

Dariusz Kłódka*, Arkadiusz Telesiński*, Justyna Mroczek, Anita Komsta*****

**ZMIANY ZAWARTOŚCI KWASU ASKORBINOWEGO, GLUTATIONU,
FLAWONOIDÓW ORAZ ZWIĄZKÓW FENOLOWYCH W WYBRANYCH
GATUNKACH ROŚLIN W ZALEŻNOŚCI OD STOPNIA UTLENIEŃIA
SELENU DODANEGO DO PODŁOŻA**

CZĘŚĆ I. ROŚLINY JEDNOLIŚCIENNE

**CHANGES OF THE CONTENT OF THE ASCORBIC ACID, THE
GLUTATHIONE, FLAVONOIDS AND PHENOLIC COMPOUNDS IN
CHOSEN SPECIES OF PLANTS DEPENDING ON THE VALENCY OF
THE SELENIUM ADDED TO THE SUBSTRATE**

PART I. MONOCOTYLEDONS

Słowa kluczowe: selen, rośliny jednoliścienne, kwas askorbinowy, glutation, fenole, flawonoidy.

Key words: selenium, monocotyledons, ascorbic acid, glutathione, phenols, flavonoids.

On the job investigated the influence of the selenic acid (IV) and (VI) on the content of the ascorbic acid, the glutathione, phenols and flavonoids in four species of monocotyledons of the wheat, the corn, the millet and the oat. To analyses one received fortnightly seedling growing on the full medium Hoaglands. Obtained results show that the selenium does not stay without the influence on the vegetable metabolism. Results show that the selenium was been able to be a stressor for plants. The height of the content of investigated compounds can testify about the appearance in plants of the oxidative stress.

More negative impact called out the selenium on +VI valency than the selenium on +IV valency.

* *Dr inż. Dariusz Kłódka, dr inż. Arkadiusz Telesiński – Katedra Biochemii, Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie, ul. Słowackiego 17, 71-434 Szczecin; tel.: 91 449 62 80; e-mail: dariusz.klodka@zut.edu.pl*

** *Mgr inż. Justyna Mroczek – ul. Słowackiego 72c, 69-110 Rzepin.*

****Mgr inż. Anita Komsta – ul. Piaskowa 5B/12, 72-010 Police.*

1. WPROWADZENIE

Selen należy do pierwiastków częściowo niezbędnych dla roślin [Kabata-Pendias, Pendias 1999]. Charakteryzuje go bardzo mała granica bezpieczeństwa między niedoborem a dawką toksyczną [Żbikowska 1997]. Selen może być wbudowywany w cysteinę roślin selenolubnych i w metioninę roślin o niskiej tolerancji w stosunku do tego pierwiastka [Stadtman 1980].

W zależności od zdolności roślin do pobierania selenu z gleby Jurkowska [1996] zaproponowała w tym względzie podział na trzy zasadnicze grupy:

- rośliny selenolubne,
- rośliny, które bez szkody mogą pobierać znaczne ilości selenu

oraz

- rośliny o niskiej tolerancji w stosunku do tego pierwiastka.

Rośliny zbożowe zawierają na ogół małe ilości selenu, a przy dużej dostępności w glebie łatwo go pobierają [Borkowska 1994]. Dostępność selenu dla roślin natomiast zależy między innymi od formy, w jakiej ten pierwiastek występuje w glebie, a w formach rozpuszczalnych zależy również od całkowitej zawartości selenu w glebie [Zabłocki 1990, Zabłocki 1994].

Zbyt duża zawartość selenu może być przyczyną powstania u roślin stresu oksydacyjnego, a zmniejszona podaż może przyczynić się do obniżenia aktywności peroksydazy glutationowej, odpowiedzialnej za obronę komórki przez RFT [Strączyk, Drobnica 2001]. Nieenzymatycznymi antyutleniaczami o podobnym znaczeniu mogą być askorbinian i glutation występujące w cyklu Halliwell'a-Asady [Malenić i in. 2003]. Zbliżoną rolę mogą pełnić polifenole roślinne, a wśród nich flawonoidy, których podwyższona zawartość w komórkach roślinnych może świadczyć o narażeniu roślin na warunki stresowe [Winkel-Shirley 2002].

W świetle powyższych danych słusznym wydaje się określenie roli, jaką odgrywa selen na różnym stopniu utlenienia w kształtowaniu zawartości kwasu askorbinowego, glutationu, flawonoidów i fenoli w wybranych gatunkach roślin jednoliściennych. To właśnie jest celem niniejszej pracy.

