

Agnieszka ROMBEL-BRYZEK¹ i Izabella PISAREK²

WPLYW KWASÓW HUMINOWYCH NA AKTYWNOŚĆ METABOLICZNĄ BURAKA CUKROWEGO W WARUNKACH SUSZY

THE EFFECT OF HUMIC ACIDS ON METABOLIC ACTIVITY OF SUGAR BEET UNDER DROUGHT CONDITIONS

Abstrakt: Reaktywne formy tlenu (RFT) powstają w komórkach jako produkt uboczny wielu procesów metabolicznych, a ich wytwarzanie nasila się pod wpływem wielu czynników środowiskowych. W pewnych granicach stężeń obecność RFT jest niezbędna do zachowania prawidłowego funkcjonowania komórki, dlatego rośliny wykształciły liczne mechanizmy, których rola polega na utrzymaniu stałego stężenia RFT. Zachwianie równowagi pomiędzy powstawaniem RFT a działaniem ochronnym systemu antyoksydacyjnego prowadzi do stanu zwanego stresem oksydacyjnym. Susza jest głównym czynnikiem ograniczającym wzrost i rozwój roślin. Jednocześnie badania dowiodły, że kwasy huminowe stosowane dolistnie łagodziły negatywne skutki niedoboru wody dzięki specyficznemu aktywowaniu enzymatycznych systemów antyoksydacyjnych. Celem badań była ocena wpływu kwasów huminowych zastosowanych dolistnie na aktywność metaboliczną buraka cukrowego *Beta vulgaris* L. w warunkach suszy. Badania przeprowadzono w warunkach laboratoryjnych. W materiale roślinnym, który stanowiły rośliny buraka cukrowego, oznaczano aktywność właściwą peroksydazy gwajakolowej (GPOX), stopień peroksydacji lipidów, zawartość chlorofilu *a* i *b*. Wyniki ujawniły, że dolistne zastosowanie kwasów huminowych u roślin wzrastających w warunkach suszy nie zwiększa aktywności właściwej GPOX w porównaniu do roślin regularnie podlewanych. Jednocześnie u tych roślin stwierdzono wzrost stopnia peroksydacji lipidów. W badaniach nie stwierdzono wpływu warunków uprawy na zawartość chlorofilu *a* i *b* w badanych roślinach.

Słowa kluczowe: kwasy huminowe, burak cukrowy, susza

Wstęp

Reaktywne formy tlenu (RFT) powstają w komórkach jako produkt uboczny wielu procesów metabolicznych, a ich wytwarzanie nasila się pod wpływem wielu czynników środowiskowych, np. niedoboru wody. W pewnych granicach stężeń obecność RFT jest niezbędna do zachowania prawidłowego funkcjonowania komórki, dlatego rośliny wykształciły mechanizmy, których rola polega na utrzymaniu stałego stężenia RFT. Są to systemy enzymatyczne, do których należą katalaza, peroksydaza i dysmutaza ponadtlenkowa, oraz systemy nieenzymatyczne reprezentowane przez niskocząsteczkowe antyoksydanty, takie jak glutation, askorbinian, tokoferole, flawonoidy i karotenoidy. Zachwianie równowagi pomiędzy powstawaniem RFT a działaniem ochronnym systemów antyoksydacyjnych prowadzi do stanu zwanego stresem oksydacyjnym. Może wówczas dochodzić do oksydacyjnego uszkodzenia makrocząsteczek: białek, lipidów i kwasów nukleinowych, i w konsekwencji do zaburzeń w funkcjonowaniu komórki, a nawet do jej śmierci [1].

Susza jest głównym czynnikiem ograniczającym wzrost i rozwój roślin. Niedobory wody u roślin wpływają na różne fizjologiczne i biochemiczne procesy, takie jak

¹ Samodzielna Katedra Biotechnologii i Biologii Molekularnej, Uniwersytet Opolski, ul. kard. B. Kominka 6a, 45-032 Opole, tel. 77 401 60 48, email: agarombel@uni.opole.pl

² Samodzielna Katedra Ochrony Powierzchni Ziemi, Uniwersytet Opolski, ul. Oleska 22, 45-052 Opole
Praca była prezentowana podczas konferencji ECOpole'16, Zakopane, 5-8.10.2016

fotosynteza, wymiana gazowa, wymiana jonowa, metabolizm, poziom regulatorów wzrostu [2, 3]. Obserwuje się także wzrost reaktywnych form tlenu oraz w konsekwencji wzrost aktywności enzymów antyoksydacyjnych oraz peroksydację lipidów, białek i kwasów nukleinowych [4].

