

WPLYW KWASU ASKORBINOWEGO NA WZROST I ROZWÓJ PIEPRZYCY SIEWNEJ (LEPIDIUM SATIVUM L.)

Liwia Szymanek

Klasa 3f

I Społeczne Liceum Ogólnokształcące im. Hetmana Jana Tarnowskiego

Krzysztof Wolski

STRESZCZENIE

Celem pracy badawczej było określenie wpływu kwasu askorbinowego na wzrost i rozwój pieprzycy siewnej. Wykazano wpływ egzogennie podanej witaminy C na opóźnienie rozwoju pieprzycy siewnej - spowolnienie ukorzenia oraz wzrostu jej części zielonych. Wnioski wynikające z badań potwierdzają znaczącą rolę RFT w procesach kiełkowania i wzrostu roślin.

WSTĘP

Kiełkowanie jest to zespół procesów zachodzących w nasieniu, powodujących aktywację zarodka prowadzącą do wzrostu siewki.(3) Podczas niego zachodzą liczne procesy oddechowe, które odgrywają bardzo istotną rolę. Dostarczają one zarodkowi energii oraz przejściowe związki chemiczne. Oddychanie tlenowe dostarcza również energii, podczas syntezy np. białek, celulozy czy lipidów. (4) Podczas zachodzenia procesów związanych z oddychaniem takich jak m.in. fosforylacja oksydacyjna powstają również reaktywne formy tlenowe powstałe w wyniku częściowej redukcji tlenu cząsteczkowego powstałego w wyniku procesów utleniania tkankowego. W przeciwieństwie do mało aktywnego w podstawowym stanie energetycznym tlenu, ROS (ang. reactive oxygen species) cechują się łatwością wchodzenia w reakcje redoks. Do reaktywnych form tlenu należą: rodniki hydroksylowe OH[•], anionorodnik ponadtlenkowy O₂^{•-}, tlen singletowy ¹O₂ oraz nadtlenek wodoru H₂O₂.(3)

Ważnym elementem jest zachowanie u roślin homeostazy redoks, ponieważ RFT (reaktywne formy tlenu) w odpowiedniej ilości są potrzebne m.in. podczas kiełkowania nasion, wzrostu i rozwoju siewek różnicowania się komórek w czasie morfogenezy korzeni, włośników korzeniowych i liści. Mimo to nadmiar wolnych rodników wpływa negatywnie na rozwój rośliny.

Powszechnie wiadomo, że kwas askorbinowy posiada wielostronne działanie. Witamina C chroni rośliny przed uszkodzeniami oksydacyjnymi wynikającymi np. z ozonu(2), a nawet wpływa na zachowanie aparatów szparkowych, jednak jednym z ważniejszych powodów dla których kwas askorbinowy odgrywa tak ważną rolę w funkcjonowaniu roślin jest to, że jest on hydrofilowym utleniaczem rozpuszczalnym w wodzie, a w dodatku jako jedyny spośród przeciwutleniaczy występuje naturalnie u roślin w tak dużych stężeniach. W największych ilościach występuje on w chloroplastach, mitochondriach i peroksydach.(6,10) Egzogenny kwas askorbinowy może być również aktywnie transportowany do rośliny, a nawet uczestniczyć w szlakach metabolicznych (7).

Literatura została znaleziona w wyszukiwarce Google scholar za pomocą haseł: ascorbic acid, fizjologia roślin, germination, reactive oxygen species, plant growth. W dostępnym piśmiennictwie nie znaleziono identycznego doświadczenia.

MATERIAŁ I METODY

Przeprowadzone doświadczenie miało na celu wykazanie wpływu kwasu askorbinowego na wzrost i rozwój pieprzycy siewnej (*Lepidium sativum* L.). Przy przeprowadzaniu doświadczenia wzorowano się na metodzie Banu'a Aytül'a Ekmekçi i Meltem'a Karaman'a badających zwiększenie odporności na sól *Silybum marianum* (L.) przez egzogenny kwas askorbinowy.

Przygotowano 400 nasion pieprzycy siewnej. Umieszczono je w 20 szalkach Petriego z wilgotną watą. Na każdy rodzaj próby użyto po 5 szalek Petriego. Po 3 dniach na większości nasion pojawiły się korzenie oraz pierwsze liście. Nie wykiełkowały 32 nasiona. Postanowiono, że do doświadczenia zostanie użyte po 80 nasion pieprzycy siewnej. Przy selekcji nasion kierowano się zbliżonym rozmiarem i kolorem nasion, aby wyniki były jak najwiarygodniejsze. Nasiona zostały losowo podzielone na 4 grupy, po czym przeniesiono je na szalki Petriego. Wszystkie rośliny były hodowane w tym samym pomieszczeniu, dzięki temu miały one takie same warunki rozwoju m.in. temperaturę, wilgotność powietrza, naświetlenie. W przygotowanym doświadczeniu próbą kontrolną były nasiona pieprzycy siewnej podlewane przegotowaną wodą z kranu. Przygotowano trzy rodzaje prób badawczych różniących się stężeniem kwasu askorbinowego. Sporządzono roztwory do których przygotowania posłużyła przegotowana woda i czysty kwas L-askorbinowy w proszku (*acidum ascorbicum*). Rośliny były codziennie podlewane roztworem wody z odpowiednią ilością witaminy C. Doświadczenie trwało 7 dni. W poniższej tabeli zaprezentowano skład roztworów użytych do przeprowadzenia doświadczenia.

