

WPLYW RÓŻNYCH DAWEK METALI CIĘŻKICH NA AKTYWNOŚĆ ENZYMÓW STRESU OKSYDACYJNEGO ORAZ PARAMETRY FIZJOLOGICZNE PSZENICY JAREJ

CZEŚĆ II

WPLYW OŁOWIU

*Katarzyna Malinowska*¹, *Beata Smolik*²

¹ Katedra Fizjologii Roślin, Akademia Rolnicza w Szczecinie

² Katedra Biochemii, Akademia Rolnicza w Szczecinie

Wstęp

Nadmierna kumulacja metali ciężkich w środowisku glebowym zakłóca procesy biochemiczne i fizjologiczne roślin. Ołów, obok kadmu i rtęci, jest pierwiastkiem niewykorzystywanym w metabolizmie komórkowym. Ołów nawet w bardzo małych ilościach jest toksyczny, powodując m.in. zaburzenia w procesie asymilacji CO₂, czy gospodarce wodnej roślin [PACHA, GALIMSKA-STYPA 1984; WOŻNY, KRZESŁOWSKA 1994; WOŻNY 1995; KABATA-PENDIAS, PENDIAS 1999]. Metale ciężkie indukują także powstawanie reaktywnych form tlenu [GROPPA i in. 2001; WANG i in. 2004]. Aby uniknąć stresu oksydacyjnego rośliny rozwinęły system antyoksydacyjny, odgrywający dodatkową rolę w mechanizmach detoksyfikacji metali ciężkich [WÓJCIK, TUKENDORF 1995; ZENK 1996; PANDA i in. 2003]. Do typowych reakcji roślin w celu neutralizacji nadmiaru reaktywnych form tlenu należy aktywacja enzymów antyoksydacyjnych, tj. katalazy, peroksydazy oraz indukcja antyoksydantów nieenzymatycznych, m.in. barwników asymilacyjnych [MOSTOWSKA, GWÓZDŹ 1995].

Celem pracy było określenie aktywności katalazy i peroksydazy w roślinie oraz zbadanie reakcji fizjologicznej pszenicy rosnącej w glebie z dodatkiem różnych ilości soli ołowiu.

Materiał i metody

Doświadczenie wazonowe przeprowadzono w 2005 roku. Rośliną testową była pszenica jara odmiany Alba. W doświadczeniu użyto gleby o składzie gliny lekkiej pylastej i zawartości węgla organicznego 1,2%, zaliczanej do 2 kompleksu pszennego dobrego. Ołów wprowadzony został do gleby w formie wodnego roztworu soli Pb(NO₃)₂, a nawozy w postaci wodnych roztworów zgodnie z zaleceniami dla gleb kompleksu 2 pszennego dobrego. Schemat doświadczenia przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1; Table 1

Schemat doświadczenia
Scheme of experiment

Kombinacja w doświadczeniu Combination in experiment	Stężenie $Pb(NO_3)_2$ ($mmol \cdot dm^{-3}$) $Pb(NO_3)_2$ concentration ($mmol \cdot dm^{-3}$)	mg $Pb^{2+} \cdot kg^{-1}$ gleby mg $Pb^{2+} \cdot kg^{-1}$ soil	Nawożenie mineralne Mineral fertilization
1 – kontrola; control	–	–	–
2 – NPK	–	–	115 kg N·ha ⁻¹ , 50 kg P ₂ O ₅ ·ha ⁻¹ , 30 kg K ₂ O·ha ⁻¹
3 – 1 stężenie Pb + NPK 1 concentration Pb + NPK	0,05	10,35	115 kg N·ha ⁻¹ , 50 kg P ₂ O ₅ ·ha ⁻¹ , 30 kg K ₂ O·ha ⁻¹
4 – 2 stężenie Pb + NPK 2 concentration Pb + NPK	0,50	103,5	115 kg N·ha ⁻¹ , 50 kg P ₂ O ₅ ·ha ⁻¹ , 30 kg K ₂ O·ha ⁻¹
5 – 3 stężenie Pb + NPK 3 concentration Pb + NPK	5,00	1035	115 kg N·ha ⁻¹ , 50 kg P ₂ O ₅ ·ha ⁻¹ , 30 kg K ₂ O·ha ⁻¹
6 – 1 stężenie; 1 concentration	0,05	10,35	–
7 – 2 stężenie; 2 concentration	0,50	103,5	–
8 – 3 stężenie; 3 concentration	5,00	1035	–

Założenie, warunki doświadczenia oraz metodykę badań podano w części I pracy.

