

Krystyna Pazurkiewicz-Kocot\*, Aleksandra Haduch\*, Andrzej Kita\*\*

**ODDZIAŁYWANIE BRASSINOSTEROIDÓW NA KUMULACJĘ  
NIEKTÓRYCH PIERWIASTKÓW W LIŚCIACH ZEA MAYS L.  
I BIOSYNTEZĘ BARWNIKÓW CHLOROFILOWYCH**

**THE EFFECT OF BRASSINOSTEROIDS ON THE ACCUMULATION  
OF SOME ELEMENTS IN THE LEAVES OF ZEA MAYS L. AND  
BIOSYNTHESIS OF CHLOROPHYLL PIGMENTS**

**Słowa kluczowe:** brassinosteroidy, chlorofile, Zn, Mn, Fe, Mg, Cu, Zea mays L.

**Key words:** brassinosteroids, chlorophylls, Zn, Mn, Fe, Mg, Cu, Zea mays L.

**Streszczenie**

*Przedmiotem rozważań w niniejszej pracy było oddziaływanie syntetycznego hormonu 24-epibrassinolidu na zawartość barwników chlorofilowych w liściach 7-dniowych siewek Zea mays L. w zależności od stężenia badanego regulatora wzrostu oraz wpływ wyżej wymienionego hormonu na kumulację niektórych metali (magnez, żelazo, miedź, cynk oraz mangan).*

*Zawartość metali w liściach mierzono po ich mineralizacji, techniką emisyjnej spektrometrii atomowej ze wzbudzeniem w plazmie sprzężonej (ICP-OES), a stężenie barwników chlorofilowych – techniką spektrofotometryczną (UV-VIS). Hormon 24-epibrassinolid powoduje wzrost zawartości chlorofilu a w świeżej masie roślin, natomiast w odniesieniu do chlorofilu b 24-brassinosteroid nie wpływał znacząco na jego zawartość. Zaobserwowano nieznaczny wzrost wartości stosunku ilościowego chlorofilu a do chlorofilu b wraz ze zmniejszeniem stężenia dodawanego do pożywki hormonu. Przeprowadzone doświadczenia wykazały również, że brassinosteroid wywiera wpływ na kumulację badanych metali w liściach siewek kukurydzy.*

---

\* Dr Krystyna Pazurkiewicz-Kocot, mgr Aleksandra Haduch – Katedra Fizjologii Roślin, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Śląski, ul. Jagiellońska 28, 40-032 Katowice; e-mail: krystyna.pazurkiewicz-kocot@us.edu.pl; haduchaleksandra@gmail.com

\*\* Dr Andrzej Kita – Zakład Chemii Analitycznej, Instytut Chemii, Uniwersytet Śląski, ul. Szkolna 9, 40-006 Katowice; e-mail: andrzej.kita@us.edu.pl

### Summary

*In this work the effect of 24-brassinosteroids on the accumulation of Zn, Mn, Fe, Mg and Cu and on the content of chlorophyll a and b in leaves of Zea mays L. plants was studied. The experiments were carried out with 7-day old maize plants grown on the Hoagland's medium. Seeds of maize were cultivated for four days in the darkness at 27°C on the moist filter paper. Then the individual seedlings were transferred into the aerated solution containing the 24-brassinosteroid, and next cultivated in green house for 12 hours in light and 12 hours in darkness at 21°C. The seedlings were exposed to the solution containing brassinosteroid at concentration  $10^{-9}$  mol·dm<sup>-3</sup> –  $10^{-5}$  mol·dm<sup>-3</sup> about 96 hours before chemical analysis, pH of medium was 6.5. The accumulation of metal ions in seedlings of maize was measured by emission spectroscopy using the spectrometer with excitation by argon inductively coupled plasma (ICP-OES). The amount of chlorophyll pigments was determined by the spectrophotometer. The study shows that the content of chlorophyll a and b in maize leaves depends on concentration of 24-brassinosteroid in medium. In the work the interrelations between content of Zn, Mn, Fe, Mg and Cu in plants and concentration of 24-brassinosteroid in medium was showed, as well.*

### 1. WPROWADZENIE

Wzrost i rozwój roślin to procesy bardzo złożone, które przebiegają na wielu płaszczyznach, takich jak oddziaływanie substancji na procesy metaboliczne czy wpływ na dostęp substancji odżywczych. Wymagają one skomplikowanej i skrupulatnej regulacji, między innymi przez hormony roślinne oraz regulatory wzrostu [Weyers, Paterson 2001]. Wśród regulatorów wzrostu najważniejszą grupę stanowią fitohormony, czyli hormony roślinne, które charakteryzuje aktywność w niskich stężeniach i które występują powszechnie we wszystkich roślinach. Mają one charakter sygnałów chemicznych tworzących się w określonej tkance roślinnej i następnie transportowanych do konkretnego miejsca w roślinie, gdzie stymulują określone procesy. W roślinach wyodrębnia się kilka grup fitohormonów, odgrywających kluczowe role w procesach wzrostu i rozwoju roślin.

