

ROZDZIAŁ XVI. **REAKCJE ROŚLIN  
NA STRES ABIOTYCZNY**

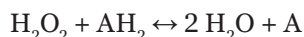


## CZĘŚĆ TEORETYCZNA

Stresy wywołane działaniem metali śladowych na rośliny i zasolenie gleb na obszarach rolniczych stanowią istotny problem w warunkach cywilizacji przemysłowej. W rezultacie działania stresów abiotycznych następują **zmiany w fizjologii i budowie komórek** roślinnych oraz **zahamowanie wzrostu**, a nawet śmierć roślin. **Toksyczne działanie metali śladowych** (Cd, Cr, Cu, Hg, Pb, Zn, Co, Ni, Al) wiąże się z blokowaniem grup funkcyjnych w białkach i zastępowaniem przez metale śladowe właściwych metali w białkach i białkach (np. kofaktorów w białkach enzymatycznych), co prowadzi do ich unieczynnienia. **Stres solny** ogranicza dostępność wody dla rośliny i zaburza gospodarkę jonową. Wspólnym efektem działania stresów abiotycznych na rośliny jest **stres oksydacyjny**, polegający na zachwianiu równowagi między powstawaniem **reaktywnych form tlenu**, do których należą m.in. anionorodnik ponadtlenkowy ( $O_2^-$ ), rodnik hydroksylowy ( $\cdot OH$ ) i nadtlenek wodoru ( $H_2O_2$ ), a ich unieszkodliwianiem (por. rozdział XVII). W reakcjach obronnych roślin na zasolenie i toksyczne działanie metali śladowych uczestniczą **peroksydazy redukujące  $H_2O_2$** .

Peroksydazy (EC 1.11.1.1-14) należą do oksydoreduktaz katalizujących utlenianie nadtlaniem wodoru substratów organicznych lub nieorganicznych. Występują we wszystkich organizmach żywych. Peroksydazy roślin wyższych są glikoproteinami, ich grupę prostetyczną stanowi kofaktor hemowy. Ze względu na pochodzenie i ułożenie aminokwasów w strukturze enzymu peroksydazy roślin wyższych są głównie klasyfikowane jako **peroksydazy klasy III**. Wśród roślin bogatym źródłem tych enzymów są chrzan i ziemniak. Peroksydaza wyizolowana z korzeni chrzanu jest powszechnie wykorzystywana do celów komercyjnych (np. w testach biomedycznych ELISA, w zestawach do oznaczania cholesterolu i glukozy).

Peroksydazy katalizują **utlenianie fenoli**, amin aromatycznych i indoli w obecności  $H_2O_2$  według następującej reakcji:



gdzie  $AH_2$  i A to odpowiednio substrat w stanie zredukowanym i utleniony produkt reakcji.

Produkty reakcji katalizowanej przez peroksydazy są barwne lub wykazują fluorescencję, co stanowi podstawę metod wykrywania aktywności tych enzymów.

Peroksydazy **odgrywają rolę w procesach wzrostu i rozwoju** roślin, np. w kiełkowaniu nasion, dojrzewaniu owoców, opadaniu liści, starzeniu, zabliznianiu ran. Biorą udział w biosyntezie etylenu, utlenianiu kwasu indolilo-3-octowego i lignifikacji ściany komórkowej. Ich aktywność szybko wzrasta u roślin narażonych na działanie stresu abiotycznego (np. zasolenie, zranienie, niska temperatura) oraz po ataku mikroorganizmów patogenicznych i owadów. Dlatego peroksydazy są uznawane za jeden z markerów stresu u roślin. Ich **udział w obronie roślin przed stresem** związany jest z **regulacją stężenia  $H_2O_2$** , który generowany w nadmiarze w warunkach stresu może działać szkodliwie, ale w niższym stężeniu pełni funkcję sygnałową i jest mediatorem wielu reakcji obronnych i ekspresji genów odpowiedzi na stres. Ponadto peroksydazy **uczestniczą w przemianach związków fenolowych** i powstawaniu metabolitów biorących udział w obronie przed stresem.

## CZĘŚĆ PRAKTYCZNA

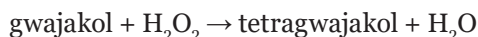
### Cel ćwiczenia

*Określenie aktywności peroksydazy w siewkach pszenicy poddanych działaniu stresu solnego (NaCl) i metali śladowych ( $Cu^{2+}$ ).*

### Zasada metody

Oznaczenie aktywności peroksydazy polega na określeniu w mieszaninie inkubacyjnej zawartości tetragwajakolu powstałego

podczas utleniania gwajakolu (*o*-metoksyfenol) przez peroksydazę w obecności  $H_2O_2$  według reakcji:



Tetragwajakol o czerwono-brunatnej barwie oznacza się przez pomiar absorbancji przy długości fali 470 nm, w temperaturze 25°C. Reakcję przeprowadza się przez 4 minuty ze względu na szybkie wyczerpywanie się  $H_2O_2$ .

