

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

**ZMIANY ZAWARTOŚCI KWASU ASKORBINOWEGO, GLUTATIONU,  
FLAWONOIDÓW ORAZ ZWIĄZKÓW FENOLOWYCH W WYBRANYCH  
GATUNKACH ROŚLIN W ZALEŻNOŚCI OD STOPNIA UTLENIEŃ  
SELENU DODANEGO DO PODŁOŻA  
CZĘŚĆ II. ROŚLINY DWULIŚCIENNE**

**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 II. DICOTYLEDONS**

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

**Key words:** selenium, dicotyledons, ascorbic acid, glutathione, phenols, flavonoids.

*This paper presents results of selenic acid (IV) and (VI) effects on the content of the ascorbic acid, the glutathione, phenols and flavonoids in five species of dicotyledons of the coriander, the St. John's wort, the pea, the bean and the agrimony. To analyses one received fortnightly seedling growing on the full medium Hoaglands with addition of 0.05 mM selenium on the valency +IV and +VI. The plants grown in medium without selenium were control.*

*Glutathione, ascorbic acid, total flavonoids and total phenols content was calorimetrically assayed in green parts of plants.*

---

\* *Dr inż. Arkadiusz Telesiński, dr inż. Dariusz Kłódka – Katedra Biochemii, Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie, ul. Słowackiego 17, 71-134 Szczecin; tel.: 91 449 62 84; e-mail: arkadiusz.telesinski@zut.edu.pl;*

\*\* *Mgr inż. Anita Komsta – ul. Piaskowa 5B/12, 72-010 Police; tel.: 91 449 62 84;*

\*\*\**Mgr inż. Justyna Mroczek – ul. Słowackiego 72c, 69-110 Rzepin; tel.: 91 449 62 84*

*Obtained results show does not stay without the influence on the vegetable metabolism. Results show that the selenium was been able to be a stressor for plants. Pea plants were the most sensitive to presence of selenium in medium. Selenium could be also very toxic for some plant species, for example the bean and the coriander. The seeds of these plant species did not germinate in medium with selenium addition.*

## 1. WPROWADZENIE

W wyniku biogeochemicznych procesów migracji selenu w biosferze występuje zjawisko kumulacji tego pierwiastka w organizmach roślinnych oraz zwierzęcych [Bielak, Pasternak 1999]. O zawartości selenu w tkankach roślinnych w dużym stopniu decyduje jego zawartość w glebie [Koutnik, Fleisch 1998]. Pierwiastek ten może występować w glebie zarówno w postaci selenianów (VI), selenianów (IV), jak i selenu elementarnego, selenków lub w formie związków organicznych [Borowska 1994, Jurkowska 1996].

Forma, w jakiej selen występuje w podłożu, ma znaczący wpływ na jego dostępność dla roślin. Rośliny mogą pobierać selen w formie selenianów (IV), a także w formie selenianów (VI). Na pobieranie selenu ma również duży wpływ zarówno gatunek, jak i odmiana rośliny [Borkowski, Dyki 2006].

Wielu autorów podaje, że rola selenu w roślinach nie jest jeszcze do końca poznana [Wachowicz 1993, Jurkowska 1996]. Sporo roślin odznacza wysoka tolerancja w stosunku do tego pierwiastka i nawet jego bardzo wysokie stężenia w środowisku nie powodują w nich zauważalnych zmian.

Pozytywna biologiczna rola selenu jest związana przede wszystkim z jego występowaniem w aktywnym centrum peroksydazy glutationowej [Bartosz 1997]. Peroksydaza glutationowa stanowi jeden ze składników systemu obronnego komórki przed reaktywnymi formami tlenu – RFT.

W przeciwieństwie do większości pierwiastków śladowych w odniesieniu do selenu granica bezpieczeństwa między niedoborem a dawką toksyczną jest bardzo niewielka [Fox 1992]. Niedobór selenu prowadzi do zmniejszenia aktywności peroksydazy glutationowej, a tym samym do zmniejszenia jej ochronnej roli w komórce roślinnej [Strączyk, Drobnica 2001]. Nadmiar selenu z kolei może prowadzić do występowania stresu oksydacyjnego [Dougherty, Hoekstra 1982].

## 2. CEL I METODY BADAŃ

Celem prezentowanej pracy było określenie, w jaki sposób dodatek do podłoża selenu na różnym stopniu utlenienia oddziałuje na zawartość kwasu askorbinowego, glutationu oraz związków fenolowych w różnych gatunkach roślin dwuliściennych.

