

**POLITECHNIKA ŚLĄSKA,  
WYDZIAŁ CHEMICZNY,  
KATEDRA CHEMII ORGANICZNEJ,  
BIOORGANICZNEJ  
I BIOTECHNOLOGII**

**JOANNA KANIA**

**PRACA DOKTORSKA**

**Aminopeptydazy z rzepaku - charakterystyka i wpływ wybranych  
czynników na ich aktywność**

**Oilseed rape aminopeptidases - characterization and influence  
of chosen factors on their activity**

Promotor : dr hab. inż. Danuta GILLNER Prof. Pol. Śl.

Gliwice 2019

## **Podziękowania**

*Chciałabym podziękować dr hab. inż. Danucie Gillner Prof. Pol. Śl. za opiekę merytoryczną, cenne uwagi i sugestie oraz niezliczone godziny konsultacji. Dziękuję również za stworzenie przyjaznej i niezapomnianej atmosfery w pracy.*

*Dziękuję dr hab. Marioli Głazek prof. nadzw. IOR oraz jej zespołowi z Instytutu Ochrony Roślin w Sośnicowicach za wskazówki i nieocenioną pomoc w realizacji badań z udziałem grzybów chorobotwórczych oraz fungicydów.*

*Dziękuję dr hab. inż. Tomaszowi Krawczykowi z Katedry Technologii Chemicznej, Organicznej i Petrochemii za pomoc w okiełznaniu obliczeń statystycznych.*

*Dziękuję moim koleżankom i kolegom z Katedry Chemii Organicznej, Bioorganicznej i Biotechnologii oraz z Katedry Technologii Chemicznej, Organicznej i Petrochemii za życzliwość i pomoc w realizacji tej pracy.*

*Na koniec, pragnę podziękować mojemu mężowi Karolowi za okazane wsparcie, oraz moim rodzicom i teściom, którzy na ostatnim etapie tworzenia tej pracy odciążyli mnie z obowiązków domowych i rodzicielskich.*

## Spis treści

|  |               |
|--|---------------|
| <i>Wykaz skrótów i nazw zwyczajowych</i>   | - 6 -         |
| <b>WPROWADZENIE</b>  | <b>- 8 -</b>  |
| <b>CEL PRACY</b>   | <b>- 10 -</b> |
| <b>CZĘŚĆ TEORETYCZNA</b>   | <b>- 12 -</b> |
| <b>1. Aminopeptydazy – znaczenie i klasyfikacja</b>  | <b>- 12 -</b> |
| <b>1.1. Podział aminopeptydaz</b>  | <b>- 13 -</b> |
| 1.1.1. <i>Klasyfikacja ze względu na mechanizm katalityczny</i>  | - 13 -        |
| 1.1.2. <i>Klasyfikacja ze względu na miejsce występowania w komórce</i>                                      | - 18 -        |
| 1.1.3. <i>Klasyfikacja ze względu na optimum pH</i>  | - 18 -        |
| 1.1.4. <i>Klasyfikacja ze względu na specyficzność substratową</i>   | - 19 -        |
| <b>2. Rola aminopeptydaz w organizmach roślinnych</b>  | <b>- 20 -</b> |
| <b>2.1. Udział aminopeptydaz w rozwoju i wzroście roślin</b>   | <b>- 21 -</b> |
| <b>2.2. Inne funkcje aminopeptydaz w roślinach</b>   | <b>- 25 -</b> |
| <b>2.3. Rola aminopeptydaz w reakcjach roślin na czynniki stresowe</b>                                       | <b>- 26 -</b> |
| 2.3.1. <i>Niska temperatura</i>  | - 27 -        |
| 2.3.2. <i>Deficyt wody</i>   | - 28 -        |
| 2.3.3. <i>Zasolenie</i>  | - 29 -        |
| 2.3.4. <i>Metale ciężkie</i>   | - 30 -        |
| 2.3.4. <i>Makro i mikroelementy</i>  | - 32 -        |
| 2.3.5. <i>Fitohormony</i>  | - 34 -        |
| 2.3.6. <i>Zranienie</i>  | - 35 -        |
| 2.3.7. <i>Atak patogenów</i>   | - 36 -        |
| 2.3.8. <i>Związki ropopochodne i wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne</i>                              | - 37 -        |
| 2.3.9. <i>Środki ochrony roślin</i>  | - 38 -        |
| <b>3. Rzepak – znaczenie</b>   | <b>- 40 -</b> |
| <b>3.1. Rys historyczny i uprawa rzepaku</b>   | <b>- 40 -</b> |
| <b>3.2. Fazy rozwoju rzepaku</b>   | <b>- 41 -</b> |
| <b>3.3. Środki uprawy roślin stosowane w produkcji rzepaku</b>   | <b>- 43 -</b> |
| <b>CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA</b>   | <b>- 47 -</b> |
| <b>4. Materiały i metody</b>   | <b>- 47 -</b> |
| <b>4.1. Stosowane odczynniki</b>   | <b>- 47 -</b> |
| <b>4.2. Stosowany sprzęt</b>   | <b>- 48 -</b> |
| <b>4.3. Ogólna metodyka oznaczania aktywności aminopeptydaz</b>  | <b>- 48 -</b> |
| <b>4.4. Nasiona rzepaku - izolacja aminopeptydaz oraz charakterystyka enzymów</b>                            | <b>- 49 -</b> |
| 4.4.1. <i>Oszacowanie masy molekularnej otrzymanego białka</i>   | - 50 -        |
| 4.4.2. <i>Wyznaczanie punktu izoelektrycznego</i>  | - 51 -        |
| 4.4.3. <i>Wyznaczanie <math>K_m</math> i <math>V_{max}</math></i>  | - 52 -        |
| 4.4.4. <i>Wyznaczanie stabilności termicznej enzymu oraz określenie zależności aktywności od temperatury</i> | - 52 -        |