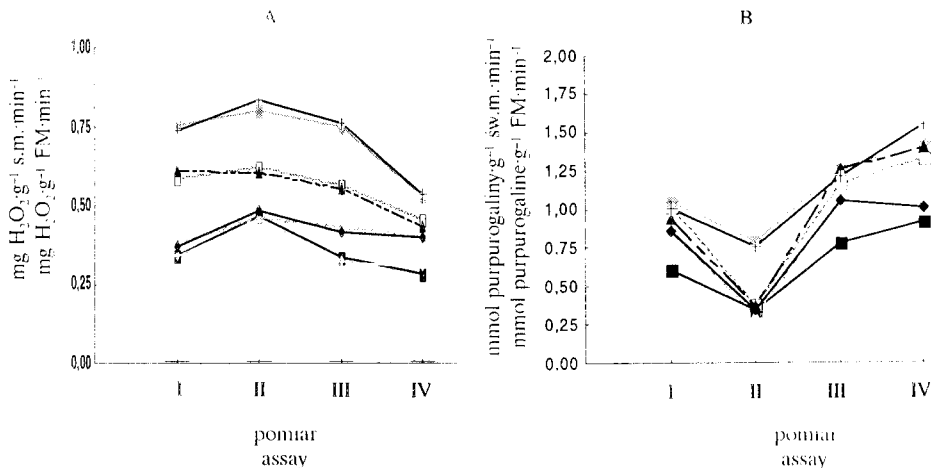
Wyniki i dyskusja

Wyniki badań wskazują, że wprowadzenie do gleby soli ołowiu wpłynęło na zmianę badanych parametrów biochemicznych i fizjologicznych (rys. 1–2, tab. 2).

Aktywność katalazy w glebie z dodatkiem nawożenia mineralnego nieznacznie zmieniła się w porównaniu do aktywności enzymu w glebie kontrolnej. Natomiast nawożenie NPK spowodowało wzrost aktywności peroksydazy. Stymulujący wpływ nawożenia na aktywność peroksydazy wykazali również BICZAK i in. [1999] oraz MIODUSZEWSKA [2001].

Wszystkie zastosowane dawki ołowiu (10,35–1035 mg Pb^{2+}) spowodowały wzrost aktywności badanych enzymów. W miarę wzrostu stężenia soli ołowiu w glebie, aktywność enzymów zwiększała się. Największą stymulację enzymu zaobserwowano przy III pomiarze (5 tydzień po wysiewie nasion pszenicy), aktywność katalazy wynosiła wówczas 0,74 mg $H_2O_2 \cdot g^{-1}$ św. masy $\cdot min^{-1}$ (co stanowiło wzrost o 25% względem aktywności enzymu w pszenicy rosnącej w glebie kontrolnej). Podobne tendencje odnotowano w przypadku aktywności peroksydazy. We wszystkich terminach pomiarów największą aktywność tego enzymu zanotowano w pszenicy rosnącej w obecności 5 mmol $Pb(NO_3)_2 \cdot dm^{-3}$. Podwyższony poziom aktywności enzymów wchodzących w skład systemu antyoksydacyjnego (katalazy i peroksydazy) w roślinach rosnących w glebach z różnymi dawkami soli ołowiu (0,05–5 mmol $Pb(NO_3)_2 \cdot dm^{-3}$) jest sygnałem pojawienia się stresu oksydacyjnego. Wyraźny wzrost aktywności katalazy i dysmutazy ponadtlenkowej u grochu rosnącego w glebie z 0,5–1 mmol $Pb(NO_3)_2 \cdot dm^{-3}$ wykazano w innych badaniach [MAŁECKA i in. 2001]. VERMA, DUBEY [2003] podczas dwudziestodniowego doświadcze-

nia z ołowiem (0,5 i 1 mmol Pb(NO₃)₂·dm⁻³) stwierdzili podwyższenie w ryżu aktywności antyoksydacyjnych enzymów: dysmutazy ponadtlenkowej, peroksydazy gwajakolowej, peroksydazy askorbinianowej i reduktazy glutationowej, natomiast obniżenie aktywności katalazy przy najwyższym stężeniu ołowiu.