2. MATERIAŁ I METODY

Materiał badawczy stanowiły cztery gatunki roślin jednoliściennych:

- pszenica jara odmiany Kobra (*Triticum vulgare*),
- owies (*Avena sativa*),
- kukurydza (*Zea mays*)

oraz

- proso (*Panicum miliaceum*).

W celu eliminacji czynników edaficznych doświadczenie przeprowadzono na pełnych pożywkach przygotowanych zgodnie z procedurą Hoaglanda. Dla każdej z roślin przygotowano trzy grupy badawcze:

- kontrolną (bez dodatku selenu),
- zawierającą Se^{IV} (H_2SeO_3) w ilości $0,05 \text{ mM} \cdot \text{dm}^{-3}$

oraz

- zawierającą Se^{VI} (H_2SeO_4) w ilości $0,05 \text{ mM} \cdot \text{dm}^{-3}$.

Do polietylenowych kubeczków zawierających odpowiednio przygotowane pożywki wysiano po 0,25 g nasion prosa, 0,25 g nasion pszenicy, 0,25 g nasion owsa i 4 sztuki nasion kukurydzy. W czasie doświadczenia rośliny były oświetlane lampą sodową Son-T-Agro-400W firmy Philips, o natężeniu promieniowania na poziomie pożywki $90 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ PAR, przy fotoperiodyzmie 12 godzin dnia i nocy. Po dwóch tygodniach od momentu siewu pobierano części zielone roślin i oznaczano w nich spektrofotometrycznie zawartość kwasu askorbinowego, glutationu zredukowanego, flawonoidów i fenoli. W celu ekstrakcji kwasu askorbinowego i glutationu z tkanek roślinnych zastosowano roztwór EDTA 0,5 mM, z dodatkiem 3% TCA. Zawartość kwasu askorbinowego oznaczano z dichlorofoenoloindofenolem przy długości fali 600 nm, a zawartość glutationu z DTNB przy długości fali 412 nm [Guri 1983].

Fenole ekstrahowano z tkanek roślinnych przy użyciu 80-procentowego roztworu acetonu i oznaczano przy długości fali 760 nm, metodą Singletona i Samuela-Raventos [1999]. Flawonoidy oznaczano metodą Woisky i Salatino [1998], stosując jako ekstrahent 80-procentowy roztwór metanolu.

Wszystkie analizy wykonano w trzech powtórzeniach, a uzyskane wyniki poddano dwuczynnikowej analizie wariancji w układzie kompletnej randomizacji. Wartości $\text{NIR}_{0,05}$ obliczono zgodnie z procedurą Tukey'a. Obliczono również współczynniki korelacji liniowej Pearsona pomiędzy zawartością oznaczanych związków w roślinach rosnących na pożywkach z dodatkiem selenu na różnym stopniu utlenienia oraz bez dodatku tego pierwiastka.

3. WYNIKI I DYSKUSJA

Zawartość flawonoidów w badanych roślinach była wyraźnie zależna od dostępności selenu w pożywce, przy czym rośliny rosnące na pożywkach z selenem zawsze charakteryzowała większa zawartość flawonoidów. Stwierdzono również, że zawartość flawonoidów w roślinach była zawsze większa po zastosowaniu Se^{VI} niż po zastosowaniu Se^{IV} (tab. 1). Zależność ta widoczna była zwłaszcza w roślinach pszenicy, gdzie zawartość flawonoidów w kombinacji z Se^{VI} była dwa razy większa niż w roślinach kontrolnych. Uzyskane wyniki mogą potwierdzać tezę zaproponowaną przez Winkel-Shirley [2002], w myśl której rośliny narażone na warunki stresowe, w tym wypadku na zwiększoną zawartość selenu w po-

żywkach, zareagowały zwiększeniem akumulacji flawonoidów w częściach wegetatywnych. Podobne zależności odnotowano analizując zawartość fenoli w badanych roślinach, przy czym w tym wypadku zawartość fenoli po zastosowaniu Se^{+IV} i Se^{+VI} była zawsze większa niż w roślinach kontrolnych, ale tym razem rośliny rosnące na pożywce z Se^{+IV} miały większą zawartość fenoli niż te rosnące na pożywkach z dodatkiem Se^{+VI} . Wyjątek stanowiła pszenica, w której zawartość fenoli we wszystkich trzech kombinacjach utrzymywała się na podobnym poziomie.