|         |  |               |
|---------|--|---------------|
| 4.4.5.  | <i>Określenie zależności aktywności aminopeptydaz od pH</i>  | - 53 -        |
| 4.4.6.  | <i>Badanie wpływu wybranych jonów metali</i>   | - 53 -        |
| 4.4.7.  | <i>Określenie wpływu wybranych inhibitorów na aktywność aminopeptydaz rzepaku</i>  | - 53 -        |
|         | <b>4.5. Wyznaczenie profilu aktywności aminopeptydaz w pierwszych godzinach rozwoju siewek rzepaku oraz charakterystyka enzymów</b>    | <b>- 54 -</b> |
| 4.5.1.  | <i>Warunki uprawy rzepaku</i>  | - 54 -        |
| 4.5.2.  | <i>Przygotowanie ekstraktów białkowych</i>   | - 54 -        |
| 4.5.3.  | <i>Oszacowanie masy molekularnej</i>   | - 55 -        |
| 4.5.4.  | <i>Wyznaczanie zależności aktywności od temperatury</i>  | - 56 -        |
| 4.5.5.  | <i>Wyznaczanie zależności aktywności od pH</i>   | - 56 -        |
| 4.5.6.  | <i>Badanie wpływu wybranych jonów metali</i>   | - 56 -        |
| 4.5.7.  | <i>Badanie wpływu wybranych herbicydów</i>   | - 56 -        |
|         | <b>4.6. Badanie wpływu wybranych czynników na aktywność aminopeptydaz w siewkach rzepaku</b>   | <b>- 57 -</b> |
|         | <b>4.7. Badanie wpływu wybranych węglowodorów aromatycznych, benzyny i oleju napędowego, na aktywność aminopeptydaz siewek rzepaku</b> | <b>- 59 -</b> |
| 4.7.1.  | <i>Tryb i warunki uprawy</i>   | - 59 -        |
| 4.7.2.  | <i>Oznaczenie aktywności aminopeptydaz</i>   | - 60 -        |
|         | <b>4.8. Badanie wpływu zakażenia grzybami chorobotwórczymi na aktywność aminopeptydaz w siewkach rzepaku</b>                           | <b>- 60 -</b> |
| 4.8.1.  | <i>Tryb i warunki uprawy</i>   | - 60 -        |
| 4.8.2.  | <i>Oznaczenie aktywności aminopeptydaz</i>   | - 62 -        |
|         | <b>4.9. Badanie wpływu wybranych fungicydów na aktywność aminopeptydaz rzepaku na etapie formowania się łuszczyń</b>                   | <b>- 62 -</b> |
| 4.9.1.  | <i>Warunki uprawy polowej</i>  | - 62 -        |
| 4.9.2.  | <i>Terminy aplikacji fungicydów oraz dawki</i>   | - 63 -        |
| 4.9.3.  | <i>Przygotowanie ekstraktów</i>  | - 63 -        |
| 4.9.4.  | <i>Oznaczenie aktywności aminopeptydaz</i>   | - 63 -        |
| 4.9.5.  | <i>Określenie wpływu badanych fungicydów na aktywność aminopeptydaz w ekstraktach białkowych próby kontrolnej</i>                      | - 64 -        |
|         | <b>4.10. Analiza statystyczna</b>  | <b>- 64 -</b> |
|         | <b>4.11. Synteza substratów</b>  | <b>- 65 -</b> |
| 4.11.1. | <i>Synteza Gly-pNA, Met-pNA i Phe-pNA</i>  | - 65 -        |
| 4.11.2. | <i>Synteza Pro-pNA</i>   | - 66 -        |
|         | <b>WYNIKI</b>  | <b>- 67 -</b> |
|         | <b>5. Omówienie wyników</b>  | <b>- 67 -</b> |
|         | <b>5.1. Aminopeptydazy z nasion rzepaku ozimego – izolacja i charakterystyka</b>   | <b>- 67 -</b> |
| 5.1.1.  | <i>Izolacja i oczyszczanie aminopeptydaz z nasion rzepaku</i>  | - 68 -        |
| 5.1.2.  | <i>Wstępna charakterystyka aminopeptydaz z ekstrakcie białkowym z nasion rzepaku</i>   | - 73 -        |
| 5.1.3.  | <i>Charakterystyka oczyszczonego enzymu z nasion rzepaku ozimego</i>   | - 77 -        |
|         | <b>5.2. Profil zmian aktywności aminopeptydaz w pierwszych godzinach rozwoju siewek rzepaku</b>  | <b>- 89 -</b> |
|         | <b>5.3. Charakterystyka aminopeptydaz z ekstraktów z 120 h siewek rzepaku ozimego</b>  | <b>- 94 -</b> |
| 5.3.1.  | <i>Wpływ pH na aktywność aminopeptydaz w siewkach rzepaku</i>  | - 94 -        |
| 5.3.2.  | <i>Wpływ temperatury na aktywność aminopeptydaz w siewkach rzepaku</i>   | - 95 -        |