Substancje humusowe to nie tylko część składowa gleby, ale także element różnych substancji biologicznie czynnych i czynników indukujących przebieg procesów biochemicznych w komórkach. Są one heterogeniczną mieszaniną, powstałą z różnych materiałów organicznych, poddanych procesowi humifikacji przy udziale drobnoustrojów i czynników fizykochemicznych [5]. Wśród naturalnych substancji humusowych wymienia się różniące się rozpuszczalnością, mobilnością i aktywnością biologiczną kwasy huminowe, kwasy fulwowe i huminy.

Kwasy huminowe mogą mieć zarówno bezpośredni, jak i pośredni wpływ na wzrost roślin. Pośredni związany jest z polepszaniem właściwości gleby, takich jak agregacja, napowietrzenie, przepuszczalność, magazynowanie wody, transport i biologiczna dostępność substancji odżywczych. Wpływ bezpośredni związany jest z dostępem substancji humusowych do tkanek roślinnych i wywoływanie różnych skutków biochemicznych. Kwasy huminowe stymulują u roślin aktywność hormonów wzrostu oraz produkcję przeciwutleniaczy redukujących wolne rodniki, ponadto zwiększają syntezę chlorofilu, a także tolerancję na zewnętrzne czynniki stresogenne. Po zastosowaniu kwasów huminowych obserwowano wzrost całkowitego plonu roślin [2]. Badania prowadzone na kukurydzy [4], pszenicy [2] i rzepaku [3] dowiodły, że kwasy huminowe stosowane dolistnie u roślin wzrastających w warunkach suszy aktywowały antyoksydacyjne enzymatyczne systemy obronne, łagodząc tym samym skutki działania RFT, tj. peroksydację lipidów, białek i kwasów nukleinowych. Ponadto istotnie wpływały na wzrost barwników fotosyntetycznych.

Celem niniejszych badań była ocena wpływu kwasów huminowych zastosowanych dolistnie na aktywność metaboliczną buraka cukrowego *Beta vulgaris* L. w warunkach suszy.

Materiały i metody badań

Materiał roślinny

Badania prowadzono w warunkach laboratoryjnych w trzech wariantach. Wariant pierwszy (kontrolny) stanowiły rośliny buraka cukrowego wzrastające w warunkach optymalnego nawodnienia zraszane wodą, wariant drugi rośliny rosnące w warunkach suszy zwilżane dolistnie wodą, natomiast wariant trzeci rośliny wzrastające w warunkach suszy zwilżane dolistnie roztworem kwasów huminowych (100 cm³ na próbę). Uprawę roślin prowadzono w warunkach fitotronu przez 4 tygodnie (wilgotność 70%, 14 h/10 h, 20°C/16°C dzień/noc odpowiednio). Rośliny podlewano pożywką Knopa raz w tygodniu oraz wodą w objętości zależnej od wariantu doświadczenia.

Kwasy huminowe

W doświadczeniu wykorzystano kwasy huminowe wyekstrahowane z torfu saprowego pobranego z warstwy powierzchniowej gleby (0-20 cm). Ekstrakcję i oczyszczanie

preparatów kwasów huminowych przeprowadzono zgodnie z metodyką opisaną przez Pisarek i in. [5]. Uzyskane w ten sposób preparaty kwasów huminowych były homogeniczne i posiadały formę stałą wykorzystaną do analizy FT-IR (z zastosowaniem spektrometru Nicolet NEXUS Fourier Transformation Infra-Red, Thermo Fisher Scientific, Madison, WI, 2002) i ^1H NMR (z zastosowaniem spektrometru NMR Bruker Ultrashield 400MHz, Germany 2005) w celu określenia ich budowy strukturalnej. Zawartość węgla organicznego w kwasach huminowych oznaczono analizatorem węgla (Analityk Multi N/C 3100, Analytikjena, Germany). Zawartość metali ciężkich (Zn, Pb, Cu, Cr, Ni, Cd, Fe, Mn) w roztworze kwasów huminowych oznaczono metodą AAS (THERMO iCE 3000, China 2002).