- +— NIR_{0,05}; LSD_{0,05}
- kontrola; control
- NPK
- 1 stężenie + NPK; concentration 1 + NPK
- 2 stężenie + NPK; concentration 2 + NPK
- 3 stężenie + NPK; concentration 3 + NPK
- 1 stężenie; concentration 1
- ▲— 2 stężenie; concentration 2
- 3 stężenie; concentration 3

stężenie 1, 2, 3; concentration 1, 2, 3 – objaśnienia jak w tab. 1; explanations see Table 1

pomiar; assay: I pierwszy tydzień; 1st week
 II drugi tydzień; 2nd week
 III trzeci tydzień; 3rd week
 IV czwarty tydzień; 4th week

Rys. 1. A – Zmiany aktywności katalazy w pszenicy rosnącej w glebie z różnymi dawkami soli ołowiu. B – Zmiany aktywności peroksydazy w pszenicy rosnącej w glebie z różnymi dawkami soli ołowiu

Fig. 1. A – Changes of catalase activity in wheat caused by various doses of lead salt. B – Changes of peroxidase activity in wheat caused by various doses of lead salt

Stwierdzono istotny wpływ soli ołowiu oraz terminu pomiaru na intensywność asymilacji CO₂, transpiracji, zawartość barwników asymilacyjnych oraz wykazano istotność interakcji. Odnotowano znaczny spadek natężenia fotosyntezy i transpiracji wraz ze wzrostem stężenia ołowiu w glebie. Największy spadek badanych procesów fizjologicznych stwierdzono przy stężeniu 5 mmol soli ołowiu·dm⁻³ w II i III terminie badań dla procesu fotosyntezy w II o 4,05 μmol·m⁻²·s⁻¹ i III 4,43 μmol·m⁻²·s⁻¹ oraz dla procesu transpiracji odpowiednio o 0,86 i 0,96 mmol·m⁻²·s⁻¹ (tab. 2). Zmniejszenie intensywności fotosyntezy i transpiracji mogło być związane z wieloma zakłóceniami w funkcjonowaniu aparatu fotosyntetycznego roślin, obniżeniem turgoru, hamowaniem transportu elektronów

Zmiany w intensywności procesu asymilacji CO₂, transpiracji oraz wskaźnika wykorzystania wody w pszenicy rosnącej w glebie z różnymi dawkami soli ołowiu

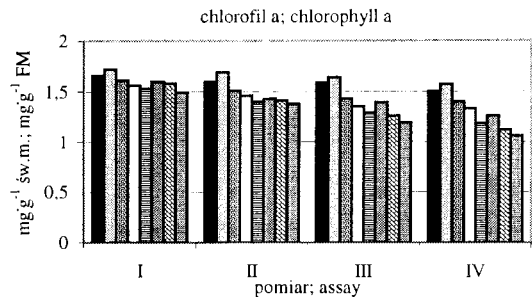
Changes in the intensity of CO₂ assimilation, transpiration and the water use photosynthetic efficiency in wheat growing on the soil supplied with different doses of lead salt

Pomiar Assay	Asymilacja CO ₂ (μmol·m ⁻² ·s ⁻¹); CO ₂ assimilation (μmol·m ⁻² ·s ⁻¹)							
	kontrola; control	NPK	NPK + 1 stęż. NPK + conc. 1	NPK + 2 stęż. NPK + conc. 2	NPK + 3 stęż. NPK + conc. 3	1 stęż. conc. 1	2 stęż. conc. 2	3 stęż. conc. 3
I	5,63	5,71	4,96	3,83	2,67	2,48	2,26	2,20
II	5,43	6,26	4,70	3,63	2,43	2,38	2,25	1,38
III	5,86	5,77	5,03	2,24	2,06	1,98	1,56	1,43
IV	4,48	4,93	2,32	1,95	1,16	1,21	1,13	0,89
NIR _{0,05} LSD _{0,05}	pomiar (I) = 0,519 assay (I) = 0.519		dawka (II) = 0,721 dose (II) = 0.721		interakcja I x II = 1,234 interaction I x II = 1.234		interakcja II x I = 1,121 interaction II x I = 1.121	
Transpiracja (mmol·m ⁻² ·s ⁻¹); Transpiration (mmol·m ⁻² ·s ⁻¹)								
Pomiar Assay	kontrola control	NPK NPK	NPK + 1 stęż. NPK + conc. 1	NPK + 2 stęż. NPK + conc. 2	NPK + 3 stęż. NPK + conc. 3	1 stęż. conc. 1	2 stęż. conc. 2	3 stęż. conc. 3
I	1,56	1,58	1,32	1,11	0,72	1,18	0,96	0,81
II	1,46	1,50	0,97	0,78	0,62	0,91	0,73	0,60
III	1,33	1,42	0,58	0,46	0,38	0,60	0,48	0,37
IV	1,02	1,13	0,91	0,45	0,41	0,46	0,32	0,28
NIR _{0,05} LSD _{0,05}	pomiar (I) = 0,238 assay (I) = 0.238		dawka (II) = 0,419 dose (II) = 0.419		interakcja I x II = 1,192 interaction I x II = 1.192		interakcja II x I = 1,106 interaction II x I = 1.106	
Wskaźnik wykorzystania wody (μmol·mmol ⁻¹); Water use photosynthetic efficiency (μmol·mmol ⁻¹)								
Pomiar Assay	kontrola control	NPK NPK	NPK + 1 stęż. NPK + conc. 1	NPK + 2 stęż. NPK + conc. 2	NPK + 3 stęż. NPK + conc. 3	1 stęż. conc. 1	2 stęż. conc. 2	3 stęż. conc. 3
I	4,07	4,13	3,64	2,72	1,95	1,30	1,30	1,39
II	3,97	4,76	3,73	2,85	1,81	1,47	1,52	0,78
III	4,53	4,35	4,45	1,78	1,68	1,38	1,08	1,06
IV	3,46	3,80	1,41	1,50	0,75	0,75	0,81	0,61