|        |   |                |
|--------|---|----------------|
| 5.3.3. | <i>Wpływ soli metali na aktywność aminopeptydaz w siewkach rzepaku</i>  | - 96 -         |
| 5.3.4. | <i>Oszacowanie masy molekularnej aminopeptydaz z 120 h siewek rzepaku ozimego</i>   | - 98 -         |
|        | <b>5.4. Wpływ wybranych czynników abiotycznych i hormonów roślinnych na aktywność aminopeptydaz w siewkach rzepaku ozimego</b>  | <b>- 100 -</b> |
| 5.4.1. | <i>Wpływ niskiej temperatury</i>  | - 102 -        |
| 5.4.2. | <i>Wpływ ograniczenia dostępu do światła</i>  | - 104 -        |
| 5.4.3. | <i>Wpływ wybranych makroelementów</i>   | - 105 -        |
| 5.4.4. | <i>Wpływ wybranych mikroelementów</i>   | - 116 -        |
| 5.4.5. | <i>Wpływ metali ciężkich</i>  | - 131 -        |
| 5.4.6. | <i>Wpływ roślinnych hormonów stresu</i>   | - 138 -        |
|        | <b>5.5. Wpływ wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych oraz zanieczyszczeń ropopochodnych na aktywność aminopeptydaz w siewkach rzepaku na wczesnym etapie wzrostu</b> | <b>- 140 -</b> |
| 5.5.1. | <i>Benzen, naftalen, antracen, fenantren</i>  | - 142 -        |
| 5.5.2. | <i>Olej napędowy i benzyna bezołowiowa (95)</i>   | - 145 -        |
|        | <b>5.6. Wpływ grzybów chorobotwórczych na aktywność aminopeptydaz w siewkach rzepaku-</b>   | <b>148 -</b>   |
|        | <b>5.7. Wpływ fungicydów na aktywność aminopeptydaz z rzepaku na etapie formowania się luszczyn</b>   | <b>- 154 -</b> |
|        | <b>PODSUMOWANIE I WNIOSKI</b>   | <b>- 163 -</b> |
|        | <b>DOROBEK NAUKOWY</b>  | <b>- 168 -</b> |
|        | <b>LITERATURA</b>   | <b>- 171 -</b> |

Wykaz skrótów i nazw zwyczajowych

|                  |       |   |
|------------------|-------|---|
| ABA              | kwask | (2Z,4E)-5-((S)-1-hydroksy-2,6,6-trimetylo-4-okso-cykloheks-2-enylo)-3-metylopenta-2,4-dienowy, (kwask absycsynowy)                          |
| Ala- <i>p</i> NA |       | <i>p</i> -nitroanilid alaniny   |
| APS              |       | nadtlenodisiarcznan diamonu   |
| BBCH             |       | skala określenia fitofizjologicznych faz wzrostu roślin ( <i>nierm.</i> Biologische Bundesanstalt, Bundessortenamt und Chemische Industrie) |
| cDNA             |       | komplementarny DNA  |
| DMSO             |       | dimetylosulfotlenek   |
| DTT              |       | (2S,3S)-1,4-dimerkaptobutano-2,3-diol (ditiotreitól)  |
| E-64             |       | <i>L</i> -trans-epoksy-sukcynylo- <i>L</i> -leucyloamino-(4-guanidyno) butan (inhibitor proteaz cysteinowych)                               |
| EDTA             |       | kwask etylenodiaminotetraoctowy   |
| EGTA             |       | kwask etylenoglikol- <i>O</i> - <i>O'</i> -bis(2-aminoetyl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetraoctowy  |
| FPLC             |       | średniociśnieniowa chromatografia cieczowa do rozdzielania białek ( <i>ang.</i> fast protein liquid chromatography)                         |
| Gly- <i>p</i> NA |       | <i>p</i> -nitroanilid glicyny   |
| GUS              |       | Główny Urząd Statystyczny   |
| HIV              |       | ludzki wirus niedoboru odporności (human immunodeficiency virus)  |
| HvMAP            |       | aminopeptydaza metioninowa z jęczmienia   |
| JA               | kwask | (1 <i>R</i> ,2 <i>R</i> )-3-okso-2-(2 <i>Z</i> )-2-pentenylocyklopentanoctowy, (kwask jasmonowy)  |
| LAP              |       | aminopeptydaza leucynowa  |
| LAP-A            |       | kwaśna aminopeptydaza leucynowa   |
| LAP-N            |       | neutralna aminopeptydaza leucynowa  |
| Leu- <i>p</i> NA |       | <i>p</i> -nitroanilid leucyny   |
| MAP              |       | aminopeptydaza metioninowa  |
| MCA              |       | 4-metylokumarylo-7-amid   |
| MeJA             |       | jasmonian metylu  |
| MES              |       | 2-[4-(metylosulfonylo)-2-nitrobenzoilo]cykloheksano-1,3-dion, (mezotrión)   |
| Met- <i>p</i> NA |       | <i>p</i> -nitroanilid metioniny   |
| NATIVE-PAGE      |       | elektroforeza w żelu poliakrylamidowym w warunkach natywnych  |
| NEM              |       | <i>N</i> -etylomaleimid   |
| <i>p</i> -NA     |       | <i>p</i> -nitroanilina  |
| PAGE             |       | elektroforeza w żelu poliakrylamidowym  |