Doświadczenie przeprowadzono w kulturach hydrotonicznych. Założone zostało w pełnych pożywkach Hoaglanda. W doświadczeniu użyte zostało pięć gatunków roślin dwuli-

ściennych. Do pełnych pożywek Hoaglanda dodano selen na dwóch stopniach utlenienia  $\text{Se}^{+IV}$  i  $\text{Se}^{+VI}$  w postaci  $\text{H}_2\text{SeO}_3$  i  $\text{H}_2\text{SeO}_4$  (ilość  $\text{Se}^{+IV}$  i  $\text{Se}^{+VI}$  wraz z tymi związkami wynosiła  $0,05 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ), a następnie wysiano do nich po  $0,05 \text{ g}$  nasion dziurawca (*Hypericum perforatum* L.),  $0,25 \text{ g}$  nasion rzepiku perko (*Agrimonia eupatoria* L.),  $0,25 \text{ g}$  nasion kolendry siewnej (*Coriandrum sativum* L.), 4 szt. nasion grochu siewnego łuskowego (*Pisum sativum* L.) oraz 4 szt. nasion fasoli (*Phaseolus vulgaris* L.).

W trakcie doświadczenia rośliny były oświetlane lampą sodową Son-T-Agro-400 W, firmy Philips, o natężeniu promieniowania na poziomie pożywki  $90 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  PAR (radiacji aktywnej fotosyntetycznie). Fotoperiodyzm został ustalony na 12 godzin dnia i nocy.

Punktem odniesienia były rośliny rosnące w pożywkach bez dodatku selenu. Po 14 dniach od umieszczenia nasion w pożywkach pobrano zielone części roślin i oznaczono w nich kolorymetrycznie zawartość kwasu askorbinowego, glutationu zredukowanego, flawonoidów i fenoli, za pomocą spektrofotometru UV/VIS Lambda Bio firmy Perkin Elmer. Kwas askorbinowy i glutation ekstrahowano z tkanek roślinnych buforem  $0,5 \text{ mM}$  roztworu EDTA z dodatkiem 3% TCA (EDTA-TCA). Zawartość kwasu askorbinowego oznaczano z dichlorofenolindofenolem przy długości fali  $600 \text{ nm}$ , zawartość glutation z DTNB natomiast (kwasem 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzoesowym) przy długości fali  $412 \text{ nm}$  [Guri 1983]. Fenole ekstrahowano 80-procentowym wodnym roztworem acetonu i oznaczano przy długości fali  $760 \text{ nm}$  metodą Singletona i Samuela-Raventos [1999]. Flawonoidy zaś ekstrahowano 80-procentowym metanolem i oznaczono według metody Woisky i Salatino [1998], przy długości fali  $420 \text{ nm}$ .

Wszystkie analizy wykonano w trzech powtórzeniach. Wyniki doświadczeń opracowano statystycznie przy użyciu dwuczynnikowej analizy wariancji w układzie kompletnej randomizacji. Najmniejsze istotne różnice obliczono według procedury Tukey'a przy poziomie istotności  $\alpha = 0,05$ .

Obliczono także współczynniki korelacji Pearsona między zawartością oznaczanych związków w roślinach rosnących w pożywkach bez i z dodatkiem selenu, na różnym stopniu utlenienia.

### 3. WYNIKI I Dyskusja

Zawartość kwasu askorbinowego, glutationu, flawonoidów i fenoli w badanych roślinach była istotnie zależna zarówno od gatunku, jak i od stopnia utlenienia dodanego do podłoża selenu (tab. 1). W roślinach kontrolnych największe stężenie flawonoidów i glutationu stwierdzono w roślinach kolendry siewnej, największe stężenie fenoli i kwasu askorbinowego natomiast w roślinach grochu siewnego.

Wprowadzenie do pożywek selenu spowodowało u niektórych gatunków zaburzenia kiełkowania i wzrostu. W pożywkach z dodatkiem selenu na stopniu utlenienia +IV stwierdzono zahamowanie kiełkowania nasion kolendry, a z dodatkiem selenu na stopniu utle-

nienia +VI – nasion fasoli. Jak podają Pazurkiewicz-Kocot i Galas [2002] nadmiar selenu w podłożu może negatywnie oddziaływać na organogenezę, syntezę białek i kwasów nukleinowych. Ponadto nadmiar selenu wywołuje zaburzenia w podziale i we wzroście komórek, hamuje wzrost roślin i zmniejsza plony. Jurkowska [1996] zaobserwowała także, że szkodliwy wpływ selenu może polegać na wywoływaniu u roślin niedoboru niektórych mikrośladników pokarmowych.