Brassinosteroidy są grupą hormonów roślinnych niezwykle zróżnicowaną pod względem budowy chemicznej [Yokota 1997, Bajguz, Tretyn 2003, Bajguz 2007]. Związki te występują w kiełkujących nasionach i są one u wielu gatunków roślin niezbędne do inicjacji tego procesu. Stymulują one wzrost łodygi przy jednoczesnym zahamowaniu wzrostu korzenia, jak również podziały komórkowe [Clouse, Sasse 1998]. Brassinosteroidy wpływają także na potencjał membranowy i transport [Dahse i in. 1990] oraz na gospodarkę wodną komórek roślinnych, wpływając na aktywność akwaporyn [Morillon i in. 2001]. Hormony te oddziałują na proces starzenia się organów i tkanek roślinnych oraz regulują odpowiedź roślin na stresy środowiskowe [Wilén i in. 1995].

## 2. CEL, MATERIAŁ I METODY BADAŃ

Celem niniejszej pracy było zbadanie oddziaływania syntetycznego hormonu 24-epibrasinolidu na zawartość barwników chlorofilowych w liściach 7-dniowych siewek *Zea mays* L. w zależności od stężenia badanego regulatora wzrostu ( $10^{-9}$  mol·dm<sup>-3</sup> –  $10^{-5}$  mol·dm<sup>-3</sup>). Zbadano również wpływ powyższego hormonu na kumulację niektórych metali (cynk, mangan, żelazo, magnez oraz miedź).

Doświadczenia prowadzono na 7-dniowych siewkach kukurydzy (*Zea mays* L.) odmiany „KOSMO 230” (nasiona pochodziły ze Stacji Hodowli Roślin w Kobierzycach), hodowanych na pożywce Hoaglanda – kontrola [Hoagland, Arnon 1950], pożywce pozabawionej brassinosteroidu oraz na pożywkach zawierających brassinosteroid (24-epibrasinolid) w stężeniu  $10^{-9}$  mol·dm<sup>-3</sup> –  $10^{-5}$  mol·dm<sup>-3</sup>, który był wprowadzany do hodowli 96 godzin przed analizą chemiczną, pH roztworu wynosiło 6,5. Początkowo rośliny hodowano w cieplarni ciemniowej w temperaturze 27°C, potem w szklarni przy 12-godzinym dniu i nocy, w temperaturze 21°C.

Akumulację metali w liściach mierzono metodą emisyjnej spektrometrii atomowej (ICP-OES), a stężenie barwników chlorofilowych metodą spektrofotometryczną.

Zawartość barwników chlorofilowych w siewkach kukurydzy oznaczano w krążkach o określonej powierzchni, wyciętych z liści odpowiednim korkoborem. Materiał umieszczano w probówkach z acetonem. Po zagotowaniu materiału próbówki szczelnie zamykano i przechowywano w ciemności, w lodówce, do czasu wykonania oznaczeń.

Ekstrakcję barwników przeprowadzano w tym samym dniu. Liście rozcierano z odrobiną drobno potłuczonego szkła i z niewielką ilością CaCO<sub>3</sub>, w obecności 80% wodnego roztworu acetonu. Ekstrakcję kontynuowano świeżymi porcjami wodnego roztworu acetonu do momentu uzyskania roztworu bezbarwnego. Wyciąg acetonowy filtrowano przez sączek szklany (Schott G3) i dopełniano do określonej objętości.

Barwniki chlorofilowe oznaczano metodą spektrofotometryczną. Absorbancję barwników odczytywano przy trzech długościach fali: 649 nm, 665 nm oraz 710 nm, na spektrofotometrze VSU2-P (produkcji firmy Carl Zeiss Jena).

Pomiary absorbancji badanych roztworów wykonywane były w kuwetach szklanych, grubości 1 cm.

