

WPLYW SUSZY NA AKTYWNOŚĆ PEROKSYDAZY ASKORBINIANOWEJ W WYBRANYCH ODMIANACH ZIEMNIAKA



Marta Dybner¹, Dominika Boguszewska-Mańkowska², Krzysztof Treder¹

IHAR-PIB, ¹Zakład Nasiennictwa i Ochrony Ziemi w Boninie; ²Oddział w Jadwisinie, ul. Szaniawskiego 15 Jadwisin

WSTĘP

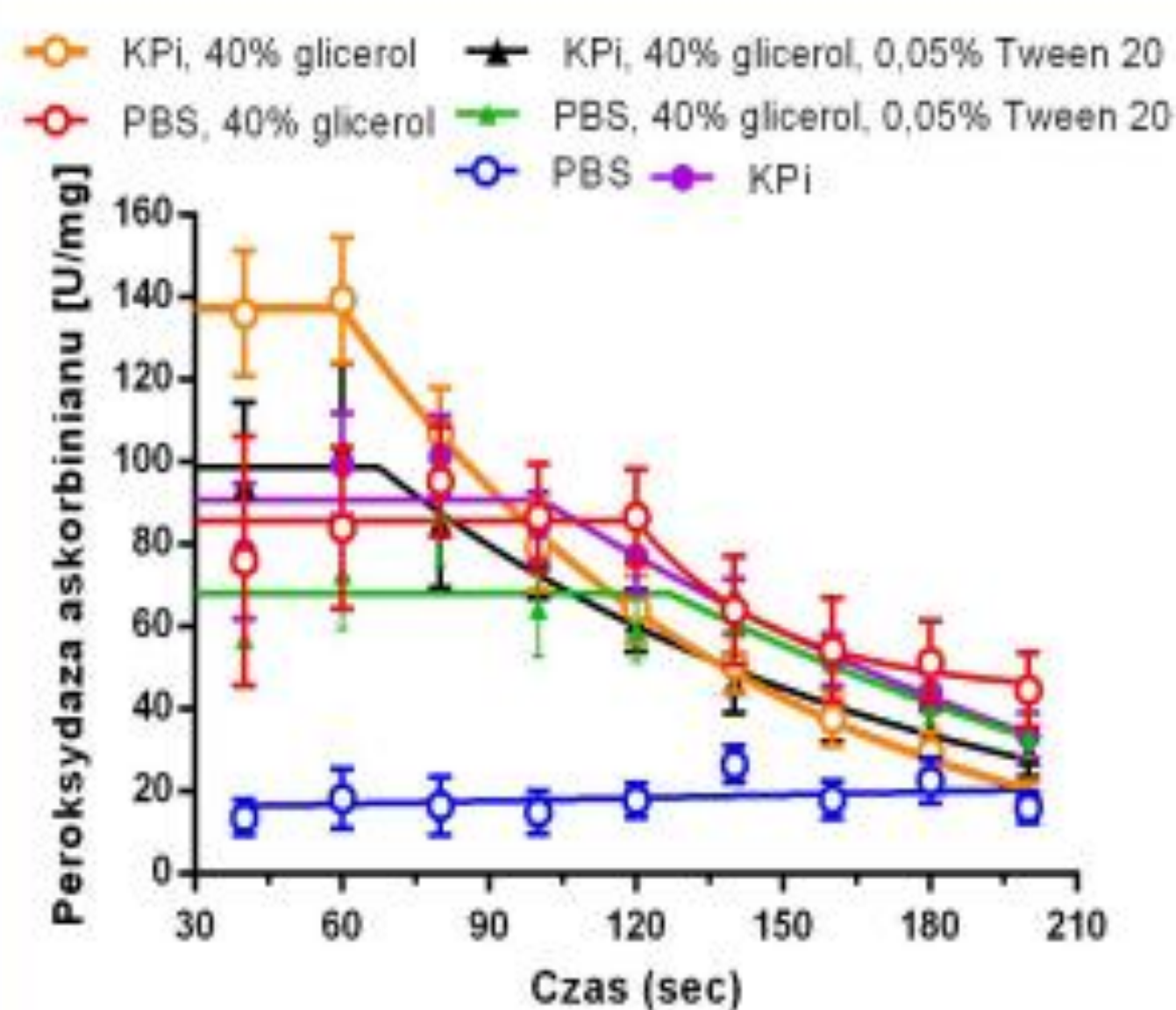
Peroksydaza askorbinianowa (APX) naturalnie występująca w chloroplastach, cytozolu, wakuoli i apoplasmie to jeden z kluczowych enzymów, wraz z dysmutazą ponadtlenkową i katalazą, biorących udział w usuwaniu reaktywnych form tlenu, powstających w warunkach stresu biotycznego i abiotycznego. Peroksydaza askorbinianowa katalizuje reakcję redukcji nadtlenu wodoru do wody przez kwas L-askorbinowy. Ziemiak to roślina o dużych wymaganiach wodnych i nawozowych, na którą szczególnie negatywnie wpływa stres abiotyczny (susza). Pod jego wpływem plon roślin może być pomniejszony nawet kilkanaście razy. Tak więc odporność roślin na suszę jest bardzo ważnym elementem dostosowania się do stale zmieniających się warunków klimatycznych. Wielokrotnie w literaturze wykazywano związek peroksydazy askorbinianowej z odpornością roślin na suszę, dlatego też może ona stanowić dobry marker odporności na ten rodzaj stresu. Aby enzym mógł być rutynowo wykorzystywany potrzebna jest prosta i niekosztowna metoda oznaczania jego aktywności.