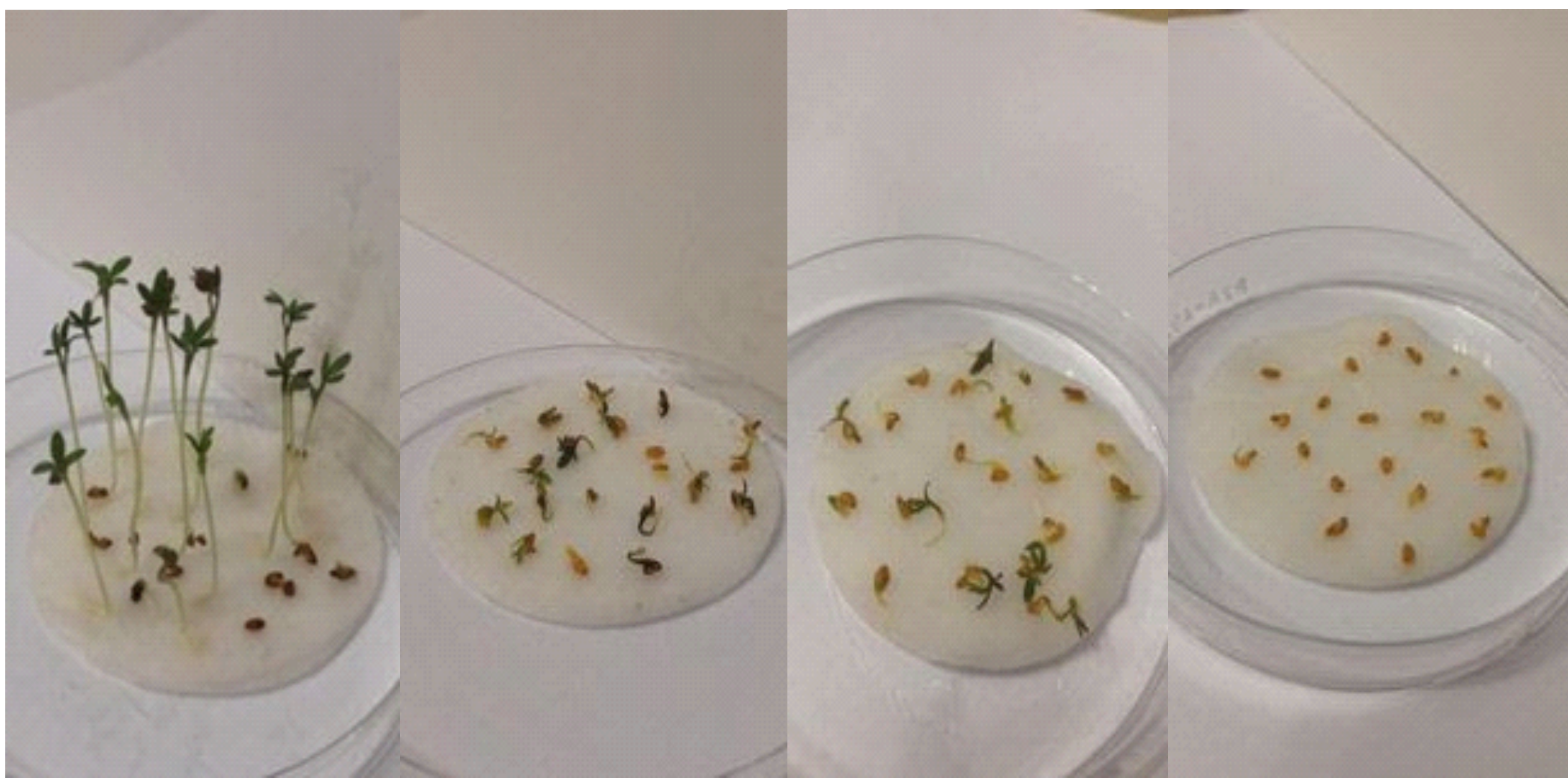
Nazwa próby	Skład roztworu
Próba kontrolna	200 ml H ₂ O
Próba badawcza nr 1	200 ml H ₂ O + 200 mg kwasu askorbinowego
Próba badawcza nr 2	200 ml H ₂ O + 500 mg kwasu askorbinowego
Próba badawcza nr 3	200 ml H ₂ O + 1000 mg kwasu askorbinowego

Tabela 1. Skład roztworów użytych w doświadczeniu

Do udokumentowania wyników doświadczeń w postaci fotografii użyto telefonu komórkowego iPhone X.