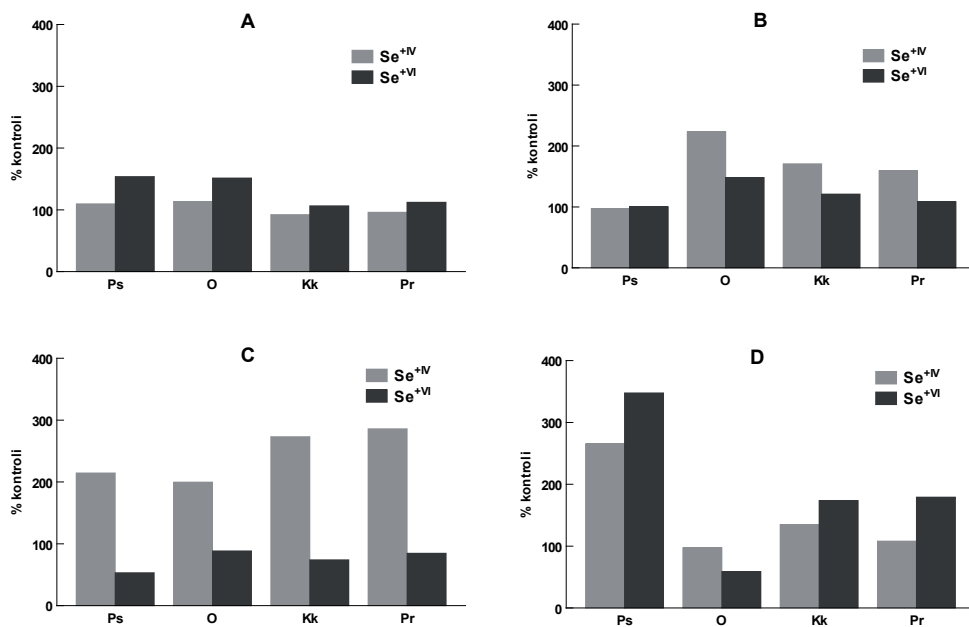
Tabela 1. Zmiany zawartości nieenzymatycznych antyutleniaczy w różnych gatunkach roślin w zależności od stopnia utlenienia wprowadzonego do podłoża selenu

Table 1. Changes of nonenzymatic antioxidants content in chosen plant species depending on the valency of the selenium added to the substrate

Stopień utlenienia selenu (B)	Zawartość nieenzymatycznych antyutleniaczy w wybranych gatunkach roślin				Zawartość średnia
	pszenica jara (<i>Triticum aestivum</i>)	owies (<i>Avena sativa</i>)	kukurydza (<i>Zea mays</i>)	proso (<i>Panicum miliaceum</i>)	
Flawonoidy [mg kwercetyny · g ⁻¹ ś.m. roślin]					
Kontrola	1,398	1,229	1,609	1,394	1,405
Se^{+IV}	1,535	1,395	1,485	1,340	1,439
Se^{+VI}	2,150	1,861	1,712	1,565	1,822
Średnia	1,691	1,495	1,602	1,433	1,555
NIR _{0,05}	A = 0,033 B = 0,022		A x B = 0,052 B x A = 0,058		
Fenole [mg kwasu galusowego · g ⁻¹ ś.m. roślin]					
Kontrola	0,358	0,232	0,305	0,283	0,294
Se^{+IV}	0,349	0,518	0,521	0,451	0,459
Se^{+VI}	0,359	0,344	0,369	0,307	0,355
Średnia	0,355	0,504	0,398	0,347	0,370
NIR _{0,05}	A = 0,013 B = 0,010		A x B = 0,020 B x A = 0,022		
Glutation [mg · g ⁻¹ ś.m. roślin]					
Kontrola	0,380	0,389	0,294	0,157	0,305
Se^{+IV}	0,815	0,777	0,803	0,449	0,711
Se^{+VI}	0,202	0,344	0,218	0,133	0,224
Średnia	0,466	0,504	0,438	0,246	0,413
NIR _{0,05}	A = 0,036 B = 0,028		A x B = 0,057 B x A = 0,063		
Kwas askorbinowy [mg · g ⁻¹ ś.m. roślin]					
Kontrola	0,675	0,693	0,726	0,672	0,691
Se^{+IV}	1,792	0,674	0,979	0,726	1,043
Se^{+VI}	2,347	0,408	1,261	1,204	1,305
Średnia	1,605	0,592	0,989	0,868	1,013
NIR _{0,05}	A = 0,080 B = 0,063		A x B = 0,125 B x A = 0,138		

Analizując uzyskane w doświadczeniu wyniki można stwierdzić, że dodatek do pożywki selenu w +IV stopniu utlenienia wyraźnie wpłynął na zawartość glutationu w badanych roślinach. Zawartość glutationu w roślinach pszenicy i owsa po zastosowaniu Se^{+IV} była dwukrotnie większa w porównaniu do zawartości tego związku w roślinach kontrolnych i nawet prawie trzy razy większa w roślinach kukurydzy i prosa (rys. 1).