**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

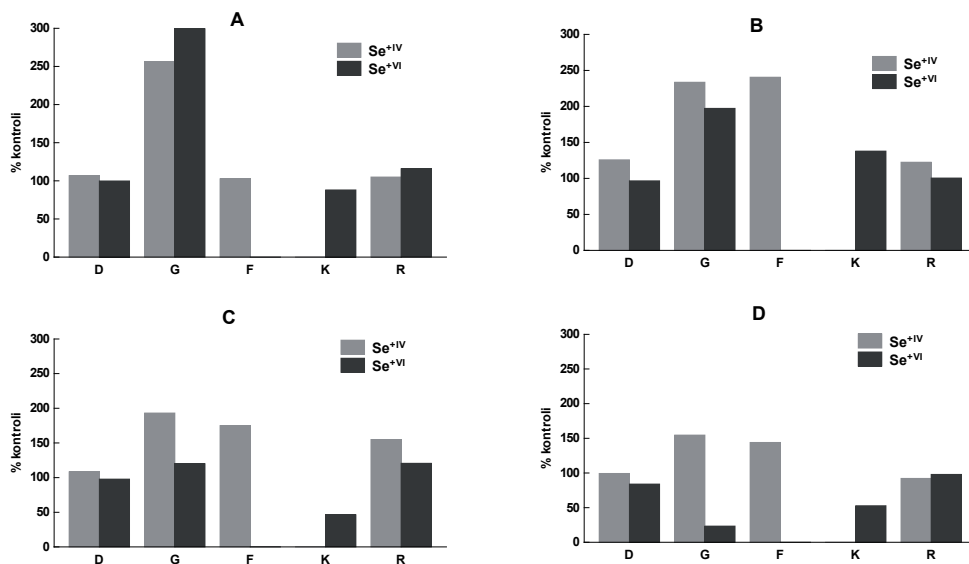
Stopień utlenienia selenu (B)	Gatunki roślin (A)					Średnia
	Dziurawiec zwyczajny <i>Hypericum perforatum</i>	Groch siewny <i>Pisum sativum</i>	Fasola zwyczajna <i>Phaseolus vulgaris</i>	Kolendra siewna <i>Coriandrum sativum</i>	Rzepak perko <i>Agrimonia eupatoria</i>	
Flawonoidy [mg kwercetyny · g <sup>-1</sup> ś.m. roślin]						
Kontrola	0,711	0,720	1,062	1,186	0,658	0,867
Se <sup>+IV</sup>	0,760	1,846	1,090	–	0,691	1,097
Se <sup>+VI</sup>	0,710	2,156	–	1,044	0,762	1,168
Średnia	0,727	1,574	1,076	1,115	0,704	1,039
NIR <sub>0,05</sub>	A = 0,022 A x B = 0,032 B = 0,014 B x A = 0,037					
Fenole [mg kwasu galusowego · g <sup>-1</sup> ś.m. roślin]						
Kontrola	0,120	0,262	0,148	0,198	0,200	0,186
Se <sup>+IV</sup>	0,151	0,612	0,356	–	0,245	0,341
Se <sup>+VI</sup>	0,116	0,517	–	0,273	0,201	0,277
Średnia	0,129	0,463	0,252	0,235	0,215	0,259
NIR <sub>0,05</sub>	A = 0,012 A x B = 0,017 B = 0,008 B x A = 0,020					
Glutation [mg · g <sup>-1</sup> ś.m. roślin]						
Kontrola	0,182	0,275	0,180	0,278	0,272	0,241
Se <sup>+IV</sup>	0,197	0,531	0,315	–	0,397	0,360
Se <sup>+VI</sup>	0,178	0,330	–	0,129	0,328	0,241
Średnia	0,186	0,379	0,248	0,204	0,332	0,280
NIR <sub>0,05</sub>	A = 0,026 A x B = 0,038 B = 0,017 B x A = 0,028					
Kwas askorbinowy [mg · g <sup>-1</sup> ś.m. roślin]						
Kontrola	0,384	1,858	0,569	1,009	0,350	0,834
Se <sup>+IV</sup>	0,381	2,872	0,819	–	0,322	1,099
Se <sup>+VI</sup>	0,323	0,433	–	0,532	0,342	0,408
Średnia	0,363	1,721	0,694	0,771	0,338	0,780
NIR <sub>0,05</sub>	A = 0,065 A x B = 0,095 B = 0,043 B x A = 0,112					