### **Materiał**

dwutygodniowe siewki pszenicy uprawiane w warunkach optymalnej wilgotności, temperatury i oświetlenia w doniczkach z ziemią ogrodniczą, potraktowane doglebowo roztworem NaCl o stężeniu 50 mM lub  $CuSO_4$  o stężeniu 500  $\mu$ M; do analizy pobierane są korzenie i liście siewek po 2 dniach od traktowania; materiał kontrolny stanowią te same części roślin uzyskane z roślin nietraktowanych

### **Odczynniki**

50 mM bufor octanowy pH 5,6, 20 mM gwajakol, 60 mM  $H_2O_2$ , 50 mM bufor fosforanowy pH 7,0, bufor do homogenizacji o składzie: 1 M NaCl w 50 mM buforze fosforanowym pH 7,0

### **Sprzęt laboratoryjny**

30 probówek szklanych, pipety (0,1–10  $cm^3$ ), 6 schłodzonych moździerz, probówki wirownicze 10  $cm^3$ , stoper, kuwety do spektrofotometru, wirówka z chłodzeniem, spektrofotometr, waga laboratoryjna

### **Doświadczenie I**

#### ***Oznaczenie aktywności peroksydazy wobec gwajakolu***

#### **I.A. PRZYGOTOWANIE EKSTRAKTU ENZYMATYCZNEGO**

Zważyć po 1 g liści i po 1 g korzeni z roślin kontrolnych oraz traktowanych NaCl i  $CuSO_4$  (6  $\times$  1 g). Korzenie przed ważeniem delikatnie opłukać wodą destylowaną i osuszyć za pomocą bibuły. Każdą próbę homogenizować osobno w schłodzonych moździerzach w 5  $cm^3$  buforu do homogenizacji. Próby odwirować (10 000  $\times$  g, 15 min).

Otrzymany supernatant (ekstrakt enzymatyczny) zlać do 6 próbek umieszczonych w jednym rzędzie w statywie, osad odrzucić.

### I.B. WYKONANIE OZNACZENIA AKTYWNOŚCI PEROKSYDAZY

W 6 próbkach umieszczonych w drugim rzędzie statywu z próbkami z ekstraktem przygotować 10-krotne rozcieńczenie wyjściowych ekstraktów enzymatycznych w 50 mM buforze fosforanowym pH 7,0 i wykorzystać je do oznaczenia aktywności peroksydazy. Przygotować 12 próbek, odpowiednio 6 do oznaczenia prób badanych i 6 do oznaczenia prób odnośnikowych. Oznaczenie przeprowadzić w sposób opisany w tabeli 16.1.

**Tabela 16.1.**

Oznaczenie aktywności peroksydazy wobec gwajakolu

Odczynnik	Dodawane objętości [cm <sup>3</sup> ]	
	Próba badana	Próba odnośnikowa
Ekstrakt enzymatyczny (10-krotnie rozcieńczony)	0,5	0,5
50 mM bufor octanowy pH 5,6	0,5	1,0
20 mM gwajakol	0,5	0,5
60 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0,5	–

1. Próby zamieszać i natychmiast włączyć stoper (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inicjuje reakcję, dodawać na końcu).  
2. Po 4 minutach oznaczyć absorbancję prób przy długości fali 470 nm względem 50 mM buforu octanowego pH 5,6.

Oznaczenie wykonać dwukrotnie dla każdego ekstraktu, a uśrednione wyniki wpisać do tabeli 16.2.

**Tabela 16.2.** Aktywność peroksydazy w siewkach pszenicy traktowanych NaCl i CuSO<sub>4</sub>

Wariant		Wartość absorbancji próby badanej [A <sub>pb</sub> min <sup>-1</sup> ]	Wartość absorbancji próby odnośnikowej [A <sub>odn</sub> min <sup>-1</sup> ]	Aktywność obliczona ze wzoru [μmol min <sup>-1</sup> cm <sup>-3</sup> ]	Aktywność peroksydazy [U g <sup>-1</sup> ś. m.]
Kontrola	liść				
	korzeń				
NaCl	liść				
	korzeń				
CuSO <sub>4</sub>	liść				
	korzeń				

### Opracowanie wyników

Aktywność peroksydazy określić w jednostkach [U] w przeliczeniu na 1 g świeżej masy liści lub korzeni. Za jednostkę aktywności peroksydazy przyjąć taką ilość katalityczną enzymu, która w ciągu 1 minuty (w powyżej opisanych warunkach oznaczenia) powoduje powstanie 1  $\mu\text{mola}$  tetragwajakolu. Ilość tetragwajakolu można obliczyć na podstawie wartości milimolowego współczynnika absorpcji dla tetragwajakolu ( $\varepsilon = 26,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

Aktywność peroksydazy [ $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ cm}^{-3}$ ] obliczyć, korzystając ze wzoru:

$$\frac{(A_{pb} - A_{odn}) \times V \times R}{\varepsilon \times i \times V_s}$$

gdzie:

$A_{pb}$  – absorbanca próby badanej [ $\text{A min}^{-1}$ ],

$A_{odn}$  – absorbanca próby odnośnikowej [ $\text{A min}^{-1}$ ],

$V$  – objętość całkowita ( $2 \text{ cm}^3$ ),

$R$  – rozcieńczenie ( $10\times$ ),

$\varepsilon$  – milimolowy współczynnik absorpcji dla tetragwajakolu ( $\varepsilon = 26,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ),

$i$  – grubość warstwy roztworu ( $1 \text{ cm}$ ),

$V_s$  – objętość rozcieńczonego supernatantu do oznaczenia ( $0,5 \text{ cm}^3$ ).

Aktywność peroksydazy podać w przeliczeniu na 1 g tkanki [ $\text{U g}^{-1} \text{ ś. m.}$ ]

Zapisać wnioski dotyczące:

- 1) zmiany aktywności peroksydazy pod wpływem abiotycznych czynników stresowych,
- 2) porównania reakcji na stres abiotyczny w zależności od organu rośliny i czynnika stresowego.

## Literatura

Bartosz G., *Druga twarz tlenu. Wolne rodniki w przyrodzie*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2006.

Kopcewicz J., Lewak S. (red.), *Fizjologia roślin*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2019.

Kozłowska M. (red.), *Fizjologia roślin. Od teorii do nauk stosowanych*, PWRiL, Warszawa 2007.

Woźny A., Przybył K. (red.), *Komórki roślinne w warunkach stresu*, t. 1: *Komórki in vivo*, Wydawnictwo UAM, Poznań 2004.