Analiza widm FT-IR oraz ^1H NMR kwasów huminowych wskazywała na silnie wyrażony ich alifatyczny charakter oraz dużą liczbę grup metyloowych $-\text{CH}_3$ i metylenowych $-\text{CH}_2$ w ich cząsteczkach, a także obecność alifatycznych połączeń aldehydowych $-\text{CH}_2\text{-CHO}$. Oznaczona zawartość węgla organicznego w zastosowanych w doświadczeniu wodnych roztworach kształtowała się na poziomie $851,76 \text{ mg/dm}^3$, pH roztworu wynosiło 6,5. Zawartość metali ciężkich w roztworze kwasów huminowych [mg/dm^3] wynosiła: Zn: 0,150; Pb: < 0,03; Cd: < 0,03; Cu: 0,6; Ni: < 0,04; Fe: 0,254; Mn: < 0,02; Cr: < 0,4.

Oznaczanie zawartości białka całkowitego

W badanym materiale roślinnym oznaczano zawartość białka rozpuszczalnego metodą Bradforda [6]. Jako standard zastosowano surowiczą albuminę wołową (BSA). Pomiaru absorbancji dokonywano przy długości fali $\lambda = 595 \text{ nm}$. Zawartość białka wyrażano w mg/g świeżej masy (ś.m.).

Ocena aktywności właściwej peroksydazy gwajakolowej

Aktywność właściwą peroksydazy gwajakolowej (GPOX) oznaczano spektrofotometrycznie, używając jako substratów gwajakolu oraz H_2O_2 . W wyniku utlenienia gwajakolu powstaje barwny produkt - tetragwajakol. W celu ekstrakcji enzymu 1 g pędów buraka cukrowego rozcierano w schłodzonym moździerzu razem z 2 cm^3 $0,1 \text{ mol/dm}^3$ buforu fosforanowego o $\text{pH} = 7,0$, następnie przenoszono do probówek wirówkowych i wirowano przy 10 000 obr./min przez 20 minut w temperaturze 4°C . Otrzymany supernatant wykorzystano do oznaczenia zawartości białka oraz aktywności właściwej GPOX. Aktywność właściwą GPOX oznaczano zmodyfikowaną metodą Zaharieva i in. [7]. Do mieszaniny reakcyjnej ($5,0 \text{ cm}^3$), zawierającej $0,1 \text{ mol/dm}^3$ buforu fosforanowego ($\text{pH} = 7,0$), $38 \text{ mmol/dm}^3 \text{ H}_2\text{O}_2$ i 4 mmol/dm^3 gwajakolu, dodawano $0,2 \text{ cm}^3$ supernatantu. Po minucie wykonywano pomiar absorbancji przy długości fali $\lambda = 470 \text{ nm}$. Aktywność właściwą GPOX obliczano, wykorzystując molowy współczynnik absorpcji tetragwajakolu równy $26,6 \text{ dm}^3 \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ i wyrażano w $\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mg białka})$.

Badanie peroksydacji lipidów

Peroksydację lipidów wyrażano jako stężenie dialdehydu malonowego (MDA) oznaczanego w reakcji z kwasem tiobarbiturowym (TBA) [8]. W tym celu $0,3 \text{ g}$ pędów

buraka cukrowego rozcierano w moździerz z 4 cm³ 0,25% TBA w 10% kwasie trichlorooctowym (TCA). Homogenat przenoszono do probówek i ogrzewano w 95°C przez 30 minut, a następnie schładzano w wodzie z lodem i wirowano przy 10 000 obr./min przez 10 minut w temperaturze pokojowej. Wykonano pomiar absorbancji supernatantu przy długościach fali $\lambda = 532$ nm i $\lambda = 600$ nm. Stężenie MDA obliczono, wykorzystując molowy współczynnik absorpcji kompleksu MDA-TBA równy 155 dm³·mmol⁻¹·cm⁻¹ i wyrażano w $\mu\text{mol/g}$ świeżej masy [9].

