimzeiten im GM-Medium⁹ wurden die Embryonen abpräpariert und anschließend 16 h im gleichen Medium in Gegenwart von [³H]Thymidin (Methyl-[³H]Thymidin, 5000 mCi/mmol) bei 14 μ Ci/ml und 25 °C inkubiert. Beginnend bei einer Keimdauer von 24 h bis 96 h wurden entsprechende Einbauversuche unternommen. In den hier beschriebenen Experimenten erfolgte die Extraktion von DNA nach der Methode von Kirby¹⁰, wobei ribosomale RNA durch Kaliumacetat ausgefällt, die DNA mit einem Gemisch von Ribonuclease A und T₁ behandelt und nach Phenolausschüttelung mit Äthanol ausgefällt wurde. Die jeweiligen DNA-Präparate wurden im neutralen Saccharosegradierten (5–25% linear) 4 h bei 35000 UpM im SW41-Rotor (Beckman) und +4 °C sedimentiert und dabei die Gradienten maximal mit 150 μ g DNA beschickt. Die Verteilung der DNA im Gradienten erfolgte durch Messung der UV-Absorption (Durchflußzelle) im aufsteigenden Verfahren. Die Radioaktivität wurde in 0,27 ml-Fraktionen nach Fällung mit Trichloressigsäure und Filtration durch Millipore-Filter in einem Flüssigkeitsscintillations-Spektrometer bestimmt.

Die in Abb. 1 dargestellten Sedimentationsprofile beziehen sich auf DNA-Präparate aus 64 h alten Keimlingen bestrahlter bzw. 48 h alten Keimpflanzen aus unbestrahlten Karyoppen. Es ist ersichtlich, daß

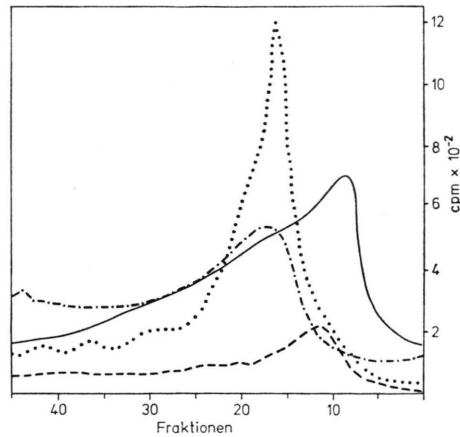


Abb. 1. Sedimentation von DNA im linearen Saccharosegradienten (5–25%). Keimpflanzen aus unbestrahlten Karyoppen wurden nach 48 h und Gammapflänzchen (300 kR) nach 64 h Keimung 16 h in Gegenwart von [³H]Thymidin inkubiert. Die aus ihnen gewonnene DNA wurde 4 h bei 35000 rpm im SW41-Rotor (Beckman) zentrifugiert. DNA aus unbestrahltem Weizen: —, UV-Absorption bei 260 nm; ····, die zugehörige Verteilung von ³H-DNA aus Gammapflänzchen: —, UV-Absorption bei 260 nm; - - -, Verteilung der Radioaktivität. Sedimentation von rechts nach links.



Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition "no derivative works"). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

die DNA aus Gammapflänzchen infolge der strahlenbedingten Fragmentierung eine geringere Sedimentation im Vergleich zur DNA aus unbestrahltem Saatgut aufweist. Da hierbei neutrale Gradienten verwendet wurden, kommen nur Doppelstrangbrüche in der DNA zum Ausdruck. Bei DNA aus unbestrahltem Saatgut koinzidiert die Verteilung der Radioaktivität mit dem Verlauf der UV-Absorption im Gradienten. Aber auch die DNA aus Gammapflänzchen zeigt die gleiche Erscheinung. Offensichtlich reflektiert der Einbau von Thymidin unvollständige Reparationsvorgänge, die jedoch keine DNA-Moleküle mit erhöhter Sedimentation ergeben. Die trotz Bestrahlung noch möglichen Mitosen in vereinzelten Zellen² finden kaum einen Niederschlag bei dieser Analyse. Auch DNA aus älteren Gammapflänzchen ließen ähnliche Verhältnisse erkennen. Demnach können unter unseren Versuchsbedingungen Normalisierungen der DNA-Synthesen weitgehend ausgeschlossen werden. Diese Folgerung steht in Übereinstimmung mit den Ergebnissen anderer Autoren. So konnten kürzlich Schwarz und Haber⁷ nachweisen, daß es in Gammapflänzchen zu einer Entkoppelung von DNA-Synthese und Phosphorylierung von Thymidin zu Thymidinmonophos-

phat durch eine Nucleosid-Phosphotransferase kommt. Diese Feststellung ist von Bedeutung für die Aufklärung der Wirkung von Inhibitoren der DNA-Synthese auf die durch Gibberellinsäure hervorgerufene Zellstreckung. Hierauf soll an anderer Stelle eingegangen werden.

Die Tatsache, daß in Gammapflänzchen nur eine sehr geringe DNA-Synthese stattfindet, hat eine wichtige praktische Bedeutung für Markierungsexperimente. Wenn hierbei durch Applikation radioaktiver Vorstufen der RNA Aussagen über Neusynthesen von RNA im Zusammenhang mit der Einwirkung von Phytohormonen auf Gammapflänzchen gemacht werden sollen, lassen sich bakterielle Kontaminationen der Versuchsansätze leicht erkennen. In solchen Fällen ist ein hoher Einbau des betreffenden Tracers in DNA, 23S und 16S RNA kennzeichnend. Von dieser zusätzlichen Möglichkeit, die Sterilität unserer Einbauversuche zu überprüfen, machten wir Gebrauch. Es sei erwähnt, daß wir nur in Fällen erwiesener Kontaminationen durch Ultrazentrifugation im CsCl-Dichtegradienten eine „Satelliten-DNA“ fanden. In diesem Zusammenhang sei auf eine neuere Arbeit von Sarrouy-Balat *et al.*¹¹ verwiesen.

¹ A. H. Haber, Ann. Rev. Plant Physiol. **19**, 463 [1968].

² K.-H. v. Wangenheim, F. Walther u. H. Kern, Z. Pflanzenzüchtg. **64**, 6 [1970].

³ A. H. Haber u. H. J. Luippold, Amer. Journ. Bot. **47**, 140 [1960].

⁴ A. H. Haber, W. L. Carrier u. D. E. Foard, Amer. Journ. Bot. **48**, 431 [1961].

⁵ A. H. Haber, D. E. Foard u. St. W. Perdue, Plant Physiol. **44**, 463 [1969].

⁶ A. H. Haber u. O. J. Schwarz, Plant Physiol. **49**, 335 [1972].

⁷ O. J. Schwarz u. A. H. Haber, Plant Physiol. **51**, 984 [1973].

⁸ H. Kern, Physiol. Plant., im Druck.

⁹ D. Chen, S. Sarid u. E. Katchalski, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. **60**, 902 [1968].

¹⁰ K. S. Kirby, Biochem. J. **96**, 266 [1965].

¹¹ H. Sarrouy-Balat, M. Delsenay u. R. Julien, Plant Sci. Letters **1**, 287 [1973].