

AKTYWNOŚĆ PEROKSYDAZY I OKSYDAZY POLIFENOLOWEJ W CHŁODZONYCH I NIECHŁODZONYCH CEBULACH TULIPANÓW¹

Ludwika Kawa-Miszczak¹, Elżbieta Węgrzynowicz-Lesiak¹, Marcin Horbowicz²,
Marian Saniewski¹

¹ Instytut Sadownictwa i Kwiaciarstwa w Skierniewicach

² Instytut Warzywnictwa im. E. Chroboczka w Skierniewicach

Wstęp

W czasie chłodzenia cebul tulipanów zachodzą przemiany metaboliczne prowadzące do ustępowania spoczynku. Jak dotąd żadna z wielu badanych przemian nie wykazała bezpośredniego związku z działaniem niskiej temperatury lub też uzyskane wyniki nie były zadowalające. Brak jest chemicznych lub biochemicznych wskaźników, że proces ustępowania spoczynku został zakończony. Dotychczas opublikowane badania dotyczyły: zmian zawartości poliamin [KOLLÖFFEL i in. 1992], zawartości wolnych aminokwasów w pylnikach [ŁUKASZEWSKA i in. 1989; TONECKI, GORIN 1990; LAMBRECHTS i in. 1992a], zawartości skrobi i aktywności α -amylazy [GORIN, HEIDEMA 1985], zawartości chalkonów i aktywności syntazy chalkonowej [GORIN i in. 1990; FRANSSEN, KERSTEN 1992], zawartości węglowodanów [LAMBRECHTS i in. 1994], aktywności i form inwertazy [LAMBRECHTS, KOLLÖFFEL 1993; BALK, DE BOER 1999] oraz redystrybucji organicznych związków węgla i azotu [OHYAMA i in. 1988; LAMBRECHTS i in. 1992b].

W ostatnich latach podjęto prace nad rolą flawonoidów w ustępowaniu spoczynku tulipanów [SANIEWSKI, HORBOWICZ 2005]. Badano również wpływ temperatury przechowywania cebul na zawartość związków fenolowych, peroksydację kwasów tłuszczowych i aktywność enzymów związanych z tymi procesami.

Celem niniejszych badań było porównanie zmian aktywności peroksydazy i oksydazy polifenolowej w chłodzonych i niechłodzonych cebulach tulipanów.

Materiał i metody

Cebule tulipanów (*Tulipa gesneriana* L.) 'Apeldoorn' o obwodzie 10–12 cm przechowywano w 17–20°C do połowy października. Następnie część cebul pozos-

¹ Badania były finansowane przez KBN, Grant Nr 6 P06A 011 21.

tawiono w 17°C (cebule niechłodzone), a pozostałe chłodzono „na sucho” w 5°C (cebule chłodzone). Bezpośrednio przed rozpoczęciem przechowywania cebul oraz po 3, 6, 9 i 12 tygodniach trwania tego procesu pobierano po 30 cebul do analiz biochemicznych. Z cebul izolowano liście, łodygi, pręciki i piętki, a otrzymany materiał roślinny poddano liofilizacji.

Aktywność peroksydazy i oksydazy polifenolowej oznaczano metodami spektrofotometrycznymi opisanymi przez SANIEWSKIEGO i in. [1992]. Substratem w pomiarach aktywności peroksydazy był gwajakol. Stopień utleniania gwajakolu przez H_2O_2 określano jako przyrost absorbancji przy długości fali 460 nm. Pomiar absorbancji wykonywano co 30 sekund w ciągu 5 minut. Katechol i kwas chlorogenowy służyły jako substraty do oznaczania aktywności oksydazy polifenolowej. Pomiar przyrostu absorbancji wykonywano przy długości fali 480 nm, gdy substratem był katechol lub 430 nm, kiedy substratem był kwas chlorogenowy. W obu przypadkach pomiary wykonywano przez 15 minut w odstępach minutowych. Aktywności enzymów były tangensami kąta nachylenia prostej regresji, wyrażonymi w jednostkach aktywności $\cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ suchej masy. Analizy wykonano w 5–7 powtórzeniach, a prezentowane wyniki są średnimi z powtórzeń, \pm odchylenie standardowe.

