

## WPŁYW MIEDZI NA AKTYWNOŚĆ ENZYMÓW ANTYOKSYDACYJNYCH W KUKURYDZY UPRAWIANEJ W KULTURACH WODNYCH

*Marcin Zemanek, Czesława Jasiewicz*

Katedra Chemii Rolnej, Akademia Rolnicza im. H. Kołłątaja w Krakowie

### Wstęp

Miedź jest metalem zaliczanym do grupy pierwiastków niezbędnych do wzrostu i rozwoju roślin. Jednakże wzrost stężenia tego metalu w środowisku powyżej optymalnego poziomu niesie ze sobą szereg zaburzeń w funkcjonowaniu organizmów roślinnych. Jednym z efektów działania nadmiaru jonów miedzi na rośliny jest produkcja w komórce reaktywnych form tlenu:  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ ,  $OH^-$  o działaniu toksycznym. Pociąga to za sobą reakcję obronną komórek w postaci zmian aktywności enzymów antyoksydacyjnych, co określane jest mianem stresu oksydacyjnego [LUNA i in. 1994; MAZHOUDI i in. 1997]. Celem podjętych badań było określenie aktywności katalazy i dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) w liściach kukurydzy rosnącej na pożywce zawierającej toksyczne dawki miedzi.

### Materiał i metody

Doświadczenie prowadzono w warunkach kultur wodnych z kukurydzą (*Zea mays* L.) odmiany KLG-220. Nasiona kukurydzy kiełkowały w kuwetach wypełnionych piaskiem kwarcowym. Ubytki wilgoci uzupełniano wodą destylowaną. Siewki, po osiągnięciu odpowiedniej wielkości (2–3 liście, co odpowiadało ok. 10 cm wysokości), umieszczano w otworach pokryw akwariów i przeniesiono do akwariów wypełnionych pożywką Hoaglanda o pH = 6,5, zawierającą mikro- i makroelementy: ( $mg \cdot dm^{-3}$ )  $Ca(NO_3)_2 \cdot 4 H_2O$  – 910;  $KNO_3$  – 550;  $KH_2PO_4$  – 150;  $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$  – 540;  $CuSO_4 \cdot 5 H_2O$  – 0,09;  $H_3BO_4$  – 3,17;  $MnSO_4 \cdot H_2O$  – 2,43;  $ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$  – 0,43;  $H_2MoO_4$  – 0,08; sól sodowo-żelazową kwasu etylenodwuaminoczworoctowego – EDTA(NaFe) – 45,5. Urządzenia napowietrzające pracowały w ciągu całego okresu prowadzenia doświadczenia. Każdy obiekt obejmował 4 powtórzenia, a powtórzeniem było akwarium o pojemności 5  $dm^3$ , w którym rosły 4 rośliny. Po ok. 2 tygodniach kultury, gdy rośliny wykształciły typowy, wodny system korzeniowy, dodawano do akwariów miedź w postaci:  $CuSO_4 \cdot 5 H_2O$ . Rośliny hodowane na pożywce Hoaglanda bez dodatku miedzi były traktowane jako rośliny kontrolne. W doświadczeniu stosowano następujące

stężenia miedzi: Cu 1 = 1 mg, Cu 2 = 2 mg, Cu 3 = 4 mg, Cu 4 = 6 mg, Cu 5 = 8 mg, Cu 6 = 12 mg, Cu 7 = 16 mg, Cu 8 = 24 mg, Cu 9 = 32 mg·dm<sup>-3</sup>.

Do zbioru roślin przystąpiono po 7 tygodniach trwania doświadczenia. Pomiaru zawartości Cu dokonano metodą spektrometrii emisyjnej przy użyciu spektrofotometru ze wzbudzeniem w plazmie sprzężonej indukcyjnie (ICP-AES) JY 238 produkcji Jobin Yvon. Prezentowane zawartości miedzi stanowią średnią z dwóch powtórzeń. Aktywność katalazy mierzono spektrofotometrycznie wg AEBI [1984]. Aktywność SOD mierzono spektrofotometryczną metodą cytochromową wg McCORD i FRIDOVICH [1969]. Statystyczną istotność różnic pomiędzy badanymi obiektami doświadczalnymi oceniano na podstawie analizy wariancji w układzie całkowicie losowym, wykorzystując test Duncana.