|                  |  |
|------------------|--|
| PAP              | aminopeptydaza prolinowa   |
| PCE              | enzym hydrolizujący MCA pochodną fenyloalaniny (phenylalanyl-MCA cleaving enzyme)                    |
| Phe- <i>p</i> NA | <i>p</i> -nitroanilid fenyloalaniny  |
| PMSF             | fluorek fenylometylosulfonylu (inhibitor proteaz serynowych)   |
| Pro- <i>p</i> NA | <i>p</i> -nitroanilid proliny  |
| PVP              | poli-[1-(2-okso-1-pirolidynylo)etylen] (poliwinylopirolidon)   |
| RWC              | relatywna zawartość wody   |
| SA               | kwas 2-hydroksybenzoesowy, (kwas salicylowy)   |
| SDS              | dodecylosiarczan (VI) sodu   |
| SDS-PAGE         | elektroforeza w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących                                    |
| SUL              | 2-[2-chloro-4-(metylosulfonylo)benzoilo]-1,3-cykloheksanodion, (sulkotrion)                          |
| TEMB             | 2-[2-chloro-4-mesylo-3-[(2,2,2-trifluoroetylo)-metylo]-benzoilo] cykloheksano-1,3-dion, (tembotrion) |
| TEMED            | N,N,N',N'-tetrametyloetylenodiamina  |
| TCA              | kwas trichlorooctowy   |
| TFA              | kwas trifluorooctowy   |
| THF              | tetrahydrofuran  |
| Tris             | 2-amino-2-hydroksymetylopropan-1,3-diol  |
| TsPAP            | aminopeptydaza prolinowa z pszenżyta ( <i>Triticosecale</i> prolyl aminopeptidase)                   |
| WWA              | wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne   |

## WPROWADZENIE

Rzepak ozimy stanowi najważniejszy surowiec do produkcji oleju jadalnego, utwardzonych tłuszczów roślinnych i margaryn, w strefie klimatu umiarkowanego. Światowa produkcja rzepaku ciągle rośnie. W roku 2017 wyniosła ona ponad 76 mln ton, z czego niemal 35% wyprodukowano w Europie. Polska pod względem produkcji rzepaku zajmuje siódme miejsce na świecie i trzecie w Europie<sup>1</sup>. Uprawa rzepaku jest istotna, z uwagi na wykorzystanie rzepaku w przemyśle spożywczym, a także ze względu na możliwość stosowania odpadów po produkcji oleju do produkcji pasz. Olej rzepakowy stosuje się również do produkcji smarów biodegradowalnych, farb olejnych i lakierów, ekologicznych rozpuszczalników i plastyfikatorów, środków powierzchniowo czynnych i innych. Ponadto, olej rzepakowy jest surowcem do produkcji estrów metylowych kwasów tłuszczowych, które są stosowane jako biokomponent oleju napędowego<sup>2</sup>. W przeszłości, ze względu na wysoką zawartość kwasu erukowego oraz glukozynolanów, olej rzepakowy uważano za niskowartościowy, o przeznaczeniu przede wszystkim do celów technicznych. Wymienione składniki były niepożądane w diecie człowieka i zwierząt, dlatego dążono do ich wyeliminowania poprzez krzyżowanie odmian. W latach siedemdziesiątych ubiegłego wieku udało się otrzymać odmiany podwójnie ulepszone, pozbawione tych szkodliwych substancji, co przełożyło się na obecną popularność oleju rzepakowego.

Z uwagi na tak rozległe zastosowanie rzepaku, oraz fakt, że jest to najlepiej plonująca roślina oleista w klimacie umiarkowanym, ważne jest stosowanie odpowiedniej metody uprawy. Na zrównoważoną uprawę rzepaku ozimego składa się nie tylko odpowiednio dobrany materiał siewny czy jakość gleby, ale też ochrona przed różnego rodzaju czynnikami stresowymi<sup>3</sup>. Czynniki te można podzielić na abiotyczne i biotyczne. Do abiotycznych czynników zalicza się promieniowanie, zmiany temperatury, niedobór wody, nadmiar lub niedomiar minerałów, zasolenie czy obecność metali ciężkich. Ponadto czynnikiem abiotycznym może być również zranienie wywołane nieożywionymi składnikami natury (wiatr, śnieg, lód). Stresowe czynniki biotyczne dzieli się ze względu na ich pochodzenie na roślinne, zwierzęce, pochodzące od mikroorganizmów oraz antropogeniczne (zanieczyszczenia, pestycydy, pożary)<sup>4</sup>. Do zjawisk powodujących największe straty w uprawie rzepaku ozimego należą: niekorzystne warunki atmosferyczne, chwasty, choroby wywoływane przez grzyby i szkodniki<sup>2</sup>. Naturalnie, roślina posiada zdolność uruchomienia mechanizmów obronnych mających znieść efekty działania tych czynników. W odpowiedzi na stres często dochodzi do uruchomienia alternatywnych dróg metabolicznych i pobudzenia procesów naprawczych, prowadzących do syntezy niektórych białek i substancji obronnych<sup>4</sup>. Jednym z istotnych aspektów zapewnienia wysokich plonów jest poznanie zarówno szlaków metabolicznych jak i enzymów biorących udział w tych szlakach. Dotyczy to zarówno warunków standardowych jak i stresowych. Badania na różnorodnych gatunkach roślin udowodniły, że w wielu istotnych procesach