Stężenie barwników obliczano ze wzorów Vernona, będących modyfikacją następujących wzorów Arnona [Vernon 1960]:

1) chlorofil *a* [mg·dm<sup>-3</sup>] =  $11,63 A_{665} - 2,39 A_{649}$ ;

2) chlorofil *b* [mg·dm<sup>-3</sup>] =  $20,11 A_{649} - 5,18 A_{665}$ ;

3) chlorofil *a+b* [mg·dm<sup>-3</sup>] =  $6,45 A_{665} + 17,72 A_{649}$ ;

gdzie:

$A_{665}$  – maksimum absorpcji chlorofilu *a*,

$A_{649}$  – maksimum absorpcji chlorofilu *b*.

Ilość barwników przeliczano na 1 g suchej masy roślinnej. W celu zmierzenia zawartości badanych metali (cynk, mangan, żelazo, magnez i miedź) w tkance liści materiał roślinny suszono w suszarce, w temperaturze 70°C, do stałej masy. Tak przygotowane próbki poddawano analizie chemicznej.

Kumulację metali w tkankach liści badano przy zastosowaniu metody atomowej spektrometrii emisyjnej (ICP-OES). Zastosowanie tej techniki w analizie materiałów pochodzenia roślinnego wymaga przeprowadzenia próbki organicznej do roztworu. W tym celu suchą próbkę o masie około 0,5 g mineralizowano metodą bezciśnieniową na mokro, z udziałem stężonego HNO<sub>3</sub>. W analizie oznaczano następujące metale, wykorzystując linie analityczne poszczególnych pierwiastków: Zn – 213, 856 nm, Mn – 257,610 nm, Fe – 259,940 nm, Mg – 279,553 nm, Cu – 324,754 nm.

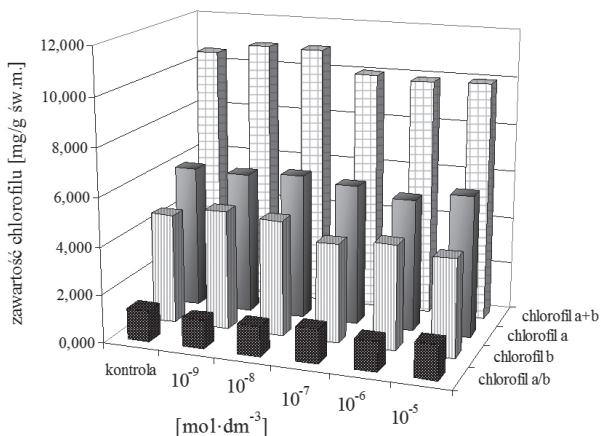
### 3. WYNIKI I DYSKUSJA

Siewki kukurydzy (*Zea mays* L.) hodowane były na pożywce zawierającej brassinosteroid (24-epibrassinolid). Rośliny pobierają ten hormon z podłoża i kumulują go. Badania prowadzono w porównaniu z kontrolnymi roślinami, których hodowla prowadzona była na pożywce Hoaglanda.

W 7-dniowych siewkach kukurydzy poddanych działaniu brassinosteroidu w stężeniach 10<sup>-9</sup> mol·dm<sup>-3</sup> – 10<sup>-5</sup> mol·dm<sup>-3</sup> badano zawartość barwników chlorofilowych (chlorofil *a*, *b* oraz *a+b*), a także zawartość wybranych metali (Zn, Mn, Fe, Mg, Cu) w roślinach. Kontrolę dla wszystkich pomiarów stanowiły rośliny rosnące tylko na pożywce Hoaglanda.

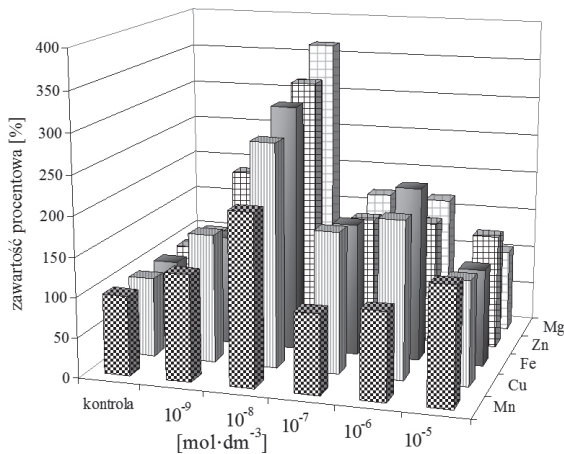
Zwiększoną zawartość chlorofilu *a* w porównaniu z kontrolą w przeliczeniu na 1 gram świeżej masy liściowej zaobserwowano w hodowli roślin na pożywce zawierającej brassinosteroid w stężeniu 10<sup>-8</sup> mol·dm<sup>-3</sup>, przy czym spadek zawartości chlorofilu *a* dla pozostałych stężeń nie był znaczący, zwiększoną zawartość chlorofilu *b* i całkowitą zawartość *a+b* stwierdzono natomiast przy stężeniach brassinosteroidu 10<sup>-9</sup> mol·dm<sup>-3</sup> i 10<sup>-8</sup> mol·dm<sup>-3</sup> (rys. 1).