Analizując stężenie badanych związków w roślinach rosnących w pożywkach z dodatkiem selenu na stopniu utlenienia +IV odnotowano podwyższenie zawartości flawonoidów, fenoli i glutationu u wszystkich gatunków. Podwyższenie to było największe w roślinach grochu i sięgało ok. 200–250%. Również koncentracja kwasu askorbinowego w roślinach grochu i fasoli rosnących w pożywce z dodatkiem  $\text{Se}^{+IV}$  była większa niż w roślinach kontrolnych. Dodatek do pożywki selenu na tym stopniu utlenienia, a także stopniu utlenienia +VI, nie wpłynął natomiast istotnie na zawartość askorbinianu w roślinach dzurawca i rzepiku. Podwyższenie zawartości badanych związków po wprowadzeniu do pożywki selenu na stopniu utlenienia +VI zaobserwowano jedynie w odniesieniu do flawonoidów, fenoli i glutationu w roślinach grochu oraz flawonoidów i glutationu w roślinach rzepiku. W pozostałych przypadkach dodatek  $\text{Se}^{+VI}$  wyraźnie zmniejszał zawartość badanych związków, nawet o 75% w przypadku kwasu askorbinowego w roślinach grochu.

Obliczone współczynniki korelacji wykazały, że w roślinach kontrolnych występuje istotna dodatnia zależność pomiędzy zawartością fenoli a ilością glutationu i kwasu askorbinowego. Po wprowadzeniu do pożywki  $\text{Se}^{+IV}$  odnotowano natomiast istotne dodatnie korelacje pomiędzy wszystkimi oznaczanymi związkami, zaś po dodaniu  $\text{Se}^{+VI}$  dodatnio istotnie skorelowane były ze sobą jedynie zawartości flawonoidów i fenoli.

Wprowadzenie selenu do podłoża wpływało wyraźnie na zawartość oznaczanych związków. Kabata-Pendias i Pendias [1999] podają, że zwiększony poziom selenu może stymulować w roślinach sałaty nie tylko zwiększenie zawartości tokoferoli, ale także spadek aktywności dysmutazy ponadtlenkowej. Nowak i in. [2004] wykazali ponadto, że selen zastosowany w dawce  $0,05 \text{ mM} \cdot \text{kg}^{-1}$  gleby zwiększał zdolność systemów antyoksydacyjnych w roślinach pszenicy i rzepaku, zaś w dawce  $0,45 \text{ mmol} \cdot \text{kg}^{-1}$  gleby hamował rozwój badanych roślin, zmniejszając aktywność katalazy, peroksydazy i oksydazy polifenolowej. Djanaguiraman i in. [2005] zaobserwowali ponadto, że selen hamuje peroksydację lipidów w błonach komórkowych roślin soi, a także zwiększa aktywność w nich dysmutazy ponadtlenkowej i peroksydazy glutationowej. Kąklewski i in. [2008] wykazali także, że wzrost akumulacji selenu w tkankach roślin pszenicy zmniejsza aktywność peroksydazy askorbinianowej, w tkankach roślin rzepaku natomiast zwiększa aktywność tego enzymu. Ci sami autorzy stwierdzili również, że aktywność reduktazy glutationowej w roślinach pszenicy zwiększa się wraz ze wzrostem zawartości w nich selenu, podczas gdy w roślinach rzepaku zależność ta jest natomiast odwrotna.

Obliczone współczynniki korelacji liniowej Pearsona wskazują na wyraźną istotną dodatnią korelację między zawartością fenoli i glutationu oraz kwasu askorbinowego w roślinach kontrolnych. Po wprowadzeniu do pożywek selenu na +IV stopniu utlenienia odnotowano natomiast istotną dodatnią zależność między zawartością wszystkich oznaczanych nieenzymatycznych antyutleniaczy w roślinach dwuliściennych. W roślinach rosnących w pożywce z dodatkiem  $\text{Se}^{+VI}$  stwierdzono istotną dodatnią korelację jedynie pomiędzy zawartością flawonoidów i fenoli (rys. 1, tab. 2),



D – dziurawiec zwyczajny, G – groch siewny, F – fasola zwyczajna, K – kolendra siewna, R – rzepik perko