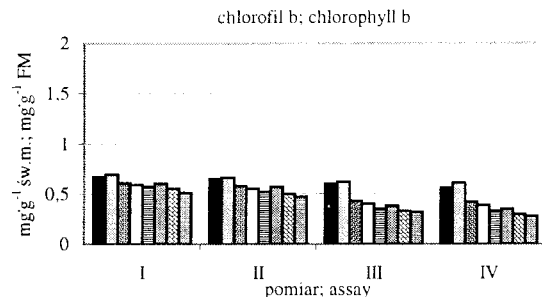
stężenie: 1, 2, 3, pomiary: I, II, III, IV – objaśnienia jak w tab. 1 i rys. 1; concentration: 1, 2, 3, assay: I, II, III, IV – explanations see Table 1 and Fig. 1

*

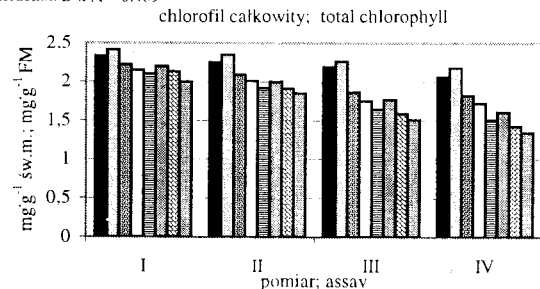
wartość średnia z trzech pomiarów; the average for 3 assays



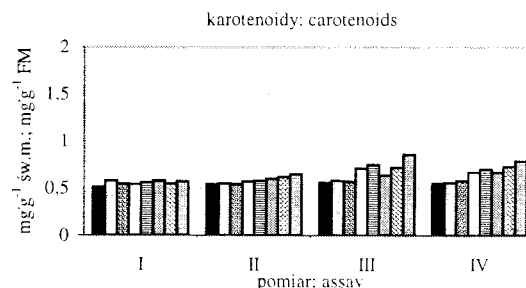
Chlorofil a; Chlorophyll a
 NIR_{0,05} pomiar (P) = 0.163, dawka (D) = 0.368, interakcja P x D = 0.531, interakcja D x P = 0.469; LSD_{0,05} assay (A) = 0.163, dose (D) 0.368, interakcja A x D = 0.531, interaction D x A = 0.469



Chlorofil b; Chlorophyll b
 NIR_{0,05} pomiar (P) = 0.192, dawka (D) = 0.110, interakcja P x D = 0.386, interakcja D x P = 0.298; LSD_{0,05} assay (A) = 0.110, dose (D) = 0.192, interakcja A x D = 0.386, interaction D x A = 0.298



Chlorofil całkowity; Total chlorophyll
 NIR_{0,05} pomiar (P) = 0.265, dawka (D) = 0.493, interakcja P x D = 0.831, interakcja D x P = 0.603; LSD_{0,05} assay (A) 0.265, dose (D) 0.493, interakcja A x D = 0.831, interaction D x A = 0.603