fizjologicznych ważną rolę odgrywają aminopeptydazy. Aminopeptydazy roślinne zaangażowane są między innymi w procesy związane z dojrzewaniem degradacją białek, transportem auksyn czy mejozą. Ponadto, aminopeptydazy metioninowe zaangażowane są w potranslacyjną obróbkę białek<sup>5</sup>. Aminopeptydazy są aktywne podczas całego okresu rozwoju i wzrostu roślin, a na niektórych etapach następuje szczególny wzrost ekspresji genów kodujących te enzymy. Do szczególnej intensyfikacji ekspresji genów kodujących aminopeptydazy dochodzi podczas kiełkowania roślin. Na tym etapie wzrostu, dochodzi do wzmożonej hydrolizy białek zapasowych katalizowanej przez aminopeptydazy, co dostarcza roślinie niezbędnej energii do kiełkowania, nim rozpocznie się proces fotosyntezy<sup>6</sup>. Istotny wzrost aktywności aminopeptydaz obserwowano również w starzejących się, wędnących roślinach. Podczas tego ostatniego etapu życia rośliny, podwyższona ekspresja/aktywność aminopeptydaz opóźnia procesy wędnięcia, poprzez hydrolizę (usuwanie) niepoprawnie sfałdowanych bądź uszkodzonych białek<sup>7</sup>. Z doświadczeń przeprowadzonych na różnorodnych gatunkach roślin (pomidor, nikla indyjska, *Arabidopsis thaliana*) wynika, że aminopeptydazy zaangażowane są również w odpowiedź obronną roślin na szkodliwe czynniki środowiska<sup>7-9</sup>. Dzięki hydrolizie *N*-końcowego aminokwasu, uwalniane są aminokwasy będące osmoprotektantami (prolina, glicyna). Aminopeptydazy są również kluczowe w procesach potranslacyjnych modyfikacji białek.

Ze względu na tak kluczową rolę aminopeptydaz w fizjologii roślin oraz znaczenie rzepaku w przemyśle spożywczym, szerokie poznanie tych enzymów w tej roślinie jest bardzo ważne. Istotność prowadzonych badań podwyższa fakt, że do tej pory ukazało się niewiele publikacji z tego zakresu. W niniejszej pracy przedstawiono charakterystykę aminopeptydaz z nasion oraz siewek rzepaku. Określono również jak zmienia się aktywność tych enzymów na różnych etapach wzrostu rośliny. Szczególną uwagę poświęcono badaniu wpływu różnorodnych czynników (biotycznych i abiotycznych) na zmiany w aktywności aminopeptydaz.

## **CEL PRACY**

Ogromne znaczenie rzepaku jako głównej rośliny oleistej w obszarze klimatu umiarkowanego oraz fakt, że aminopeptydazy pełnią wiele istotnych funkcji we wzroście i rozwoju roślin, sprawia, że stanowią one niezwykle ciekawy obiekt badań. Określenie jak zmienia się aktywność tych enzymów podczas poszczególnych etapów wzrostu oraz w jakim stopniu uczestniczą one w odpowiedzi na różne czynniki stresowe, jest bardzo ważne ze względu na skalę upraw tej rośliny w Polsce i związaną z tym ilością używanych środków ochrony roślin. Dogłębne poznanie roli aminopeptydaz rzepaku, zarówno w obrębie organizmu roślinnego jak i w kontekście oddziaływania roślina - środowisko, ma istotne znaczenie poznawcze i może mieć zastosowanie praktyczne. Może się to przyczynić do zwiększenia plonowania tej rośliny poprzez poprawę warunków uprawy jak i opracowania lepszej ochrony tych roślin przed szkodliwymi czynnikami środowiska.

**Celem niniejszej pracy była charakterystyka aminopeptydaz rzepaku ozimego na różnych etapach wzrostu jak i określenie zmian ich aktywności pod wpływem różnych czynników.**

W tym celu dokonano izolacji i charakterystyki aminopeptydaz z rzepaku ozimego na różnych etapach wzrostu rośliny, w tym roślin poddanych działaniu różnorodnych czynników. Badania opisane w niniejszej pracy obejmowały:

- Izolację oraz charakterystykę oczyszczonej aminopeptydazy z suchych nasion rzepaku (określenie specyficzności substratowej, parametrów kinetycznych, punktu izoelektrycznego oraz masy molekularnej, określenie stabilności termicznej, wpływ pH, temperatury i jonów metali oraz badania z udziałem selektywnych inhibitorów proteaz).
- Określenie profilu zmian aktywności aminopeptydaz w siewkach rzepaku w pierwszych godzinach kiełkowania, począwszy od suchego ziarna, poprzez imbibicję, pojawienie się korzenia i łodyżki z liścieniami, do 144 godziny uprawy. Etap ten wymagał opracowania powtarzalnej metody uprawy rzepaku w warunkach laboratoryjnych oraz metody przygotowania ekstraktów białkowych z nasion i siewek. Na podstawie otrzymanego profilu aktywności wybrano do charakterystyki aminopeptydazy z ekstraktów z siewek po 120 godzinach wzrostu. Badania te obejmowały: oszacowanie masy molekularnej, wpływ pH, temperatury, jonów metali oraz wybranych herbicydów na aktywność badanych enzymów w ekstraktach.
- Określenie wpływu szeregu czynników stresowych na aktywność aminopeptydaz rzepaku ozimego. Badania przeprowadzono stosując zarówno czynniki abiotyczne jak i biotyczne różnego pochodzenia i na różnych etapach wzrostu rzepaku. W zależności

od stosowanych czynników, uprawę rzepaku prowadzono warunkach laboratoryjnych, w szklarni lub w warunkach polowych.

- W warunkach laboratoryjnych na młodych siewkach (144 godziny uprawy) przeprowadzono badania wpływu przede wszystkim czynników abiotycznych: niskiej temperatury, ograniczenia dostępu do światła, wpływu różnych stężeń wybranych mikro- i makroelementów, wpływu metali ciężkich oraz hormonów roślinnych (czynniki biotyczne).
- Na 14-dniowych roślinach (uprawa w laboratorium) przeprowadzono badania nad wpływem zanieczyszczenia benzenem i wybranymi wielopierścieniowymi węglowodorami aromatycznymi (WWA) oraz benzyną i olejem napędowym (czynniki abiotyczne pochodzenia antropogenicznego).
- W szklarni, na siewkach (33 i 47 dni) zbadano wpływ infekcji trzema gatunkami grzybów chorobotwórczych (*Pythium Aristosporum*, *Rhizoctonia cerealis*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium culmorum*) (czynniki biotyczne).
- W warunkach polowych, ze względu na sugerowane przez producentów terminy aplikacji, zbadano wpływ wybranych fungicydów (Pictor 400 SC, Propulse 250 SE, Symetra 325 SC) na aktywność aminopeptydaz rzepaku na etapie formowania się łuszczyń.