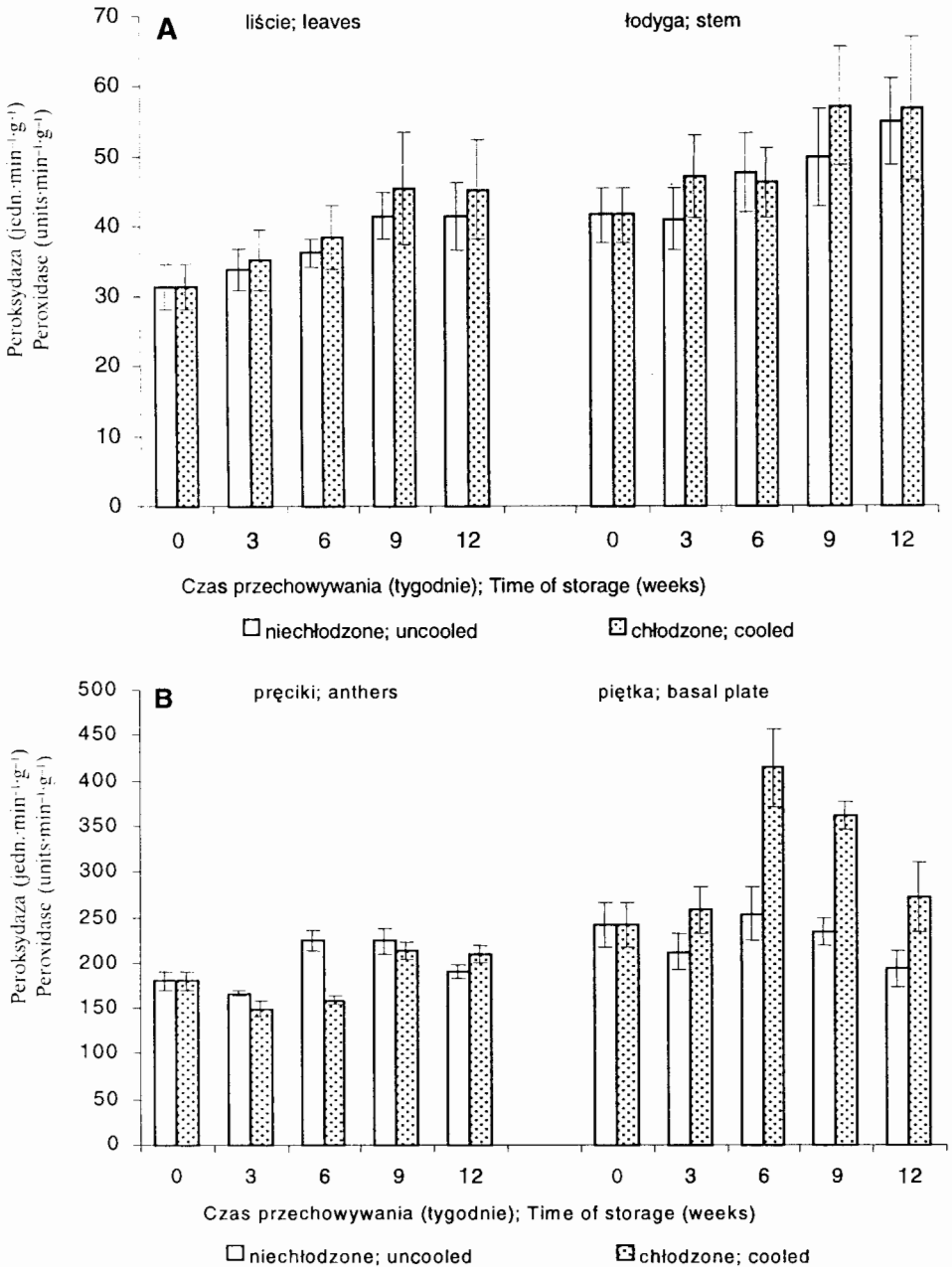
Wyniki i dyskusja

Podczas przechowywania cebul tulipanów w 17°C i chłodzenia w 5°C następował wzrost aktywności peroksydazy we wszystkich badanych organach. Najwyższe aktywności tego enzymu stwierdzono w piętkach, nieco niższe w pręcikach oraz kilkakrotnie niższe w liściach i łodydze (rys. 1A, B). Po 6 tygodniach przechowywania, w piętkach izolowanych z cebul chłodzonych aktywność peroksydazy była wyższa niż w piętkach cebul niechłodzonych (rys. 1B). Natomiast w liściach, łodydze i pręcikach temperatura przechowywania cebul nie miała wpływu na aktywność tego enzymu (rys. 1A, B).