Karotenoidy; Carotenoids
 NIR_{0,05} pomiar (P) = 0.143, dawka (D) = 0.205, interakcja P x D = 0.378, interakcja D x P = 0.345; LSD_{0,05} assay (A) = 0.143, dose (D) = 0.205, interakcja A x D = 0.378, interaction D x A = 0.345

kontrola; control
 NPK, NPK
 1 stęż. + NPK; conc. 1 + NPK,
 2 stęż. + NPK; conc. 2 + NPK
 3 stęż. + NPK; conc. 3 + NPK
 1 stęż.: conc. 1
 2 stęż.: conc. 2
 3 stęż.: conc. 3

steżenie: 1, 2, 3, pomiary: I, II, III, IV – objaśnienia jak w tab. 1 i rys. 1; concentration: 1, 2, 3, assay: I, II, III, IV – explanations see Table 1 and Fig. 1

Rys. 2. Średnia zawartość barwników w pszenicy rosnącej w glebie z różnymi dawkami soli ołowiu

Fig. 2. The average content of assimilation dyes in wheat growing on the soil supplied with different doses of lead salt

w procesie fotosyntezy oraz spadkiem aktywności karboksylazy RuBP [WOŹNY, KRZESŁOWSKA 1994; WOŹNY 1995; MICAL i in. 1997; SŁOWIK 1999]. Ponadto obserwowane zmiany intensywności badanych procesów fizjologicznych mogą być w niekorzystnych warunkach efektem zarówno stresu, jak i mechanizmów naprawczych [STARCK 2002]. Wyliczony współczynnik wykorzystania wody wskazuje, że w warunkach stresu oksydacyjnego efektywność wykorzystania wody w procesie fotosyntezy była dużo niższa niż u roślin kontrolnych.

Dodatek do gleby soli ołowiu spowodował również istotne obniżenie zawartości chlorofilu a i b, oraz nieznaczny wzrost zawartości karotenoidów. Największy spadek chlorofilu a stwierdzono przy IV pomiarze i dawce 5 mmol $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2 \cdot \text{dm}^{-3}$ – o 29,4%, natomiast chlorofilu b o 50% (rys. 2). Jak podaje SKOŁOZDRZY i in. [2001] inhibicja barwników pod wpływem ołowiu dotyczy przede wszystkim chlorofilu b. Hamowanie syntezy chlorofilu odbywa się przez zahamowanie aktywności enzymów zaangażowanych w ich syntezę [WOŹNY, KRZESŁOWSKA 1994; WOŹNY 1995; SŁOWIK 1999].

Wnioski

1. Podczas wszystkich pomiarów zaobserwowano wyraźny stymulujący wpływ zastosowanych dawek ołowiu na aktywność katalazy i peroksydazy w pszenicy.
2. Wykazano istotność różnic w natężeniu asymilacji CO_2 , transpiracji pary wodnej i zawartości barwników asymilacyjnych w pszenicy w zależności od terminu pomiarów.
3. Wraz ze wzrostem stężenia soli ołowiu w glebie stwierdzono spadek intensywności asymilacji CO_2 , transpiracji oraz zawartości chlorofilu a i b w roślinie testowej.

Literatura

- BICZAK R., GURGUL E., KACZMARCZYK S., HERMAN B. 1999. *Enzyme activity and yield of stalk celery and leek under the influence of mineral fertilization. Part I. Peroxydase activity in leaf tissue*. *Fol. Univ. Agric. Stejn.* 193 *Agricultura* 73: 19–27.
- GROPPA M.D., TOMARO M.L., BENAVIDES M.P. 2001. *Polyamines as protectors against cadmium or copper-induced oxidative damage in sunflower leaf discs*. *Plant Science* 161: 481–488.
- KABATA-PENDIAS A., PENDIAS H. 1999. *Biogeochemia pierwiastków śladowych*. PWN, Warszawa: 398 ss.
- MAŁECKA A., JARMUSZKIEWICZ W., TOMASZEWSKA B. 2001. *Antioxidative defense to lead stress in subcellular compartments of pea root cells*. *Acta Biochim. Pol.* 48(3): 687–698.
- MICAL A., CZERPAK M., KROTKE A. 1997. *Wpływ ołowiu na niektóre procesy metaboliczne roślin*. *Kosmos* 2: 277–282.