Oznaczenie zawartości chlorofilu a i b

Zawartość chlorofilu *a* i *b* oznaczano metodą ekstrakcji acetonowej [10]. W tym celu 0,3 g pędów buraka cukrowego rozcierano w schłodzonym moździerz z 5 cm³ 80% acetonu. Homogenat przenoszono do probówek i wirowano przy 10 000 obr./min przez 10 minut w temperaturze 4°C. Przeprowadzono pomiar absorbancji przy długości fali $\lambda = 645$ nm i $\lambda = 663$ nm. Zawartość chlorofilu *a* i *b* wyrażono w mg/g świeżej masy.

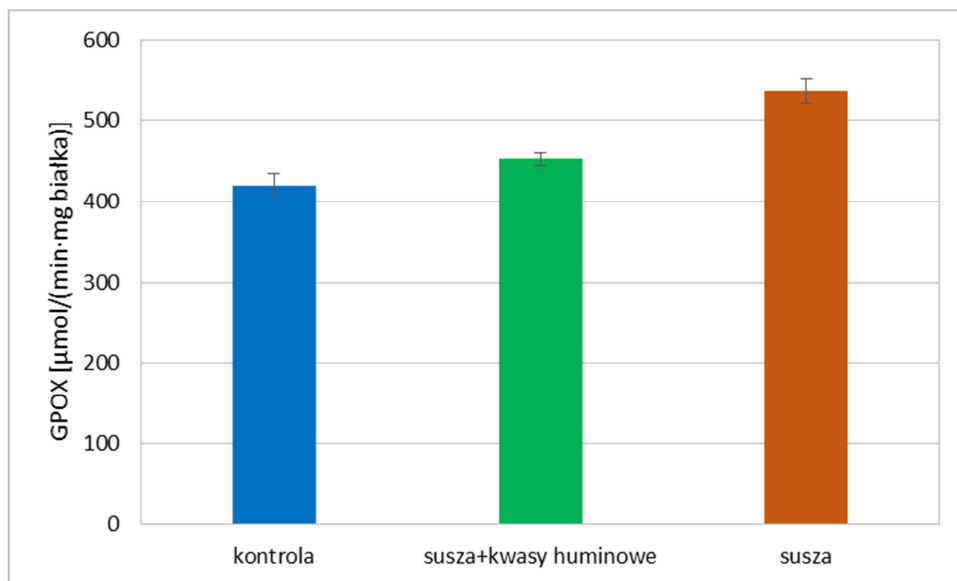
Analiza statystyczna

Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej za pomocą testu t-Studenta oraz jednoczynnikowej analizie wariancji (ANOVA) przy użyciu programu Microsoft Excel, przyjmując wyniki za istotne statystycznie na poziomie $p < 0,05$.

Wyniki

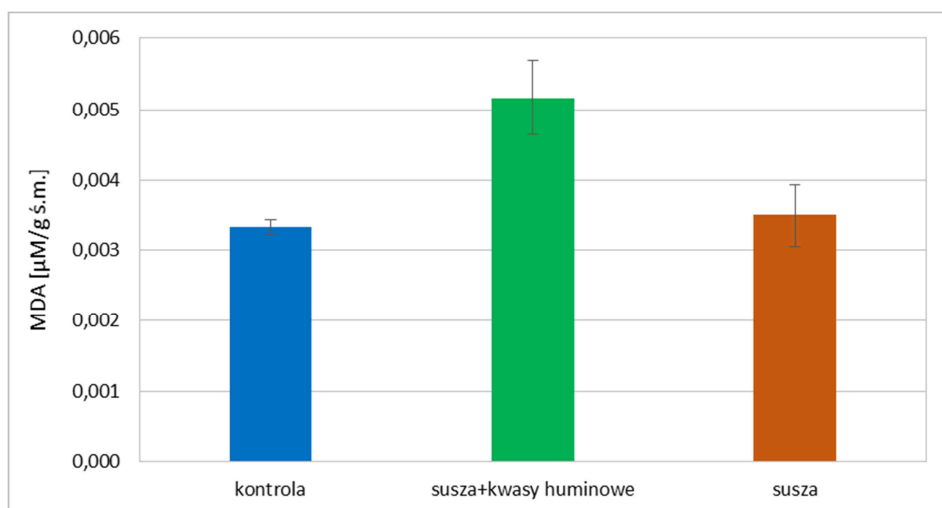
Wyniki ujawniły, że u roślin buraka cukrowego wzrastających w warunkach suszy istotnie zwiększyła się aktywność właściwa peroksydazy gwajakolowej GPOX. Jednocześnie zaobserwowano, że u roślin wzrastających w warunkach suszy zastosowanie kwasów huminowych obniżyło aktywność enzymu GPOX i tym samym zahamowało antyoksydacyjne mechanizmy obronne roślin (rys. 1).