WYNIKI

W doświadczeniu otrzymano bardzo podobne wyniki poszczególnych prób, co świadczy o wiarygodności wyników. Poniższe wyniki są oparte na zbiorczej obserwacji poszczególnych prób. W próbach kontrolnych zauważono najszybszy rozwój korzeni i wzrost części zielonych pieprzycy siewnej. Liście/liścienie rośliny poddanej próbie kontrolnej były w najciemniejszym odcieniu zieleni. Po trzech dniach u roślin codziennie podlewanych przegotowaną wodą zauważono wyraźny wzrost części zielonych rośliny. Po 3 dniach widoczne były wyraźnie rozwinięte liście. W przypadku prób badawczych nr 1 i 2 widoczny był rozwój części korzeni w przeciwnym kierunku do działania siły grawitacji oraz pojawienie się zaczątków białych zielonych części roślin. Rozwój układu korzeniowego u roślin podlewanych przegotowaną wodą kranową z 500 mg kwasu askorbinowego był powolny, podobny do rozwoju układu korzeniowego roślin w próbach badawczych nr 1, jednak w porównaniu do prób badawczych nr 1 w próbach badawczych nr 2 było zdecydowanie bardziej widoczne odbarwienie części zielonych *Lepidium sativum* L. Natomiast u roślin podlewanych roztworem przegotowanej wody z kranu z 1000 mg kwasu askorbinowego pojawiły się tylko niewielkie korzenie rosnące w kierunku zgodnym z siłą grawitacji, które były zdecydowanie krótsze od korzeni pieprzycy siewnej z pozostałych prób badawczych. Po 5 dniach w próbach kontrolnych następował stały rozwój części zielonych pieprzycy siewnej. W próbach badawczych nr 1 i 2 korzenie roślin zaczęły rosnąć w kierunku zgodnym do sił grawitacji oraz części zielone roślin przybrały ciemniejszy odcień, w próbach badawczych nr 1 było to zdecydowanie bardziej widoczne. W próbach badawczych nr 3 nastąpił jedynie nieznaczny wzrost układu korzeniowego. Po 7 dniach w próbach badawczych nastąpił dalszy rozwój roślin. W próbach badawczych nr 1 nastąpiło uschnięcie 30 roślin, a w próbach badawczych nr 2 46 mimo regularnego podlewania. W próbach kontrolnych nr 3 nastąpił jedynie wzrost korzenia, nie nastąpił rozwój części zielonych rośliny.



Przykładowe zdjęcia prezentujące wyniki doświadczenia po 5 dniach (od lewej: próba kontrolna, próba badawcza nr 1, próba badawcza nr 2, próba badawcza nr 3).

DYSKUSJA

Wzrost roślin można zdefiniować jako zwiększenie objętości i/lub masy rośliny. Jest on związany z rozwojem, czyli specjalizacją komórek i tkanek oraz produkcją nowych.(8) Próby badawcze wykazały szkodliwy wpływ nadmiaru kwasu askorbinowego na rozwój roślin. Zaobserwowano wpływ roztworu witaminy c na spowolnienie ukorzenia oraz powolnego wzrostu pędów roślin czy nawet ich braku. Również zielone części roślin uległy odbarwieniu przez kilka pierwszych dni wzrostu, co m.in. ograniczało przeprowadzanie fotosyntezy.