- MIODUSZEWSKA H. 2001. *Wpływ nawożenia azotem na aktywność peroksydazy i katalazy w bulwach ziemniaka odmiany Uran*. Biul. Instyt. Hod. i Aklim. Rośl. 220: 215–220.
- MOSTOWSKA A., GWÓZDŹ E.A. 1995. *Reakcje aparatu fotosyntetycznego na stres oksydacyjny*. Post. Biol. Kom. 22(1): 43–63.
- PACHA J., GALIMSKA-STYPA R. 1984. *Właściwości mutagenne wybranych związków kadmu, cynku miedzi i ołowiu*. Acta Biol. Sil. 15: 20–27.
- PANDA S., CHAUDHURY I., KHAN M. 2003. *Heavy metals induce lipid peroxidation and affect antioxidants in wheat leaves*. Biologia Plant. 46(2): 289–294.
- SKOŁOZDRZY J., PERLA J., SMÓL J., TWARDOWSKI T. 2001. *Metale ciężkie: żelazo, ołów, kadm – czy tylko zagrożenie dla roślin?* Ochr. Rośl. 5(6): 2–6.
- SŁOWIK D. 1999. *Wpływ ołowiu na fotosyntezę*. Wiad. Bot. 43(3/4): 41–49.
- STARCK Z. 2002. *Mechanizmy integracji procesów fotosyntezy i dystrybucji biomasy w niekorzystnych warunkach środowiska*. Zesz. Probl. Post. Nauk Rol. 481: 111–123.
- VERMA S., DUBEY R. S. 2003. *Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants*. Plant Sci. 164(4): 645–655.
- WANG S-H., YANG Z-M., YANG H., LU B., LI S-O., LU Y-P. 2004. *Copper-induced stress and antioxidative responses in roots of Brassica juncea L.* Bot. Bull. Acad. Sin. 45: 203–212.
- WOŹNY A. 1995. *Ołów w komórkach roślinnych*. Wydawnictwo Sorus, Poznań: 163 ss.
- WOŹNY A., KRZESŁOWSKA M. 1994. *Pobieranie ołowiu i reakcje komórek roślinnych na ten metal*. Idce Ekol. 4/3: 135–140.
- WÓJCIK A., TUKENDORF A. 1995. *Strategia unikania stresu w odporności roślin na metale ciężkie*. Wiad. Bot. 39(3/4): 33–40.
- ZENK M. 1996. *Heavy metal detoxification in plants – a review*. Gene 179: 21–30.

Słowa kluczowe: ołów, katalaza, peroksydaza, barwniki asymilacyjne, transpiracja, asymilacja CO₂

Streszczenie

W pracy określono aktywność enzymów katalazy i peroksydazy, zawartość barwników asymilacyjnych oraz natężenie procesu asymilacji CO₂ i transpiracji w różnych fazach rozwojowych pszenicy rosnącej w glebie z dodatkiem różnych ilości soli ołowiu (0,05–5 mmol·dm⁻³) oraz dodatkiem nawożenia NPK. Wszystkie zastosowane stężenia soli ołowiu wpłynęły na wzrost aktywności enzymów wchodzących w skład systemu antyoksydacyjnego (katalazy i peroksydazy). Odnotowano znaczny spadek badanych parametrów fizjologicznych wraz ze wzrostem zawartości ołowiu w glebie. Nawożenie NPK zwiększało zawartość w pszenicy barwników asymilacyjnych, intensywność transpiracji oraz aktywność peroksydazy w stosunku do pozostałych kombinacjach.

INFLUENCE OF DIFFERENT HEAVY METAL DOSES ON ACTIVITY
OF OXIDATIVE STRESS ENZYMES AND PHYSIOLOGICAL FACTORS
OF SPRING WHEAT

PART II
INFLUENCE OF LEAD

*Katarzyna Malinowska*¹, *Beata Smolik*²

¹Department of Plant Physiology, Agricultural University, Szczecin

²Department of Biochemistry, Agricultural University, Szczecin

Key words: lead, catalase, peroxidase, assimilation dyes, transpiration, CO₂ assimilation

Summary

Authors investigated enzymatic activity of catalase and peroxidase, contents of assimilatory pigments and intensity of CO₂ assimilation and transpiration at different development stages of wheat, grown on the soil with various lead salt addition (0.05–5 mmol·dm⁻³) and NPK fertilization. All applied lead salt doses increased activity of antioxidative system enzymes (catalase and peroxidase). Significant decrease of physiological parameters was stated with increasing lead content in soil. Used NPK fertilization increased the content of assimilation dyes, transpiration intensity and peroxidase activity in wheat, as compared to other combinations.

Dr inż. Katarzyna **Malinowska**
Katedra Fizjologii Roślin
Akademia Rolnicza
ul. Słowackiego 17
71-434 SZCZECIN
e-mail: kmalinowska@agro.ar.szczecin.pl