W trakcie przechowywania cebul w obu temperaturach następował stopniowy wzrost aktywności oksydazy polifenolowej w pręcikach, łodydze i liściach (rys. 2A, B, C). W wymienionych organach aktywność oksydazy polifenolowej była najwyższa po 12 tygodniach, ale temperatura przechowywania cebul nie miała istotnego wpływu na aktywność tego enzymu. Natomiast w piętkach izolowanych z cebul chłodzonych aktywność oksydazy polifenolowej była wyższa niż w piętkach cebul niechłodzonych (rys. 2D).

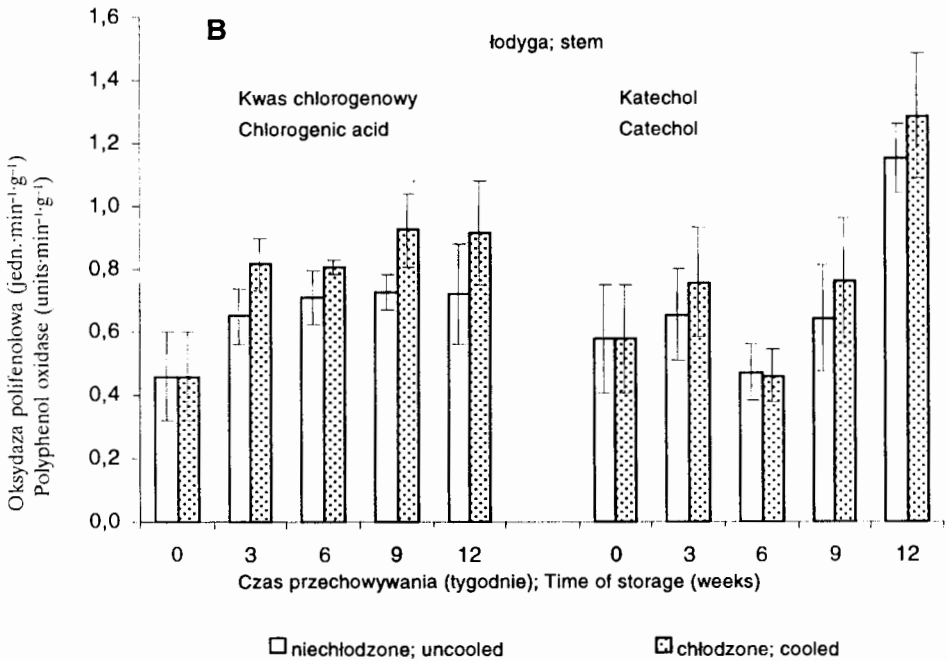
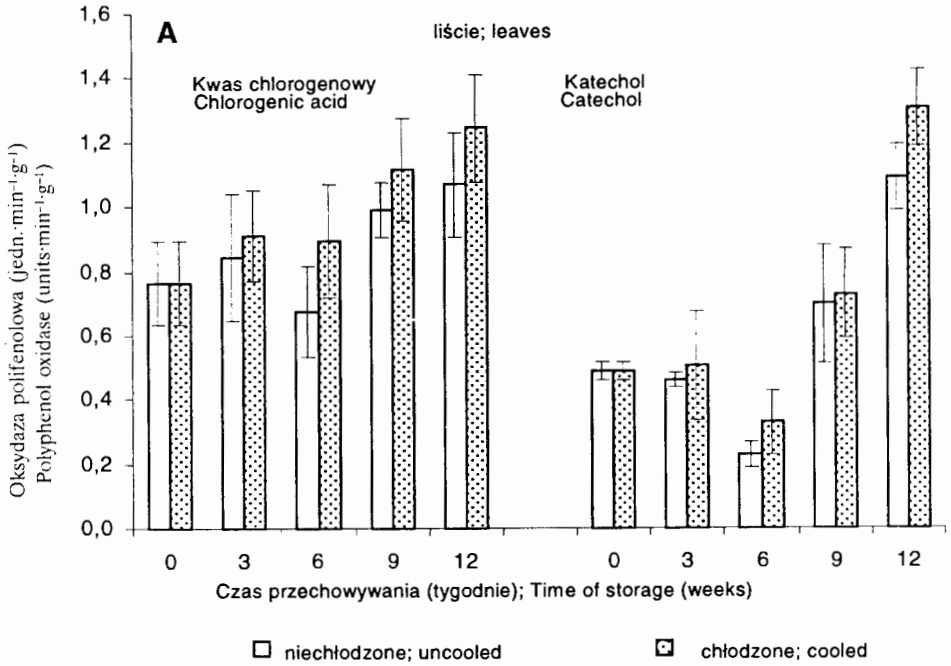
We wcześniejszych przeprowadzonych badaniach wykazały wzrost poziomu endogennych związków fenolowych w liściach z cebul chłodzonych, natomiast poziom tych związków w liściach z cebul niechłodzonych nie ulegał istotnym zmianom. Dla porównania, sumaryczne zawartości fenoli w pręcikach z cebul przechowywanych zarówno w 5°C, jak i 17°C były zbliżone i nie ulegały większym zmianom (dane niepublikowane).