Badania nad rzepakiem uprawianym w szklarni oraz w warunkach polowych były realizowane we współpracy z Instytutem Ochrony Roślin – Państwowy Instytut Badawczy, w zespole dr hab. Marioli Głazek, prof. nadzw. IOR.

## CZEŚĆ TEORETYCZNA

### 1. Aminopeptydazy – znaczenie i klasyfikacja

Aminopeptydazy (EC 3.4.11) należą do grupy enzymów kluczowych w procesie modyfikacji białek w różnych organizmach. Podstawową funkcją tych enzymów jest hydroliza pojedynczego aminokwasu z *N*-końca łańcucha peptydowego<sup>10</sup>. Aminopeptydazy w organizmach ssaków zaangażowane są m.in. w utrzymanie homeostazy ciąży<sup>11</sup>, regulację ciśnienia krwi<sup>12</sup>, regulację działania komórek neuronalnych<sup>13</sup> czy biosyntezę i degradację enkefalin<sup>14</sup>. Wzrost aktywności aminopeptydaz często ma miejsce w odpowiedzi na czynniki szkodliwe czy stany patologiczne. Na przykład, w następstwie zranienia rośnie aktywność aminopeptydazy leucynowej i alaninowej u szczurów<sup>15</sup>. Obserwuje się również wzrost aktywności membranowej aminopeptydazy AP-N w przypadku wystąpienia nowotworu trzustki czy wątroby oraz w sytuacji uszkodzenia wątroby, wynikającego z nadmiernego spożywania alkoholu i przyjmowania narkotyków<sup>14</sup>. Natomiast spadek aktywności niektórych aminopeptydaz może mieć negatywne skutki dla zdrowia. Udowodniono, że obniżona aktywność aminopeptydazy leucynowej z bydlęcej soczewki, sprzyja powstawaniu katarakty<sup>16</sup>. Aminopeptydazy pełnią również interesujące i ważne funkcje w bakteriach i pasożytach. W przecinkowcu cholery (*Vibrio cholerae*) zaangażowane są one w produkcję toksyn cholery<sup>17</sup>, w *E. coli* i pałeczkach *Salmonella*, pepA (aminopeptydaza A) pełni funkcję represora transkrypcyjnego, w regulacji biosyntezy pirymidyn<sup>18</sup>. Odkryto również, że niektóre bakteryjne aminopeptydazy odpowiadają za zwiększoną wrażliwość bakterii na wybrane antybiotyki. Na przykład, aminopeptydaza Xc z *Xanthomonas citri*, hydrolizując *N*-końcową alaninę z cząsteczki askomycyny, umożliwia transport antybiotyku do wnętrza komórki bakterii<sup>19</sup>. W *Plasmodium falciparum* (pasożycie wywołującym malarię), LAP bierze udział w trawieniu hemoglobiny gospodarza<sup>20</sup>. Aminopeptydaza leucynowa odgrywa podobną rolę w organizmach innych pasożytów, na przykład u *Fasciola gigantica*<sup>21</sup> (motylca olbrzymia, wywołująca fascjiozę) czy *Paragonimus westermani*<sup>22</sup> (pasożytnicza przywra, wywołująca paragonimozę). Według najnowszych doniesień aminopeptydaza leucynowa odgrywa również kluczową rolę w odżywianiu pasożyta *Echinococcus granulosus* (tasiemiec bąblowcowy, odpowiedzialny za występowanie bąblowicy). Enzym ten obecny jest w tkance parenchymatycznej, na hakach i na całej powłoce robaka. Ponadto obecność tego enzymu w serum zainfekowanych zwierząt (owiec), może być markerem diagnostycznym występowania bąblowicy<sup>23</sup>. Ze względu na znaczenie aminopeptydaz w procesach fizjologicznych, stanowią one cel molekularny opracowywanych leków. Między innymi enzymy te rozpatrywane są jako cele molekularne leków przeciwko wirusowi HIV<sup>24</sup>, malarii<sup>25,26</sup> czy leków przeciwnowotworowych<sup>27</sup>. Są one również rozpatrywane jako indykatory chorób w analityce medycznej (rak wątroby, dróg żółciowych i trzustki)<sup>28</sup>. W porównaniu do ilości doniesień opisujących

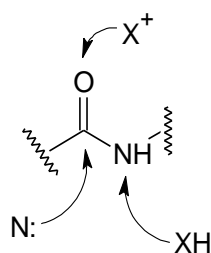
aminopeptydazy pochodzenia ludzkiego, zwierzęcego, bakteryjnego czy pasożytniczego, stosunkowo niewiele jest informacji na temat aminopeptydaz roślinnych. Nie zmienia to jednak faktu, że aminopeptydazy roślinne stanowią interesujący i ważny obiekt badań, ze względu na powszechność ich występowania i pełnione funkcje, które szerzej zostaną omówione w rozdziale drugim.