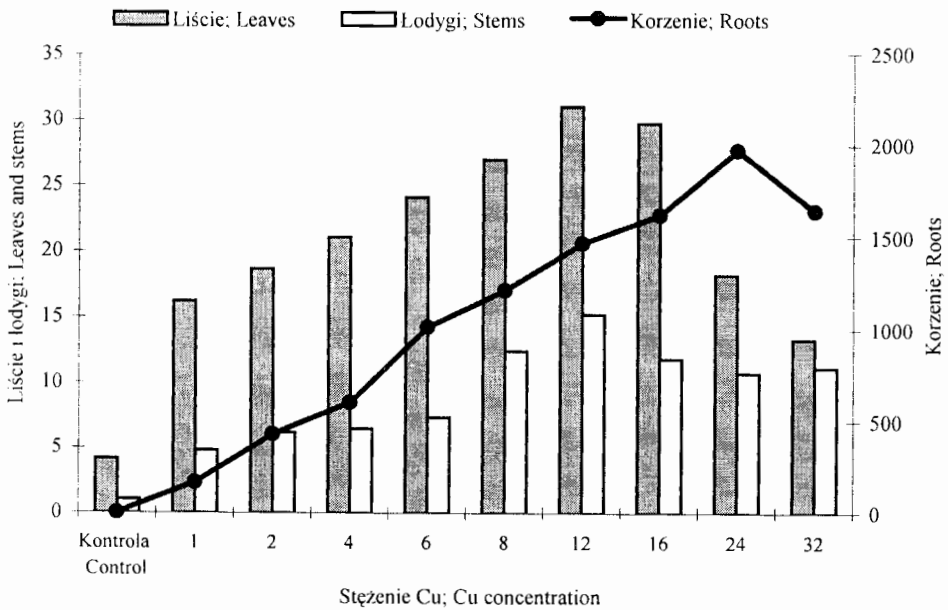
## Wyniki i dyskusja

Zawartość miedzi w korzeniach, łodygach i liściach przedstawia rys. 1. Wzrastająca dawka miedzi w pożywce wywołała wyraźny wzrost zawartości tego metalu zarówno w korzeniach, łodygach, jak i liściach. Najwięcej miedzi zatrzymały korzenie, mniej liście, a najmniej łodygi. Łodygi z obiektu kontrolnego zawierały 1,02 mg Cu i stwierdzono dwukrotnie niższą zawartość tego pierwiastka niż w korzeniach (2,1 mg Cu) tego samego obiektu. W obiekcie, w którym stężenie miedzi wynosiło 24 mg Cu·dm<sup>-3</sup>, zawartość tego pierwiastka w łodygach była aż 184-krotnie niższa niż w korzeniach. Uzyskane wyniki potwierdzają słabą mobilność miedzi w roślinach kukurydzy. Zawartość miedzi w korzeniach wahała się w zakresie 2,1–1975 mg Cu·kg<sup>-1</sup> s.m. W obiektach od stężenia 1 mg Cu do 8 mg Cu·dm<sup>-3</sup> wzrost zawartości miedzi był niemal proporcjonalny do zastosowanej dawki. W kolejnych obiektach aż do 24 mg Cu·dm<sup>-3</sup> następował wzrost zawartości, lecz nie był on już proporcjonalny do dawki. W korzeniach, w obiekcie o stężeniu 24 mg Cu·dm<sup>-3</sup>, odnotowano 940-krotnie wyższą zawartość miedzi niż w korzeniach obiektu kontrolnego.