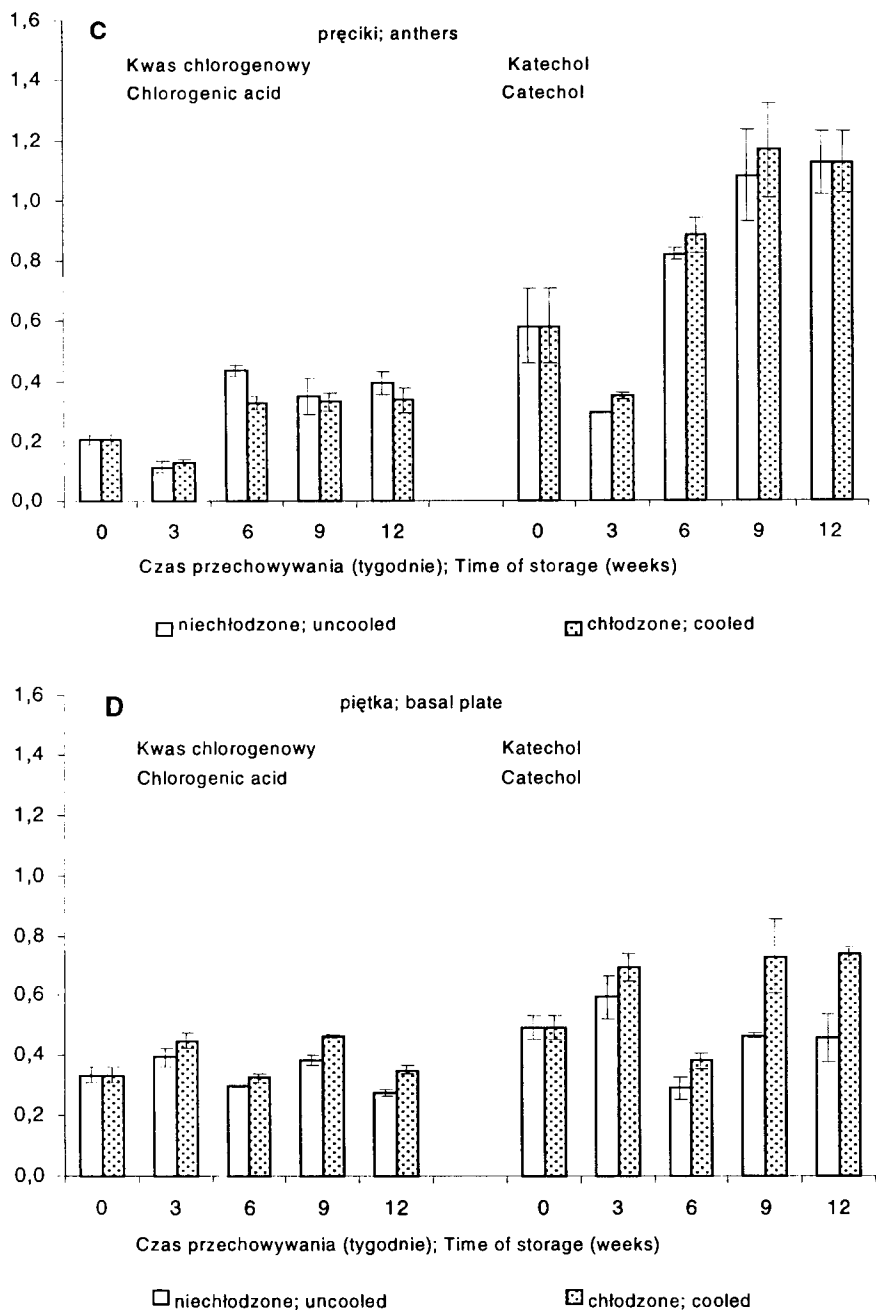
W innych naszych badaniach, porównując proces tworzenia nadtlennków (peroksydację) nienasyconych kwasów tłuszczowych w cebulach przechowywanych w 5°C i 17°C, nie stwierdzono większych różnic w poziomie dwualdehydu kwasu malonowego (MDA) między cebulami przechowywanymi w obu warunkach temperaturowych, co sugeruje, że także peroksydacja kwasów tłuszczowych nie jest związana z ustępowaniem spoczynku cebul [WĘGRZYNOWICZ-LEŚIAK i in. 2005].