### **1.1. Podział aminopeptydaz**

Istnieje co najmniej kilka kategorii, według których można podzielić aminopeptydazy. Kryterium może być miejsce działania w komórce, specyficzność substratowa czy pH, w którym enzym wykazuje najwyższą aktywność. Często stosuje się klasyfikację na podstawie mechanizmu katalizy. Ten rozdział jest poświęcony omówieniu wymienionych kategorii podziału aminopeptydaz. Szczególną uwagę poświęcono przyporządkowaniu aminopeptydaz ze względu na mechanizm katalizowanych reakcji.

#### *1.1.1. Klasyfikacja ze względu na mechanizm katalityczny*

Ze względu na mechanizm hydrolizy, w której uczestniczą proteazy, można je podzielić na: proteazy cysteinowe, serynowe, aspartyłowe i metaloproteazy<sup>29</sup>. Generalnie mechanizm hydrolizy wiązań peptydowych katalizowany przez proteazy, wykorzystuje jako nukleofil albo reszty aminokwasowe (proteazy serynowe, cysteinowe) albo cząsteczkę wody (proteazy aspartyłowe, metaloproteazy). Odpowiednie grupy chemiczne znajdujące się w centrum aktywnym enzymu oddziałują na atomy węgla, tlenu i azotu wiązania peptydowego, co przedstawiono na rysunku nr 1. Grupa elektrofilowa ( $X^+$ ) polaryzuje wiązanie karbonyłowe. Nukleofil (N:) atakuje węgiel karbonyłowy substrat, co prowadzi do powstania tetredrycznego produktu pośredniego. Następnie dochodzi do przeniesienia protonu z donora (XH) na grupę aminową, czemu towarzyszy rozerwanie wiązania<sup>30,31</sup>. Mechanizm katalizy z udziałem poszczególnych grup proteaz różni się nieco między sobą. Każda grupa proteaz wykorzystuje inne aminokwasy centrum aktywnego do przeprowadzenia katalizy. Z tego względu, dla każdej z grup proteaz stosuje się odpowiednie inhibitory, które pozwalają na jednoznaczne przypisanie enzymu do danej klasy.



Rys.1. Ogólny schemat oddziaływań grup katalitycznych na wiązanie peptydowe podczas hydrolizy katalizowanej przez peptydazy (N:-nucleofil, X<sup>+</sup>-elektrofil, XH-grupa protonodonorowa)<sup>30</sup>

### Proteazy cysteinowe

Proteazy cysteinowe nazywane są też tiolowymi lub sulfhydryłowymi. Ich nazwa związana jest z mechanizmem hydrolizy białek. W proteazach cysteinowych kluczowe dla przebiegu reakcji katalitycznej są dwa aminokwasy znajdujące się w centrum aktywnym Cys i His. Podczas hydrolizy reszta histydyny deprotonuje grupę tiolową cysteiny, anion tiolanowy atakuje węgiel karbonylowy wiązania peptydowego i powstaje pierwszy tetraedryczny produkt pośredni. Dalej następuje atak nukleofilowy cząsteczki wody na powstały produkt pośredni z utworzeniem drugiego produktu pośredniego. Dochodzi do hydrolizy, w wyniku której uwolniony zostaje produkt (wolny aminokwas) i następuje regeneracja enzymu<sup>32,33</sup>. W roślinach występuje ponad 140 proteaz cysteinowych należących do 15 rodzin i 5 różnych klanów<sup>34</sup>. Wśród nich znajdują się aminopeptydazy. W celu określenia przynależności aminopeptydazy do tej grupy proteaz stosuje się następujące inhibitory grupowe: *N*-etyloimid kwasu maleinowego (NEM), kwas *p*-chlorortęciowobenzoowy (*p*CMB)<sup>35</sup>, kwas (1*S*,2*S*)-2-(((*S*)-1-((4-guanidynobutylo)amino)-4-metylo-1-oksopentan-2-yl)karbamoilo)cyklopropanokarboksylowy (E-64)<sup>36</sup> i jodoacetamid<sup>37</sup> (wzory strukturalne wybranych inhibitorów podano w tab. 1 umieszczonej na końcu tego rozdziału). Przykładem aminopeptydazy cysteinowej jest np. AP1 z liścieni pszenicy, która jest inhibowana przez NEM i *p*CMB<sup>38</sup>, AP z liści owsa<sup>39</sup> oraz aminopeptydaza II z alg *Chara australis*<sup>40</sup>.

### Proteazy serynowe

Mechanizm katalityczny proteaz serynowych jest podobny do mechanizmu proteaz cysteinowych. W przebieg katalizy zaangażowane są trzy aminokwasy: His, Ser i Asp (triada katalityczna). Proteazy te wykorzystują grupę hydroksylową reszty seryny w ataku nukleofilowym na węgiel karbonylowy wiązania peptydowego, co skutkuje powstaniem pierwszego tetraedrycznego produktu pośredniego. Jednocześnie następuje transfer protonu z grupy OH seryny na atom azotu grupy imidazoliowej histydyny i powstania jonu imidazoliowego (odpowiednią orientację His wspiera grupa karboksylanowa Asp, która dodatkowo stabilizuje powstały jon). Dochodzi do rozerwania wiązania peptydowego. Azot grupy odchodzącej wraz z histydyną tworzy przejściowy kompleks