Dialdehyd malonowy (MDA) jest jednym z produktów utleniania lipidów błonowych i głównym markerem peroksydacji lipidów. Jego stężenie mocno wzrasta, kiedy zawodzi w komórce mechanizmy obrony antyoksydacyjnej. Tempo reakcji utleniania związków lipidowych w komórkach roślinnych determinowane jest nie tylko czynnikami fizycznymi (ilość tlenu, temperatura, światło), ale także obecnością metali ciężkich (Cu, Fe, Mn), wody oraz innych składników nielipidowych. Zastosowane w doświadczeniu kwasy huminowe były skompleksowane z metalami ciężkimi, w tym Zn, Cu, Fe. Ich oddziaływanie na metabolizm żywych komórek obejmuje zarówno procesy biosorpcji, jak i adsorpcji anionowych ugrupowań metalu w wyniku protonowania grup funkcyjnych składników organicznych. Tworzące się w tych warunkach wolne rodniki stają się bardzo reaktywne i, reagując z innymi wolnymi rodnikami, tworzą nierodnikowe produkty utleniania lipidów [11]. Wyniki ujawniły, że warunki uprawy buraka cukrowego miały wpływ na stopień peroksydacji lipidów (rys. 2). Stwierdzono brak istotnej różnicy w stężeniu MDA pomiędzy roślinami buraka cukrowego z próby kontrolnej a roślinami wzrastającymi w warunkach suszy. Zaobserwowano natomiast istotny wzrost stężenia MDA w pędach buraka wzrastającego w warunkach niedoboru wody zraszanego dolistnie roztworem kwasów huminowych. Ponadto wyniki ujawniły, że warunki uprawy buraka cukrowego nie miały wpływu na zawartość w pędach chlorofilu *a* i *b* (rys. 3).



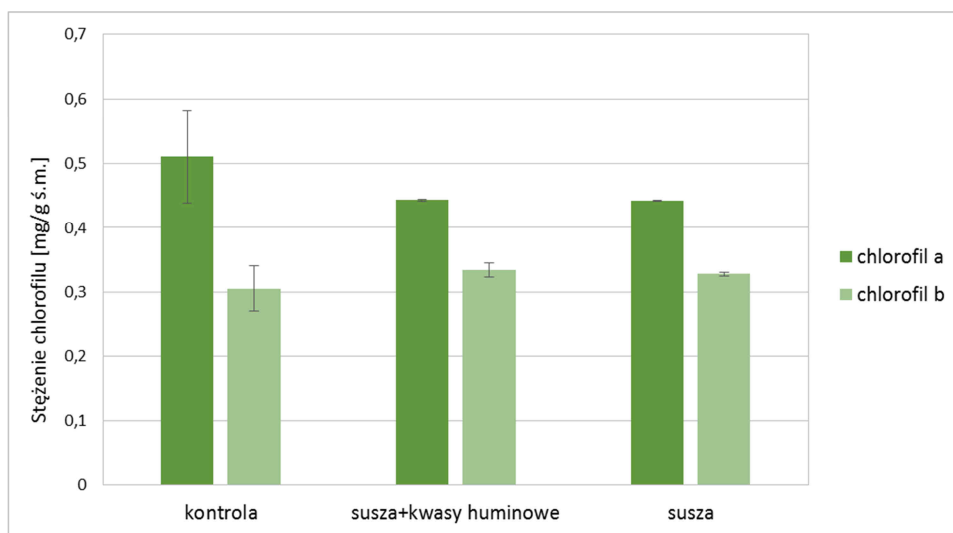
Rys. 1. Aktywność właściwa peroksydazy gwajakolowej (GPOX) w pędach buraka cukrowego (słupki oznaczają błąd standardowy; różnice istotne statystycznie na poziomie $p = 0,002$ (ANOVA))