Rys. 1. Aktywność peroksydazy w liściach i łodydze (A) oraz w pręcikach i piętce (B) izolowanych z cebul tulipana przechowywanych w 17°C (niechłodzone) i 5°C (chłodzone). Wartości średnie \pm SD

Fig. 1. Peroxidase activity in leaves and stem (A) and in anthers and basal plate (B) isolated from tulip bulbs stored in 17°C (uncooled) and 5°C (cooled). Means \pm SD





Rys. 2. Aktywność oksydazy polifenolowej w liściach (A), łodydze (B), pręcikach (C) i piętce (D) izolowanych z cebul tulipana przechowywanych w temperaturze 17°C (niechłodzone) i 5°C (chłodzone). Wartości średnie \pm SD

Fig. 2. Polyphenol oxidase activity in leaves (A), stem (B), anthers (C) and basal plate (D) isolated from tulip bulbs stored in 17°C (uncooled) and 5°C (cooled). Means \pm SD

Wydaje się, że parametrem informującym o stopniu ustąpienia spoczynku w cebulach tulipanów może być zawartość flawonoidów [SANIEWSKI, HORBOWICZ 2005]. Stwierdzono, że w czasie przechowywania cebul w 5°C znacznie wzrasta zawartość kwercetyny w liściach (w mniejszym stopniu zawartość kemferolu), w porównaniu z liśćmi z cebul przechowywanych w 17°C. Natomiast w przypadku pręcików z cebul przechowywanych w 17°C poziom apigeniny i kwercetyny był wyższy, zaś kemferolu niższy, w porównaniu do zawartości tych flawonoidów w pręcikach cebul chłodzonych [SANIEWSKI, HORBOWICZ 2005].

Flawonoidy stanowią kilkutyśieczną klasę związków polifenolowych występującą w świecie roślin [WASHINA 2000]. Spośród polifenoli, flawonole i ich glikozydy występują w szczególnie dużych ilościach w wielu roślinach. Najbardziej rozpowszechnionymi flawonolami w roślinach są kwercetyna i kemferol oraz ich glikozydy [HORBOWICZ 2000]. Flawonoidy pełnią ważną rolę we wzroście i rozwoju roślin, m.in. poprzez ich wpływ na transport auksyn [JACOBS, RUBERY 1988; DAKORA 1995; MURPHY i in. 2000]. Ze względu na silne właściwości antyoksydacyjne flawonoidy mogą hamować peroksydację kwasów tłuszczowych [TAKAHAMA 1985; ALCARAZ i in. 1986; TOREL i in. 1986].