Uzyskano zupełnie odwrotne zależności po zastosowaniu Se^{+VI} . Zawartość glutationu we wszystkich roślinach rosnących na pożywce z Se^{+VI} była niższa w porównaniu z zawartością tego peptydu w roślinach kontrolnych.



Rys. 1. Procentowe zmiany zawartości flawonoidów (A), fenoli (B), glutationu (C) i kwasu askorbinowego (D) w różnych gatunkach roślin w zależności od stopnia utlenienia wprowadzonego do podłoża selenu (kontrola = 100%); Ps – pszenica, O – owies, Kk – kukurydza, Pr – proso

Fig. 1. Percentage changes of flavonoids (A), phenols (B), glutathione (C) and ascorbic acid (D) content in chosen plant species depending on the valency of the selenium added to the substrate (control = 100%); Ps – wheat, O – oat, Kk – corn, Pr – millet

Zawartość kwasu askorbinowego we wszystkich czterech roślinach rosnących na pożywce bez dodatku selenu była podobna i kształtowała się na poziomie $0,675\text{--}0,726\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ (tab. 1). Wyraźny wzrost zawartości kwasu askorbinowego widoczny był po zastosowaniu

obu form selenu na rośliny pszenicy, gdzie po zastosowaniu Se^{+IV} stwierdzono ponad dwukrotny, a po zastosowaniu Se^{+VI} ponad trzykrotny, wzrost zawartości tego związku w tkankach roślinnych. Taki wynik może być spowodowany według Zabłockiego [1990] lepszą dostępnością dla roślin selenu na +VI stopniu utlenienia, ale również większą jego szkodliwością, co może przekładać się na podwyższoną w tym wypadku zawartość kwasu askorbinowego oraz flawonoidów.

Obliczone współczynniki korelacji liniowej Pearsona wskazują na wyraźną istotną dodatnią korelację pomiędzy zawartością flawonoidów i glutationu (0,758) oraz kwasu askorbinowego (0,782) i ujemną istotną korelację pomiędzy zawartością fenoli i kwasu askorbinowego (-0,843) po wprowadzeniu do żywek dodatku selenu na +IV stopniu utlenienia (tab. 2). Choć rośliny bardziej reagowały za zawartość Se^{+VI} w podłożu, to jednak nie stwierdzono wielu istotnych zależności pomiędzy zawartością oznaczanych w pracy związków. Jedynie pomiędzy zawartością fenoli i kwasu askorbinowego stwierdzono istotną dodatnią korelację (0,790) po zastosowaniu do żywki dodatku Se^{+VI} (tab. 2).

Tabela 2. Współczynniki korelacji liniowej Pearsona pomiędzy zawartością w roślinach dwulściennych nieenzymatycznych antyutleniaczy w zależności od stopnia utlenienia dodanego do podłoża selenu

Table 2. Pearson linear correlation coefficients among the nonenzymatic antioxidants content depending on the valency of the selenium added to the substrate

Antyoksydant		Flawonoidy	Fenole	Glutation	Kwas askorbinowy
Kontrola	Flawonoidy		0,489	-0,321	0,252
	Fenole			0,050	-0,323
	Glutation				0,101
	Kwas askorbinowy				
Se^{+IV}	Flawonoidy		-0,430	0,758*	0,782*
	Fenole			0,009	-0,843*
	Glutation				0,458
	Kwas askorbinowy				
Se^{+VI}	Flawonoidy		0,492	0,333	0,561*
	Fenole			0,790*	-0,223
	Glutation				-0,560
	Kwas askorbinowy				

* Istotne na poziomie $p = 0,05$.