Zawartość miedzi w korzeniach, w obiekcie o najwyższym stężeniu tego pierwiastka, była zbliżona do zawartości w obiekcie Cu 7, pomimo 2-krotnie wyższego stężenia miedzi w pożywce obiektu Cu 9. Zawartość miedzi w łodygach mieściła się w przedziale 1,02–15,2 mg Cu·kg<sup>-1</sup>. Zaobserwowano wzrost zawartości w kolejnych obiektach aż do stężenia 12 mg Cu·dm<sup>-3</sup>, natomiast obiekty o stężeniu miedzi od 16 do 32 mg Cu·dm<sup>-3</sup> charakteryzowały się utrzymującą się na zbliżonym poziomie zawartością miedzi. Koncentracja miedzi w liściach mieściła się w przedziale 4,14–31,0 mg Cu·kg<sup>-1</sup>. Największe ilości miedzi zgromadziły liście z obiektów, gdzie stężenie Cu wahało się w granicach 12–16 mg Cu·dm<sup>-3</sup>. W obiektach Cu 8 i Cu 9, pomimo wzrostu dawki miedzi, następował spadek zawartości tego pierwiastka (rys. 1).

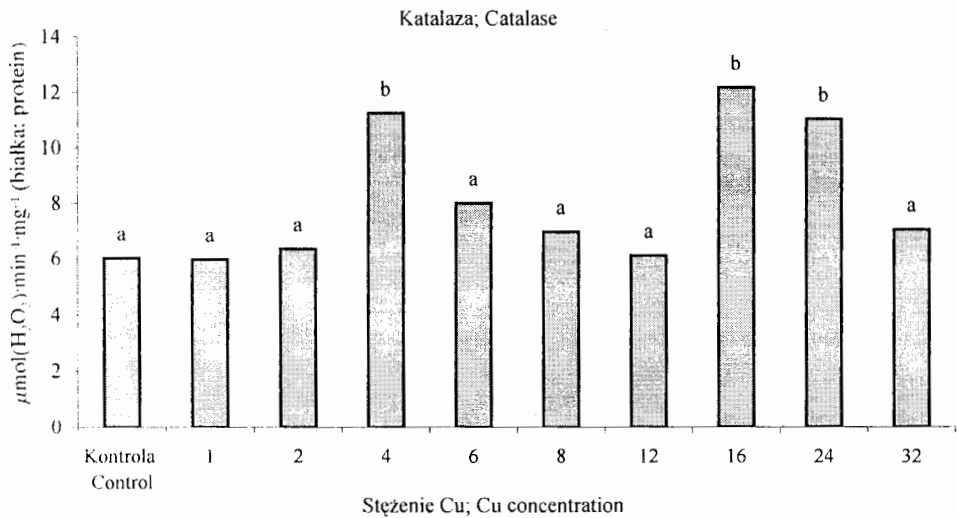
W odpowiedzi na wzrastające stężenia miedzi w pożywce nastąpił wzrost aktywności katalazy, ale wyłącznie w obiektach Cu 3, Cu 7 i Cu 8. Jednakże w obiekcie z najwyższą dawką miedzi nastąpiło zdecydowane obniżenie aktywności katalazy do poziomu nieznacznie wyższego niż w kontroli (rys. 2).

Profil zmian aktywności dysmutazy ponadtlenkowej pod wpływem wzrastających dawek miedzi przypomina w pewnym stopniu profil zmian aktywności katalazy. Jednakże analiza statystyczna na poziomie  $\alpha = 0,05$  nie wykazała istotnego zróżnicowania aktywności tego enzymu (rys. 3).



Rys. 1. Zawartość miedzi w korzeniach, łodygach i liściach kukurydzy traktowanej wzrastającymi dawkami miedzi (mg·kg<sup>-1</sup> s.m.). Litery alfabetu oznaczają grupy jednorodnie utworzone w oparciu o test Duncana ( $\alpha = 0,05$ )

Fig. 1. Content of copper in roots, stems and leaves of maize treated with increasing doses of copper (mg·kg<sup>-1</sup> DM). The letters denote homogenous groups based on Duncan test ( $\alpha = 0.05$ )