Zarówno związki fenolowe, jak też flawonoidy mogą być substratami dla enzymów utleniających, takich jak peroksydaza lub oksydaza polifenolowa [TAKAHAMA, ONIKI 2000], dlatego też niniejsze badania są uzupełnieniem wcześniejszych naszych prac. Wydaje się, że przyrost aktywności enzymów oksydacyjnych podczas przechowywania cebul tulipanów jest dodatnio skorelowany ze wzrostem sumarycznych zawartości związków fenolowych, jednakże zależność taka nie występuje w przypadku poszczególnych flawonoidów.

Wniosek

Na podstawie aktywności peroksydazy i oksydazy polifenolowej w liściach, łodydze, pręcikach i piętce nie można wnioskować o stopniu ustąpienia spoczynku cebul tulipanów.

Literatura

- ALCARAZ M.J., FERRANDIZ M.L., VILLAR A. 1986. *Flavonoid inhibition of soybean lipoxygenase*. *Pharmacazie* 41: 299.
- BALK P.A., DE BOER A.D. 1999. *Rapid stalk elongation in tulip (Tulipa gesneriana cv. Apeldoorn) and the combined action of cold-induced invertase and the water-channel protein γ -TIP*. *Planta* 209: 346–354.
- DAKORA F.D. 1995. *Plant flavonoids: Biological molecules for useful exploitation*. *Austr. J. Plant Physiol.* 22: 87–99.
- FRANSEN J.M., KERSTEN C.H. 1992. *Chalcones: a possible parameter to test the cold duration of tulip (Tulipa gesneriana cv. Apeldoorn) bulbs?*. *Acta Hort.* 325: 259–266.
- GORIN N., HEIDEMA F.T. 1985. *Starch content of freeze-dried anthers and α -amylase activity of their extracts as criteria that dry-stored bulbs (Tulipa gesneriana L.) cultivar Apeldoorn have been exposed to 5°C*. *Scientia Hort.* 26: 183–189.

- GORIN N., SUTTFELD R., TONECKI J., FRANSSEN J.M., HAANAPPEL N. 1990. *Histochemical test for presence or absence of chalcones in anthers from bulbs of tulip cv. Apeldoorn precooled at 5°C or kept at 17°C*. Acta Hort. 266: 221–227.
- HORBOWICZ M. 2000. *Występowanie, biosynteza i właściwości biologiczne flawonoli*. Post. Nauk Rol. 2: 3–18.
- IWASHINA T. 2000. *The structure and distribution of the flavonoids in plants*. J. Plant. Res. 113: 287–289.
- JACOBS M., RUBERY P.H. 1988. *Naturally occurring auxin transport regulators*. Science 241: 346–349.
- KOLLÖFFEL C., GEUS J., LAMBRECHTS H. 1992. *Changes in free polyamine contents in tulip bulbs cv. Apeldoorn during dry storage*. Acta Hort. 325: 247–252.
- LAMBRECHTS H., FRANSSEN J.M., KOLLÖFFEL C. 1992a. *The 4-methylene-glutamine:asparagine ratio in the shoot of tulip bulbs cv. Apeldoorn as a criterion for dry storage duration at 5°C*. Scientia Hort. 52: 105–112.
- LAMBRECHTS H., KOLLÖFFEL C. 1993. *Soluble and insoluble invertase activity in elongating Tulipa gesneriana flower stalks*. Physiol. Plant. 89: 830–834.
- LAMBRECHTS H., RAVESTEIN H., KOLLÖFFEL C. 1992b. *Temperature dependent redistribution of organic nitrogen during „dry” storage of tulip bulbs cv. Apeldoorn*. Physiol. Plant. 86: 97–103.
- LAMBRECHTS H., ROOK F., KOLLÖFFEL C. 1994. *Carbohydrate status of tulip bulbs during cold-induced flower stalk elongation and flowering*. Plant Physiol. 104: 515–520.
- ŁUKASZEWSKA A.J., GORIN N., HAANAPPEL N. 1989. *Changes in the contents of four free amino acids in anthers from tulip bulbs cultivar „Apeldoorn” stored at 5°C or 17°C, as criteria related to cold treatment*. Scientia Hort. 38: 269–275.
- MURPHY A., PEER W.A., TAVI L. 2000. *Regulation of auxin transport by aminopeptidases and endogenous flavonoids*. Planta 211: 315–324.
- OHYAMA T., IKARASHI T., BABA A. 1988. *Effect of cold storage treatment for forcing on the C and N metabolism of tulip plants*. Soil Sci. Plant Nutr. 34: 519–533.
- SANIEWSKI M., HORBOWICZ M. 2005. *Changes in endogenous flavonoids level during cold storage of tulip bulbs*. Acta Hort. 669: 245–251.
- SANIEWSKI M., URBANEK H., PUCHALSKI J. 1992. *Wound-induced phenolic metabolism in scales of Hippeastrum x hybr. hort.* Acta Hort. 325: 303–306.
- TAKAHAMA U. 1985. *Inhibition of lipoxygenase-dependent lipid peroxidation by quercetin: mechanism of antioxidative function*. Phytochemistry 24: 1443–1446.
- TAKAHAMA U., ONIKI T. 2000. *Flavonoids and some other phenolics as substrates of peroxidase: physiological significance of the redox reactions*. J. Plant Res. 113: 301–309.
- TONECKI J., GORIN N. 1990. *Further studies on the use of amino acids in anthers from tulip bulbs cv. Apeldoorn as indicators about cold treatment at 5°C*. Scientia Hort. 42: 133–140.
- TOREL J., CILLARD J., CILLARD P. 1986. *Antioxidant activity of flavonoids and reactivity with peroxy radical*. Phytochemistry 25: 383–385.
- WĘGRZYNOWICZ-LESIAK E., KAWA-MISZCZAK L., HORBOWICZ M., SANIEWSKI M. 2005. *Possible involvement of lipid peroxidation in cooled tulip bulbs*. Acta Hort. 669: 233–238.