Wraz ze wzrostem stężenia brassinosteroidu w pożywce zaobserwowano znaczny wzrost wartości stosunku ilościowego chlorofilu *a/b*. Największy wzrost stwierdzono, w porównaniu z kontrolą, przy stężeniu 10<sup>-7</sup> mol·dm<sup>-3</sup> i 10<sup>-5</sup> mol·dm<sup>-3</sup>. Mniejsze zawartości chlorofilu *a*, *b* oraz *a+b* w porównaniu do kontroli zaobserwowano w liściach siewek hodowanych na pożywce Hoaglanda, zawierającej brassinosteroid w stężeniu 10<sup>-7</sup> mol·dm<sup>-3</sup> – 10<sup>-5</sup> mol·dm<sup>-3</sup>. Badany brassinosteroid niezależnie od stężenia stymulował kumulację badanych metali w roślinach (rys. 2). Największą kumulację w siewkach, w porównaniu do kontroli, stwierdzono przy stężeniu brassinosteroidu 10<sup>-8</sup> mol·dm<sup>-3</sup>. Mniejsze kumulacje natomiast stwierdzono dla stężeń brassinosteroidu 10<sup>-9</sup> mol·dm<sup>-3</sup>, 10<sup>-7</sup> mol·dm<sup>-3</sup>, 10<sup>-6</sup> mol·dm<sup>-3</sup> i 10<sup>-5</sup> mol·dm<sup>-3</sup>. Przeprowadzone doświadczenia wykazały jednoznacznie, że 24-epibrassinolid zwiększa kumulację badanych metali w liściach kukurydzy.



**Rys. 1.** Zawartość chlorofilu *a*, *b*, *a+b* w świeżej masie liści oraz stosunek chlorofilu *a/b* siewek *Zea mays* L. poddanych w trakcie hodowli działaniu 24-epibrassinolidu w różnych stężeniach (średnie z 5 pomiarów; błąd 6–7%)

**Fig. 1.** Chlorophyll *a*, *b* and *a+b* content and relation of chlorophyll *a/b* in fresh mass of *Zea mays* L. seedlings treated by brassinosteroid in different concentrations (average from 5 measurements, error 6–7%)



**Rys. 2.** Zawartość w liściach 7-dniowych siewek kukurydzy Mg, Zn, Fe, Cu, Mn (średnie z 5 pomiarów; błąd 8–10%)

**Rys. 2.** Content of Mg, Zn, Fe, Cu, Mn in the leaves of 7-day maize seedlings (average from 5 measurements; error 8–10%)

Organizmy żywe – zarówno zwierzęta, jak i rośliny – do prawidłowego funkcjonowania potrzebują niezbędnych produktów. Prawidłowy wzrost i rozwój roślin w dużym stopniu zależy od dostarczanych im w pożywkach makro- i mikroelementów [Kabata-Pendias, Pendias 1999]. Do ważniejszych mikroelementów pobieranych z podłoża przez rośliny należą Zn, Mn, Fe, Mg, Cu. Ilość pobieranych przez rośliny jonów metali uzależniona jest od wielu czynników, zarówno zewnętrznych, w jakich żyją rośliny, jak i czynników wewnętrznych. Intensywność pobierania jonów metali z podłoża przez organizmy roślinne oraz ich transport zarówno na poziomie struktur komórkowych, jak i organów, w dużej mierze zależy od formy, w jakiej metale występują w podłożu, od ich mobilności i właściwości oraz od ich stężenia [Fox, Guerinot 1998, Frausto Da Silva, Williams 2001], a także od indywidualnych właściwości organizmów. Niektórzy badacze wskazują, że fitohormony wywierają dodatni wpływ na pobieranie jonów z podłoża przez rośliny [Pazurkiewicz-Kocot i in. 2002, Pazurkiewicz-Kocot, Kita 2004]. Deficyt hormonów roślinnych powoduje znaczne zmniejszenie intensywności tego procesu.