MATERIAŁY I METODY

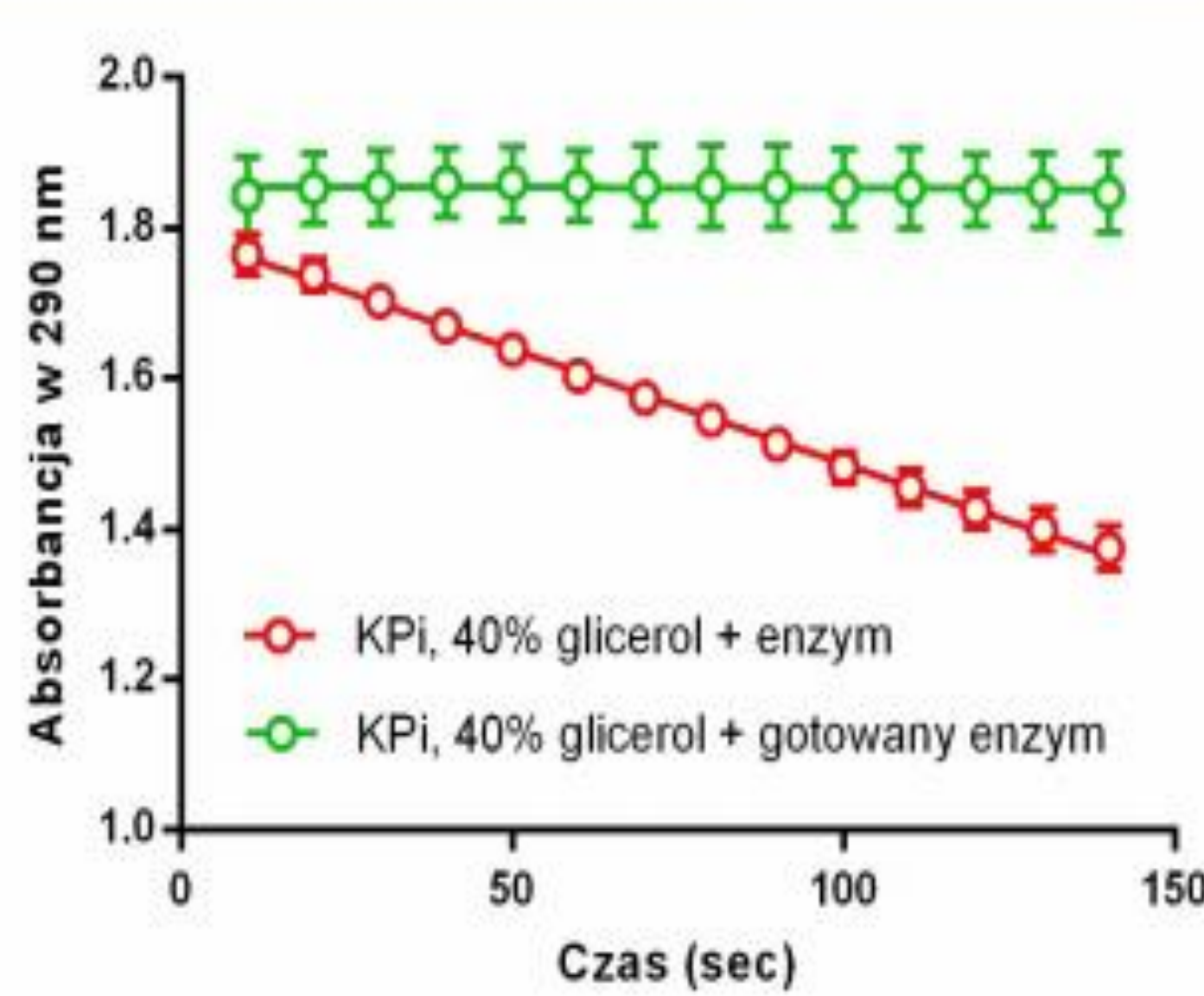
OZNACZANIE AKTYWNOŚCI. APX oznaczano wg Nakano i Asada (1981)^a. W celu optymalizacji metody modyfikowano bufor ekstrakcyjny. Do 194 µl roztworu substratu (0,5 mM kwas askorbinowy w 50 mM buforze potasowofosforanowym o pH 7,0 dodawano 2 µl enzymu, mierzono wyjściową absorbancję w 290 nm i rozpoczynano reakcję dodając 4 µl 10 mM H₂O₂ (końcowe stężenie 0,2 mM). Reakcję prowadzono przez 30-180 sekund w temperaturze pokojowej mierząc absorbancję w 290 nm co 30 sekund. Za jednostkę enzymu [U] przyjęto liczbę mikromoli askorbinianu utlenianego w ciągu 1 minuty w przeliczeniu na 1 mg świeżej masy. Do wyznaczenia koncentracji kwasu L askorbinowego stosowano współczynnik ekstynkcji molowej (w 290 nm = 2,8 mM⁻¹ cm⁻¹).