Fig. 1. The specific activity of guaiacol peroxidase (GPOX) in the shoots of sugar beet (bars represent standard errors of the means; statistically significant differences $p = 0.002$ (ANOVA))



Rys. 2. Stężenie dialdehydu malonowego (MDA) w pędach buraka cukrowego (słupki oznaczają błąd standardowy; różnice istotne statystycznie $p = 0,03$ (ANOVA))

Fig. 2. Malondialdehyde (MDA) content in the shoots of sugar beet (bars represent standard errors of the means; statistically significant differences $p = 0.03$ (ANOVA))



Rys. 3. Stężenie chlorofilu w pędach buraka cukrowego (słupki oznaczają błąd standardowy; brak różnic istotnych statystycznie $p = 0,5$ (Chl *a*) i $p = 0,6$ (Chl *b*) (ANOVA))

Fig. 3. The chlorophyll concentration in the shoots of sugar beet (bars represent standard errors of the means; no statistically significant differences $p = 0.5$ (Chl *a*) and $p = 0.6$ (Chl *b*) (ANOVA))

Podsumowanie i wnioski

W prezentowanych badaniach oceniano wpływ kwasów huminowych na aktywność metaboliczną buraka cukrowego. Badania przeprowadzono w trzech wariantach. Wariant pierwszy (kontrolny) stanowiły rośliny wzrastające w warunkach optymalnego nawodnienia zraszane dolistnie wodą, wariant drugi rośliny rosnące w warunkach suszy również zraszane wodą, natomiast wariant trzeci rośliny wzrastające w warunkach suszy zraszane dolistnie roztworem kwasów huminowych. W pędach buraków cukrowego, po czterotygodniowej uprawie, oznaczano stężenie białka rozpuszczalnego metodą Bradforda, aktywność właściwą antyoksydacyjnego enzymu - peroksydazy gwajakolowej oraz stężenie dialdehydu malonowego - głównego markera peroksydacji lipidów. Uzyskane wyniki ujawniły, że warunki uprawy buraka cukrowego miały wpływ na aktywność właściwą peroksydazy gwajakolowej oraz stężenie dialdehydu malonowego w pędach buraka cukrowego, natomiast nie stwierdzono wpływu warunków uprawy na zawartość w badanym materiale roślinnym chlorofilu *a* i *b*. Zaobserwowano, że u roślin wzrastających w warunkach suszy dolistne zastosowanie kwasów huminowych nie zwiększa aktywności GPOX i w konsekwencji prowadzi do wzrostu stężenia dialdehydu malonowego, wskazującego na nasilony proces peroksydacji lipidów błonowych. Można przypuszczać, że u roślin tego wariantu doświadczenia brak wzrostu aktywności POX wskazuje na hamowanie przez kwasy huminowe pierwszej enzymatycznej linii obrony przed czynnikiem stresogennym, jakim jest susza. Przeprowadzone badania wskazują, iż zastosowana frakcja kwasów huminowych, o zdefiniowanych właściwościach (opisanych w części *Materiały i metody badań*), wpływa niekorzystnie na procesy

fizjologiczne buraka cukrowego w warunkach stresu abiotycznego spowodowanego suszą. Jednocześnie, budowa strukturalna kwasów huminowych ekstrahowanych z różnych materiałów jest modyfikowana jakością środowiska, w którym powstają. Jak wskazują badania [5], kwasy humusowe mogą zawierać duże ilości zmiataczy wolnych rodników, w zależności od kierunku transformacji materii organicznej, co może mieć pierwszorzędne znaczenie w kierowaniu procesami rozkładu substancji organicznych w glebie i jednocześnie sprzyjać pozyskiwaniu takich frakcji substancji humusowych, których oddziaływanie na biosferę będzie przyczyniało się do zwiększenia odporności powodowanej stresem biotycznym i abiotycznym.