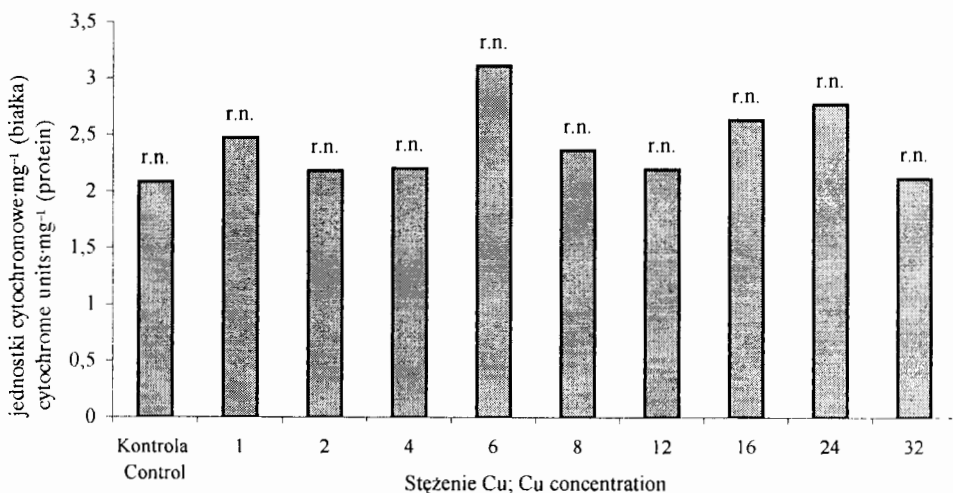


r.n. – różnice nieistotne; differences not significant

Rys. 2. Aktywność katalazy w liściach kukurydzy traktowanej wzrastającymi dawkami miedzi.

Fig. 2. Activity of catalase in leaves of maize treated with increasing doses of copper

## Dysmutaza ponadtlenkowa; Superoxide dismutase



r.n. – różnice nieistotne; differences not significant

Rys. 3. Aktywność dysmutazy ponadtlenkowej w liściach kukurydzy traktowanej wzrastającymi dawkami miedzi

Fig. 3. Activity of superoxide dismutase in leaves of maize treated with increasing doses of copper

W literaturze stosunkowo dużo uwagi poświęcono wpływowi miedzi na wystąpienie stresu oksydacyjnego u różnych gatunków roślin. Wzrost aktywności katalazy odnotowali WECKX i CLUSTERS [1996] w siewkach fasoli, natomiast MAZHODI i in. [1997] badając reakcje siewek pomidora na nadmiar miedzi stwierdzili, że aktywność tego enzymu w liściach i łodygach utrzymywała się na stałym poziomie (w porównaniu z kontrolą), a spadała w korzeniach. Obniżenie aktywności katalazy pod wpływem nadmiaru miedzi odnotowali również LIDON i HENRIQUES [1993] w liściach ryżu oraz LUNA i in. [1994] w liściach owsa.

Wyniki badań własnych, dotyczące aktywności SOD, pozwalają stwierdzić, że enzym ten nie został włączony w mechanizm obronny badanej odmiany kukurydzy przed toksycznym wpływem miedzi. Podobna prawidłowość wystąpiła w roślinach fasoli zwyczajnej [WECKX, CLUSTERS 1996] oraz w grochu [PALMA i in. 1987]. Natomiast wzrost aktywności SOD pod wpływem nadmiaru miedzi zanotowano w liściach owsa [LUNA i in. 1994] oraz w korzeniach soi [CHONGPRADITNUM i in. 1992], co autorzy tłumaczyli bezpośrednim wpływem miedzi na gen warunkujący syntezę SOD lub pośrednio wywołujący wzrost zawartości anionorodnika ponadtlenkowego ( $O_2^-$ ).

## Wnioski

1. Zastosowane dawki miedzi od 0 do 16 mg Cu·dm<sup>-3</sup> wywołały regularny wzrost zawartości miedzi w badanych częściach kukurydzy. Natomiast wprowadzenie wyższych dawek powodowało obniżenie zawartości tego metalu.

2. Spośród omawianych enzymów, jedynie wzrost aktywności katalazy w niektórych obiektach sugeruje wystąpienie stresu oksydacyjnego pod wpływem zastosowanych dawek miedzi. Nie odnotowano natomiast istotnego zróżnicowania aktywności dysmutazy ponadtlenkowej.