Słowa kluczowe: peroksydaza, oksydaza polifenolowa, spoczynek, ustępowanie spoczynku, cebule tulipana

Streszczenie

Badano wpływ temperatury przechowywania cebul tulipana na aktywność peroksydazy i oksydazy polifenolowej. Po 6 tygodniach przechowywania, aktywność peroksydazy w piętках izolowanych z cebul chłodzonych (5°C) była wyższa niż w piętках cebul niechłodzonych (17°C). W liściach, łodydze i pręcikach temperatura przechowywania cebul nie miała wpływu na aktywność tego enzymu. W trakcie przechowywania cebul następował stopniowy wzrost aktywności oksydazy polifenolowej w pręcikach, łodydze i liściach, ale temperatura przechowywania nie miała istotnego wpływu na aktywność tego enzymu. Natomiast w piętках izolowanych z cebul chłodzonych aktywność oksydazy polifenolowej była wyższa niż w piętках cebul niechłodzonych.

Na podstawie aktywności peroksydazy i oksydazy polifenolowej w liściach, łodydze, pręcikach i piętce nie można wnioskować o stopniu ustąpienia spoczynku cebul tulipanów.

PEROXIDASE AND POLYPHENOL OXIDASE ACTIVITIES IN COOLED AND UNCOOLED TULIP BULBS

Ludwika Kawa-Miszczak ¹, Elżbieta Węgrzynowicz-Lesiak ¹, Marcin Horbowicz ²,
Marian Saniewski ¹

¹ Research Institute of Pomology and Floriculture, Skierniewice

² Research Institute of Vegetable Crops, Skierniewice

Kcy words: peroxidase, polyphenol oxidase, dormancy, dormancy release, tulip bulbs

Summary

The effect of tulip bulbs storage temperature on peroxidase and polyphenol oxidase activities was studied. After 6 weeks of storage, peroxidase activity was higher in basal plate from cooled (5°C) bulbs in comparison to uncooled bulbs (17°C). The temperature of bulb storage had no effect on this activity in leaves, stem and anthers. During bulb storage polyphenol oxidase activity increased gradually in anthers, stem and leaves with no effect of temperature on this enzyme activity. Polyphenol oxidase activity in basal plates from cooled bulbs was higher than from uncooled bulbs.

It seems that it is not possible to infer about the level of tulip bulb dormancy release from assays of peroxidase and polyphenol oxidase activities in leaves, stem, anthers and basal plate.

Dr Ludwika **Kawa-Miszczak**
Instytut Sadownictwa i Kwiaciarnictwa
ul. Pomologiczna 18
96-100 SKIERNIEWICE
e-mail: lmiszcz@insad.pl