ZMIANY AKTYWNOŚCI APX POD WPLYWEM SUSZY. Do badań użyto odmiany ziemniaka, różniące się podatnością na suszę, uzyskane z Banku Genów Ziemi (IHAR-PIB, Zakład Nasiennictwa i Ochrony Ziemi w Boninie). Rośliny wysadzono w pomieszczeniu fitotronowym. Po 2 tygodniach adaptacji przerwano podlewanie 20 roślin każdej odmiany (Susza). Dla 10 roślin kontynuowano podlewanie przez cały czas trwania doświadczenia (Kontrola). Po 20 dniach suszy z roślin kontrolnych oraz z roślin poddanych suszy zebrano liście, utarto w ciekłym azocie i przechowywano w -80°C. Tego samego dnia rozpoczęto podlewanie 20 roślin uprzednio poddanych suszy (Regeneracja). Po trzech dniach podlewania zebrano i utarto liście jak opisano wyżej. Dla każdej odmiany odważano w 3 powtórzeniach po 50 mg tkanki z prób kontrolnych, poddanych suszy i regenerowanych. Tkaninę homogenizowano w 200 µl 50 mM buforu potasowofosforanowego (KPi) o pH 7,0 z 40% glicerolem. Próby wirowano i supernatant stosowano do oznaczania aktywności.

WYNIKI



Rysunek 1. Wpływ buforu ekstrakcyjnego na aktywność i stabilność APX.



Rysunek 2. Wpływ H₂O₂ na kwas L-askorbinowy.