W literaturze brak jest jednoznacznych doniesień o wpływie selenu na metabolizm roślin, a rola tego pierwiastka w komórkach roślinnych nie jest do końca poznana [Jurkowska 1996]. Choć niektóre rośliny mogą pobierać ten pierwiastek w znacznej mierze bez szkody, to jednak nadmiar selenu w większości roślin może wywołać niedobory składników pokarmowych, głównie Mn, Zn, Cu i Fe, a także powodować zaburzenia w organogenezie i wzroście, a także w syntezie kwasów nukleinowych i białek, co może być związane z moż-

liwością zastępowania siarki w aminokwasach [Jurkowska 1996, Kabata-Pendias, Pendias 1999, Pazurkiewicz-Kocot, Galus 2002]. Kąklewski i inni [2008] wykazali, że nadmiar selenu w tkankach roślin pszenicy może powodować zmniejszenie aktywności peroksydazy askorbinianowej oraz zwiększenie aktywności reduktazy glutationowej. W celu lepszego poznania mechanizmów wpływu selenu na metabolizm roślinny niezbędne jest prowadzenie dalszych badań w tym zakresie.

4. WNIOSKI

1. Zawartość flawonoidów, fenoli, glutationu i kwasu askorbinowego w badanych roślinach jednoliściennych zależna była od dostępności selenu w podłożu.
2. Selen w +IV i +VI stopniu utlenienia w dawce $0,05 \text{ mM} \cdot \text{dm}^{-3}$ może być przyczyną powstania stresu oksydacyjnego w badanych roślinach, czego wyrazem jest podwyższona zawartość badanych nieenzymatycznych antyutleniaczy.
3. Bardziej wyrazisty wpływ na zawartość badanych nieenzymatycznych antyutleniaczy wywarł selen w +VI stopniu utlenienia.
4. Wskazane jest prowadzenie dalszych badań w celu określenia wpływu selenu na rośliny.

PIŚMIENICTWO

- BORKOWSKA K. 1994. Selen w glebach i roślinach z wybranej plantacji lucerny. Zesz. Probl. Postęp. Nauk. Roln. 414: 57–62.
- GURI A. 1983. Variation in glutathione and ascorbic acid content among selected cultivars of *Phaseolus vulgaris* prior to and after exposure to ozone. Can. J. Plant Sci. 63: 733–737.
- JURKOWSKA H. 1996. Selen w glebach i roślinach. Wszechświat 97(2): 29–32.
- KABATA-PENDIAS A., PENDIAS H. 1999. Biogeochemia pierwiastków śladowych. Wyd. PWN, Warszawa.
- KĄKLEWSKI K., NOWAK J., LIGOCKI M. 2008. Effects of selenium content in Green parts of plants on the Mount of ATP and ascorbate-glutathione cycle enzyme activity at various growth stages of wheat and oilseed rape. J. Plant. Physiol. 165: 1011–1022.
- MALEŃCÍĆ D., POPOVIĆ M., MILADINOVIĆ J. 2003. Stress tolerance parameters in different genotypes of soybean. Biol. Plant. 46(1): 141–143.
- PAZURKIEWICZ-KOCOT K., GALAS W. 2002. Zależność pomiędzy akumulacją K, Na i Ca w tkankach siewek *Zea mays* L. a stężeniem SeO_2 i NaHSeO_3 w środowisku zewnętrznym. Zesz. Probl. Postęp. Nauk. Roln. 481: 545–551.
- SINGLETON V.L., SAMUEL-RAVENTOS R.M. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates in antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. Meth. Enzymol. 229: 213–219.

- STADTMAN T.C. 1980. Selenium – dependent enzymes. *Ann. Rev. Biochem.* 49: 93–110.
- STRĄCZYK D., DROBNICA L. 2001. Selen w roślinach i jego wpływ na zdrowie. *Ekopartner* 115(5): 14.
- WINKEL-SHIRLEY B. 2002. Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5: 218–223.
- WOISKY R.G., SALATINO A. 1998. Analysis of propolis: Some parameters and procedures for chemical quality control. *J. Agric. Res.* 37: 99–105.
- ZABŁOCKI Z. 1990. Selen w glebach i roślinach Pomorza Zachodniego. Wyd. Akademii Rolniczej w Szczecinie. *Rozprawy* 124.
- ZABŁOCKI Z. 1994. Porównanie zawartości selenu w glebach, roślinach i odciekach drenarskich. Arsen i selen w środowisku – problemy ekologiczne i metodyczne. *Matériały z seminarium*. Wyd. PAN, Warszawa.
- ŻBIKOWSKA H. 1999. Roślinne dysmutazy ponadtlenkowe. *Kosmos* 1: 87–93.