Ważnym czynnikiem, decydującym o intensywności wzrostu i rozwoju roślin, jest również dostępność metabolitów, organicznych substancji pokarmowych, u podstaw syntezy których stoją procesy związane z fotosyntezą. Natężenie procesu fotosyntezy, związane z reakcjami świetlnymi zachodzącymi w barwnikach chlorofilowych uzależnione jest od ilości chlorofilu *a* i *b* w komórkach fotosyntetyzujących [Rüdiger 1997, Bolivar 2006, Tanaka, Tanaka 2006]. Mechanizm działania oraz regulacyjne właściwości brassinosteroidów mają charakter sygnałów chemicznych, które powstają w znikomych ilościach, w ściśle określonej tkance, a następnie są transportowane do konkretnego miejsca w roślinie, gdzie stymulują określone procesy [Li, Jin 2007].

#### 4. WNIOSKI

Brassinosteroid w niskich stężeniach działa stymulująco na syntezę chlorofilu *a* i *b* w liściach *Zea mays* L. Stymuluje akumulację badanych metali w siewkach kukurydzy w zakresie badanych stężeń tego pierwiastka w pożywce.

#### PIŚMIENICTWO

- BAJGUZ A., TRETYN A. 2003. Brassinosteroidy – hormony roślinne. Wyd. Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Toruń.
- BAJGUZ A. 2007. Metabolism of brassinosteroids in plants. *Plant Physiol. Biochem.* 45: 95–107.
- BOLIVAR D.W. 2006. Recent advances in chlorophyll biosynthesis. *Photosynthesis Research* 90: 173–194.
- CLOUSE S.D., SASSE J.M. 1998. Brassinosteroids: essential regulators of plant growth and development. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49: 427–451.

- DAHSE I., BERNSTEIN M., PETZOLD U., MULLER E., VORBRODT H.M., ADAM G. 1990. Effect of (922S,23S) – homobrassinolide and related compounds on membrane potential and transport of *Egeria* leaf cells. *Plant Physiol.* 93: 1268–1271.
- FOX T.C., GUERINOT M.L. 1998. Molecular biology of cation transport in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49: 669–696.
- FRAUSTO DA SILVA J.J.R., WILLIAMS R.J.P. 2001. The biological chemistry of the elements. Oxford University Press, Oxford.
- HOAGLAND D.R., ARNON D.J. 1950. The water culture method for growing plants without soil. *Calif. Agric. Exp. Stat. Circ.* 347: 1–32.
- KABATA-PENDIAS A., PENDIAS H. 1999. Biogeochemia pierwiastków śladowych. PWN, Warszawa.
- LI J.M., JIN H. 2007. Regulation of brassinosteroid signaling. *Trends Plant Science.* 12: 37–41.
- MORRILLON R., CATTEROU M., SANGWAN R.S., LASSALLES J.P. 2001. Brassinolide may control aquaporin activities in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 212: 199–204.
- PAZURKIEWICZ-KOCOT K., KITA A., GALAS W. 2002. Akumulacja kationów w tkankach siewek *Zea mays* L., hodowanych na pożywkach zawierających wybrane fitohormony. *Zesz. Prob. Post. Nauk Roln.* 488: 719–726.
- PAZURKIEWICZ-KOCOT K., KITA A. 2004. Oddziaływanie kwasu abscysynowego na akumulację wybranych metali w siewkach *Zea mays* L. *Zesz. Prob. Post. Nauk Roln.* 496: 511–518.
- RÚDIGER W. 1997. Chlorophyll metabolism: from outer space down to the molecular level. *Phytochemistry* 36: 1151–1167.
- TANAKA A.K., TANAKA R. 2006. Chlorophyll metabolism. *Curr. Opin. Plant Biology* 9: 248–255.
- VERNON L.P. 1960. Spectrophotometric determination of chlorophylls and pheophytins in plant extracts. *Anal. Chem.* 32: 1144–1150.
- WEYERS J.D.B., PATERSON N.W. 2001. Plant hormones and the control of physiological processes. *New Phytologist* 129: 375–407.
- WILEN R.W., SACCO M., GUSTA L.V., KRISHANA P. 1995. Effects of 24-epibrassinolide on freezing and thermotolerance of romegrass (*Bromus inermis*) cell cultures. *Physiol. Plant* 95: 195–202.
- YOKOTA T. 1997. The structure, biosynthesis and function of brassinosteroids. *Trends Plant Sci.* 2, 4: 137–144.