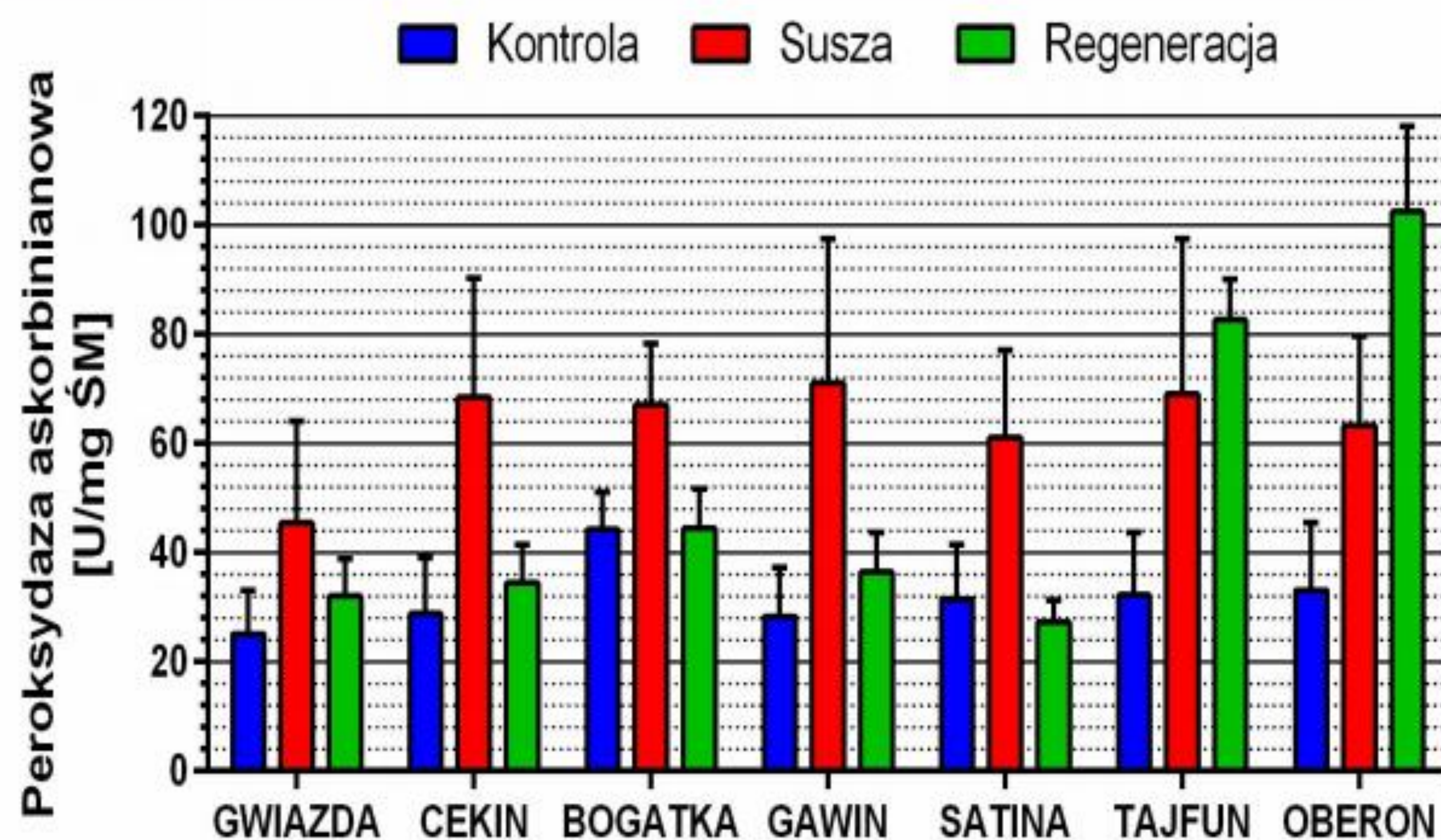
Najwyższą aktywność uzyskano stosując bufor KPi zawierający 40% glicerol (Rys.1). Dodatek innych substancji, lub zmiana buforu na PBS powodowały spadek aktywności (Rys.1). Enzym najdłużej zachowywał początkową aktywność w buforze PBS z 40%glicerolem(przez 120 sekund). Jednakże, aktywność enzymu w tym buforze była prawie 7-krotnie niższa niż w KPi + 40% glicerol, który wybrano do dalszych badań, pomimo, że enzym zachowywał w nim początkową aktywność tylko przez 60 sekund.

W zoptymalizowanych warunkach nie obserwowano utleniania kwasu L-askorbinowego przez wodę utlenioną. Dzięki temu nie była konieczna korekta wyników o ten parametru (Rys. 2).

Aktywność peroksydazy askorbinianowej w roślinach podlewanych była podobna i mieściła się w zakresie 25-35 U/mg świeżej masy dla wszystkich badanych odmian (Rys.3 Kontrola). W roślinach poddanych suszy aktywność wzrosła dwukrotnie do około 50-70 U/mg świeżej masy (rys.3 susza). Przerwanie suszy i 3-dniowe podlewanie (regeneracja) dla większości odmian powodowało spadek absorbancji do poziomu wyjściowego (rys.3 regeneracja). Wyjątkiem były odmiany Tajfun i Oberon. W przypadku Tajfuna aktywność enzymu nie zmieniła się względem aktywności oznaczanej po 20-dniowej suszy. U odmiany Oberon obserwowano dalszy wzrost aktywności enzymu do poziomu trzykrotnie wyższego niż w roślinach kontrolnych (rys.3 regeneracja). Rośliny odmiany Oberon, nawet w wyższym stopniu niż rośliny odmiany Tajfun po 20 dniach suszy nadal były bardzo zielone i w ogólnie dobrej kondycji, podczas gdy pozostałe odmiany wykazywały wyraźne objawy suszy.

WNIOSKI

1. Metoda spektrofotometrycznego oznaczania peroksydazy askorbinianowej po optymalizacji może być wykorzystana do rutynowego badania odporności odmian ziemniaka na stres suszy.
2. Większość odmian, w tym podatna na suszę odmiana Gawin reaguje wzrostem aktywności enzymu pod wpływem stresu suszy i jego szybkim spadkiem do poziomu kontrolnego po przerwaniu suszy.
3. Odmiana odporna na suszę Tajfun i potencjalnie odporna - Oberon, utrzymują podwyższony poziom aktywności enzymu po przerwaniu suszy.



Rysunek 3. Wpływ suszy na zmiany aktywności APX w badanych odmianach ziemniaka. Słupki błędów przedstawione na wykresach 1-3 oznaczają odchylenie standardowe.