**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%)

**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%)

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

**Tabela 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		-0,143	-0,045	-0,046
	Fenole			0,789*	0,813*
	Glutation				0,477
	Kwas askorbinowy				
Se <sup>+IV</sup>	Flawonoidy		0,968*	0,743*	0,991*
	Fenole			0,863*	0,948*
	Glutation				0,784*
	Kwas askorbinowy				

Se <sup>+VI</sup>	Flawonoidy	0,978*	0,454	0,378
	Fenole		0,468	0,459
	Glutation			-0,392
	Kwas askorbinowy			

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

#### 4. WNIOSKI

1. Zawartość flawonoidów, fenoli, glutationu i kwasu askorbinowego w badanych roślinach dwuliściennych zależna była zarówno od gatunku rośliny, jak i stopnia utlenienia dodanego do podłoża selenu.
2. Dodatek do podłoża selenu na +IV i +VI stopniu utlenienia w dawce  $0,05 \text{ mM} \cdot \text{dm}^{-3}$  w znaczący sposób zmieniał zawartość nieenzymatycznych antyutleniaczy, co może być wynikiem występowania stresu oksydacyjnego w badanych roślinach.
3. Najbardziej wrażliwe na obecność w podłożu selenu wydają się być rośliny grochu, które charakteryzują największe zmiany zawartości nieenzymatycznych antyutleniaczy.
4. Obecność w podłożu selenu dla niektórych gatunków roślin może być bardzo toksyczna, co uwidacznia się zahamowaniem kiełkowania nasion.

#### PIŚMIENICTWO

- BARTOSZ G. 1997. Oxidative stress in plants. *Acta Physiol. Plant.* 19: 47–64.
- BIELAK E., PASTERNAK K. 1999. Biologiczna rola selenu. *Biul. Magnezol.* 4(3/4): 544–546.
- BORKOWSKI J., DYKI B. 2006. Selen – niedoceniony pierwiastek. *Ow. Warz. Kw.* 11: 15.
- BOROWSKA K. 1994. Selen w glebach i roślinach z wybranych plantacji lucerny. *Zesz. Probl. Post. Nauk Rol.* 414: 57–62.
- DJANAGUIRAMAN M., DEVI D.D., SHANKER A.K., SHEEBA J.A., BANGARUSAMY U. 2005. Selenium – antioxidative protestant in soybean during senescence. *Plant Soil* 272: 77–86.
- DOUGHERTY J.J., HOEKSTRA W.G. 1982. Stimulation of lipid peroxidation in vivo by injected selenite and lack of stimulation by selenate. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 169: 209–215.
- FOX J.M. 1992. Selenium: nutritional implications and prospects for therapeutic medicine. *Meth. Find Exp. Clin. Pharmacol.* 14: 275–278.
- 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. *Biochemia pierwiastków śladowych*. Wyd. Nauk. PWN, Warszawa.

- KĄKLEWSKI K., NOWAK J., LIGOCKI M. 2008. Effects of selenium content in green parts of plants on the amount of ATP and ascorbate-glutathione cycle enzyme activity at various growth stages of wheat and oilseed rape. *J. Plant. Physiol.* 165: 1011–1022.
- KOUTNIK V., FLEISCH I. 1998. Mięso jako źródło selenu w żywieniu człowieka. *Mięso Wedl.* 5: 90–93.
- NOWAK J., KĄKLEWSKI K., LIGOCKI M. 2004. Influence of selenium on oxidoreductive enzymes activity in soil and in plants. *Soil Biol. Biochem.* 36: 1553–1558.
- PAZURKIEWICZ-KOCOT K., GALAS W. 2002. Zależność pomiędzy akumulacją K, Na i Ca w tkankach siewek *Zea mays* L. a stężeniem  $\text{SeO}_2$  i  $\text{NaHSeO}_3$  w środowisku zewnętrznym. *Zesz. Probl. Post. Nauk Rol.* 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.* 299: 213–219.
- STRĄCZYK D., DROBNICA L. 2001. Selen w roślinach i jego wpływ na zdrowie. *Ekopartner* 115(5): 14.
- WACHOWICZ B. 1993. Selen w roślinach. *Wiad. Bot.* 37(1/2): 87–89.
- WOISKY R.G., SALATINO A. 1998. Analysis of propolis: Some parameters and procedures for chemical quality control. *J. Agric. Res.* 37: 99–105.