Kwas askorbinowy jest pochodną sacharydów. W organizmach roślin powstaje on z D-galaktozy lub D-glukozy. Witamina C posiada silne właściwości redukujące, dzięki ugrupowaniom węgla, które warunkują właśnie takie właściwości. Zawiera ona również dwie sąsiadujące ze sobą grupy, czyli grupę hydroksylową i karbonylową, co powoduje, że cząsteczka kwasu askorbinowego jest świetnym donorem wodoru i elektronów. Kwas ten ulega różnym reakcjom takim jak: utlenianie, oddawanie elektronów czy delokalizacji elektronów. Powstającymi, podczas tych przemian produktami są: anion askorbinowy, rodnik askorbylowy czy kwas dehydroaskorbinowy. Te związki reagują z ROS, zabezpieczając komórki i tkanki organizmu przed reakcjami wolnorodnikowymi.(9,11). Jednakże reaktywne formy tlenu pełnią istotną rolę w regulacji wszystkich kluczowych dla roślin procesów m.in. rozwoju, wzrostu czy podczas starzenia, a nawet apoptozy. Ich wytwarzanie jest stymulowane m.in. przez auksyny w protoplastach korzeni. Jest to na tyle ważny proces, ponieważ RFT wpływają na regulację grawitropizmu korzenia, dlatego ich niedobór spowodowany działaniem witaminy C powoduje wzrost korzenia w przeciwnym kierunku do działania siły grawitacji.(15). Również indukowane przez auksyny wytwarzanie ROS jest ważne w kontroli architektury korzeni i pędów.(16) Dodatkowo ROS zlokalizowane w apoplastach kiełkujących nasionach, że pełnią one rolę związaną z wydłużaniem komórek, co zostało wykazane w różnych materiałach.(17) Odpowiadają one również za przełamywanie spoczynku - obniżenie stężenia ROS powoduje spowolnienie kiełkowania, a gdy stężenie jest poniżej granicznego punktu to rośliny pozostają w stanie spoczynku. RFT odgrywają również różne inne role, podczas kiełkowania - wskazuje na to fakt, że reaktywne formy tlenu lokalizują się najpierw w cytoplazmie nasion, których spoczynek został przerwany, następnie w jądrze komórkowym, a na końcu w ścianie komórkowej.(17). ROS reagują również z fitohormonami takimi jak auksyny czy kwas absycynowy - wspólnie regulują procesy odpowiedzialne za zranienie, wzrost czy zamykanie aparatów szparkowych.(5,12). Reaktywne formy tlenu przyczyniają się również do rozwoju i wzrostu korzeni poprzez regulację kanałów przepuszczalnych dla wapnia i potasu w komórkach korzeni roślin. Jednak zatrzymanie wydłużania układu korzeniowego może nastąpić, gdy zostanie zahamowana aktywność oksydazy lub peroksydazy NADPH, ponieważ to m.in. one są odpowiedzialne za wytwarzanie ROS.(13)Natomiast właśnie kwas askorbinowy posiada właściwości zmniejszające aktywność oksydazy i peroksydazy NADPH przez, co wpływa on znacząco na korzeń.(14)

PIŚMIENNICTWO

- Banu Aytül Ekmekçi* and Meltem Karaman Exogenous ascorbic acid increases resistance to salt of *Silybum marianum* (L.) African Journal of Biotechnology Vol. 11
- Zhong Chen, Daniel R. Gallie Increasing Tolerance to Ozone by Elevating Foliar Ascorbic Acid Confers Greater Protection against Ozone Than Increasing Avoidance
- Jan Kopcewicz, Stanisław Lewak Fizjologia roślin 2012
- S. Grzesiuk, K. Kulka „Zasady formowania się nasion okrytozależkowych”
- Urszula Krasuska, Agnieszka Gniazdowska, Renata Bogatek „Rola ROS w fizjologii nasion” Kosmos problemy nauk biologicznych Polskie Towarzystwo Przyrodników im. Kopernika Tom 60 2011 numer 1-2 (290-291) strony 113-128
- Ruth G. Alscher, John L. Hess „The Antioxidants in Higher Plants”
- Mozafar A., Oertli J.J., 1993. Vitamin C (Ascorbic acid): Uptake and Metabolism by Soybean. Journal of Plant Physiology Vol. 141. Issue 3.
- V. Brukhin, N. Morozova Plant Growth and Development - Basic Knowledge and Current Views
- K. Janda, M. Kasprzak, J. Wolska Witamina C – budowa, właściwości, funkcje i występowanie
- P.L.Conklin Recent advances in the role and biosynthesis of ascorbic acid in plants
- Farbstein D., Kozak-Blickstein A., Levy A. P.: Antioxidant vitamins and their use in preventing cardiovascular disease. Molecules. 2010, 15 (11)
- Beatrycze Nowicka, Jerzy Kruk Reaktywne formy tlenu - więcej niż trucizna Tom 62 2013 Numer 4 (301) strony 583-596
- R. Shin, R. H. Berg, D. P. Schachtman Reactive Oxygen Species and Root Hairs in Arabidopsis Root Response to Nitrogen, Phosphorus and Potassium Deficiency
- Helena Martynowicz, Anna Skoczyńska, Michał Silber, Ryszard Andrzejak Rola stresu oksydacyjnego w patogenezie nadciśnienia tętniczego
- Jung Hee Joo, Yun Soo Bae, June Seung Lee Role of Auxin-Induced Reactive Oxygen Species in Root Gravitropism
- Michael J Considine, Christine H Foyer Oxygen and reactive oxygen species-dependent regulation of plant growth and development
- Juliette Leymarie, Giedrė Vitkauskaitė, Hai Ha Hoang, Emmanuel Gendreau, Virginie Chazole, Patrice Meimoun, Françoise Corbineau, Hayat El-Maarouf-Bouteau, Christophe Bailly Role of Reactive Oxygen