### Literatura

- AEBI H. 1984. *Catalase in vitro*. Meth. Enzymol. 105: 121–126.
- CHONGPRADITNUM P., MORI S., CHINO M. 1992. *Excess copper induces a cytosolic Cu, Zn-superoxide dismutase in soybean root*. Plant Cell Physiol. 33: 239–244.
- LIDON F.C., HENRIQUES F.S. 1993. *Copper-mediated oxygen toxicity in rice chloroplasts*. Photosynthetica 29: 385–400.
- LUNA C.M., GONZALEZ C.A., TRIPPI V.S. 1994. *Oxidative damage caused by an excess of copper in oat leaves*. Plant Cell Physiol. 35: 11–15.
- MCCORD I.M., FRIDOVICH I. 1969. *Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein)*. J. Biol. Chem. 244: 6049–6055.
- MAZHOUDI S., CHIAOUI A., GIORBAL M.H., EL FERJANI E. 1997. *Response of antioxidant enzymes to excess copper in tomato (Lycopersicon esculentum, Mill.)*. Plant Science 127: 129–137.
- PALMA J.M., GOMEZ M., YANEZ J., DEL RIO L.A. 1987. *Increased levels of peroxisomal active oxygen-related enzymes in copper-tolerant pea plants*. Plant Physiol. 85: 570–574.
- WECKX J.E.J., CLIJSTERS H.M.M. 1996. *Oxidative damage and defense mechanisms in primary leaves of Phaseolus vulgaris as a result of root assimilation of toxic amounts of copper*. Physiol. Plant. 96: 506–512.

**Słowa kluczowe:** katalaza, dysmutaza ponadtlenkowa, miedź, kukurydza, kultury wodne

### Streszczenie

Schemat doświadczenia obejmował 10 obiektów ze wzrastającymi dawkami miedzi: (0; 1; 2; 4; 6; 8; 12; 16; 24; 32 mg Cu·dm<sup>-3</sup>). Doświadczenie prowadzono w warunkach kultur wodnych przez okres siedmiu tygodni. Miedź była akumulowana głównie w korzeniach, mniej w liściach, a najmniej w łodygach. Wzrastające stężenia miedzi w pożywce spowodowały regularny wzrost zawartości miedzi w badanych częściach kukurydzy. Natomiast wprowadzenie dawki powyżej 16 mg Cu·dm<sup>-3</sup> wywołało spadek zawartości miedzi. Dawki 4 oraz 16 i 24 mg Cu·dm<sup>-3</sup> podniosły aktywność katalazy (prawie dwukrotnie), wskazując na wystąpienie stresu oksydacyjnego u badanej kukurydzy. Nie odnotowano wpływu miedzi na aktywność dysmutazy ponadtlenkowej.

## THE EFFECT OF COPPER ON ACTIVITY OF ANTIOXIDATIVE ENZYMES IN MAIZE CULTIVATED IN WATER CULTURES

*Marcin Zemanek, Czestawa Jasiewicz*

Department of Agricultural Chemistry, Agricultural University, Kraków

Key words: catalase, superoxide dismutase, copper, maize, water cultures

### Summary

Experimental design comprised 10 objects with increasing doses of copper: (0; 1; 2; 4; 6; 8; 12; 16; 24; 32 mg Cu·dm<sup>-3</sup>). The experiment was conducted in water cultures during seven weeks. Copper was accumulated mainly in roots, less in leaves and the least in stems. Increasing concentrations of copper in nutrient solution caused a regular increase of copper content in all investigated parts of the maize. Introducing doses of copper, higher than 16 mg Cu·dm<sup>-3</sup> caused a decrease of copper content. Doses of 4, 16 and 24 mg Cu·dm<sup>-3</sup> increased the activity of catalase (almost 2-fold), indicating oxidative stress in investigated maize. The effect of copper on the activity of superoxide dismutase was not noted.

Dr inż. Marcin **Zemanek**  
Katedra Chemii Rolnej  
Akademia Rolnicza im. H. Kołłątaja  
al. Mickiewicza 21  
31-120 KRAKÓW  
e-mail: rrzemane@cyf-kr.edu.pl