Literatura

- [1] Pasternak T, Potters G, Caubergs R, Jansen MAK. Complementary interactions between oxidative stress and auxins control plant growth responses at plant, organ and cellular level. *J Exp Bot.* 2005;56:1991-2001. DOI: 10.1093/jxb/eri196.
- [2] El-Bassiouny HSM, Bakry AB, Abd El-Monem Attia A, Abd Allah MM. Physiological role of humic acid and nicotinamide on improving plant growth, yield, and mineral nutrient of wheat (*Triticum durum*) grown under newly reclaimed sandy soil. *Agric Sci.* 2014;5:687-700. DOI: 10.4236/as.2014.58072.
- [3] Lotfi R, Gharavi-Kouchebagh P, Khoshvaghti H. Biochemical and physiological responses of *Brassica napus* plants to humic acid under water stress. *Russ J Plant Physiol.* 2015;62(4):480-486. DOI: 10.1134/S1021443715040123.
- [4] Moghadam HRT. Humic acid as an ecological pathway to protect corn plants against oxidative stress. *Biol Forum Int J.* 2015;7:1704-1709. <http://www.researchtrend.net/bfij/bf12/269%20HAMID%20REZA%20TOHIDI%20MOGHADAM.pdf>.
- [5] Pisarek I, Pytel B, Filipiak A, Engel G, Olchawa R, Man D, et al. The influence of natural and model forms of humic acids on the dynamic parameters of model membranes. *Ecol Chem Eng S.* 2016; 23(4): 677-695. DOI: 10.1515/eces-2016-0049.
- [6] Bradford MM. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248-254. DOI: 10.1016/0003-2697(76)90527-3.
- [7] Zaharieva T, Yamashita K, Matsumoto H. Iron deficiency induced changes in ascorbate content and enzyme activities related to ascorbate metabolism in cucumber roots. *Plant Cell Physiol.* 1999;40:273-280.
- [8] Heath RL, Packer L. Photoperoxidation in isolated chloroplast. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Arch Biochem Biophys.* 1968;125:189-198. DOI: 10.1016/0003-9861(68)90654-1.
- [9] Ibrahim MM, Bafeel SO. Alteration of gene expression, superoxide anion radical and lipid peroxidation induces by lead toxicity in leaves of *Lepidium sativum*. *J Anim Plant Sci.* 2009;4:281-288. <http://www.m.elewa.org/JAPS/2009/4.1/6.pdf>.
- [10] Arnon DI. Copper enzymes in isolated chloroplasts, polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.* 1949;24:1-5. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC437905/pdf/plntphys00263-0011.pdf>.
- [11] Dąbrowska M, Zielińska MA, Nowak I. Lipid oxidation products as a potential health and analytical problem. *Chemik.* 2015;69(2):89-94. <http://www.chemikinternational.com/year-2015/lipid-oxidation-products-as-a-potential-health-and-analytical-problem/>.

THE EFFECT OF HUMIC ACIDS ON METABOLIC ACTIVITY OF SUGAR BEET UNDER DROUGHT CONDITIONS

¹ Chair of Biotechnology and Molecular Biology, University of Opole

² Department of Land Protection, University of Opole

Abstract: Reactive oxygen species (ROS) are the byproducts of many metabolic processes and their production is increased under number of environmental factors. In certain concentration range, the presence of ROS is necessary to maintain proper cell function. Thus, cells have many mechanisms, which role is focused on

maintaining a constant concentration of ROS. Imbalance between the formation and action of a protective antioxidant system leads to oxidative stress. Drought is a major limiting factor for plant growth and development. At the same time studies have shown that humic acids foliar application moderated the negative effects of water deficient through activation of the enzymatic antioxidant systems. The aim of the study was to evaluate the effect of humic acid foliar application on the metabolic activity of sugar beet *Beta vulgaris* L. under drought conditions. Studies were conducted under laboratory conditions. In the plants of sugar beet were determined the specific activity of guaiacol peroxidase (GPOX), lipid peroxidation and chlorophyll *a* and *b* content. The results revealed that the humic acid foliar application in plants growing under drought conditions does not increase the specific activity GPOX compared to plants watered regularly. At the same time, found an increase in the degree of lipid peroxidation in these plants. There was no impact of growing conditions on the content of chlorophyll *a* and *b* in the studied plants.

Keywords: oxidative stress, humic acid, sugar beet