acyloenzymu (drugi tetraedryczny produkt pośredni). W następnym etapie, kompleks ten ulega hydrolizie pod wpływem wody, po jego rozpadzie dochodzi do regeneracji enzymu i uwolnienia produktu (wolnego aminokwasu)<sup>33,41</sup>. Szacuje się, że w roślinach występuje około 200 proteaz serynowych, należących do 14 różnych rodzin podzielonych na 9 klanów<sup>34</sup>. W badaniach nad aminopeptydazami serynowymi, często jako inhibitory wykorzystuje się PMSF, DFP i związki będące krótkimi peptydami, które przedstawiono w tabeli 1. Przykładem takich oligopeptydów jest antypaina, która łączy się wiązaniem kowalencyjnym z grupą hydroksylową seryny w enzymie czy leupeptyna, która jest inhibitorem trypsyno-podobnych proteaz serynowych. Stosuje się także chymostatynę, która jest najczęściej mieszaniną trzech oligopeptydów różniących się między sobą jednym aminokwasem (tabela 1)<sup>42,43</sup>. Wśród roślinnych aminopeptydaz serynowych wyróżnić można, między innymi, aminopeptydazę z rzodkwi japońskiej (*Raphanus sativus*),<sup>42</sup> katalizującą preferencyjnie hydrolizę aromatycznych aminokwasów z *N*-końca łańcucha białkowego oraz aminopeptydazę prolinową 1 z pszenżyta (*Triticosecale*)<sup>44,45</sup>. Cechy peptydaz serynowych posiada również aminopeptydaza z nasion jęczmienia (inhibitorem jest DFP)<sup>36</sup>

#### *Porteazy aspartyłowe*

W hydrolizie zachodzącej z udziałem proteaz aspartyłowych, nukleofilem jest cząsteczka wody. Woda oddziałuje z grupą karboksylową łańcucha bocznego jednej z dwóch cząsteczek kwasu asparaginowego, znajdujących się w centrum aktywnym. Reakcja zachodzi jednoetapowo. Jedna cząsteczka kwasu asparaginowego działa jak zasada i aktywuje cząsteczkę wody przez oderwanie protonu, po czym zachodzi atak nukleofilowy na węgiel karbonyłowy wiązania peptydowego substratu. Natomiast druga cząsteczka asparaginianu jest donorem protonu i umożliwia powstanie tetraedrycznego produktu przejściowego. Następnie dochodzi do protonacji azotu wiązania peptydowego i do rozerwania tego wiązania<sup>46</sup>. W roślinach rozróżnić można proteazy aspartyłowe należące do czternastu różnych rodzin<sup>47</sup>. Enzymy te wykazują najwyższą aktywność w stosunkowo niskim pH (poniżej 6). Natomiast wśród przedstawicieli proteaz aspartyłowych o pochodzeniu innym niż roślinne, wyróżnić można reninę czy proteazę HIV-1, które charakteryzują się wyjątkowo niskim optimum pH wynoszącym nawet 2-3<sup>48</sup>. i W większości, proteazy aspartyłowe inhibowane są przez pepstatynę (tabela 1). Są to przede wszystkim endopeptydazy<sup>49</sup>, dlatego też nie zidentyfikowano do tej pory aminopeptydazy należącej do tej grupy.

#### *Metaloproteazy*

Metaloproteazy to proteazy, które wymagają obecności jonu metalu do swojej aktywności. Najczęściej są to dwuwartościowe jony cynku, kobaltu lub manganu, rzadziej niklu czy miedzi. Jon metalu jest skoordynowany z łańcuchami bocznymi aminokwasów. Aminokwasami tymi najczęściej są: His, Asp, Glu lub Lys. Niektóre z metaloproteaz posiadają dwa jony metalu. Jon metalu skoordynowany jest także z labilną cząsteczką wody, która po aktywacji przeprowadza atak

nukleofilowy na węgiel karbonylowy wiązana peptydowego substratu. Powstaje tetraedryczny produkt pośredni, związany koordynacyjnie z jonem metalu. Następnie reszta jednego z wymienionych wcześniej aminokwasów (najczęściej Glu) protonuje azot wiązania amidowego i dochodzi do rozerwania wiązania peptydowego<sup>50-52</sup>. W genomie *Arabidopsis thaliana* rozróżnia się 81 genów kodujących metaloproteazy, należące do 12 różnych rodzin. Do tej grupy enzymów należą zarówno endo- jak i egzopeptydazy, w tym aminopeptydazy<sup>50,51</sup>. Inhibitorem metaloaminopeptydaz jest bestatyna (związek wyizolowany z *Streptomyces olivoreticuli*)<sup>53</sup>. Jako inhibitory tych enzymów stosuje się także związki chelatujące jony metali takie jak EDTA, kupferron czy 1,10-fenantrolinę<sup>36</sup> (struktury w tabeli 1). Spośród metaloaminopeptydaz roślinnych najszerszej opisane są aminopeptydazy leucynowe (LAP). Na szczególną uwagę zasługują aminopeptydazy leucynowe wyizolowane z pomidora. W tej roślinie scharakteryzowano neutralną aminopeptydazę leucynową (LAP-N), ekspresjonowaną w komórkach roślinnych w sposób ciągły oraz kwaśną aminopeptydazę leucynową (LAP-A) (określenia kwaśna i neutralna aminopeptydaza odnoszą się do wartości punktu izoelektrycznego tych enzymów). Aminopeptydazy leucynowe podobne do LAP-N z pomidora występują we wszystkich roślinach<sup>54</sup>. W ogórku zidentyfikowano na przykład metaloaminopeptydazę o preferencji wobec alaniny<sup>55</sup>. W *Arabidopsis thaliana* występują co najmniej cztery aminopeptydazy będące metaloproteazami (aminopeptydaza alanylowa z rodziny M1, aminopeptydaza aspartyłowa z rodziny M18 oraz aminopeptydaza metioninowa i aminopeptydaza P z rodziny M24)<sup>50</sup>.



Tab.1. Typy proteaz i ich specyficzne inhibitory wraz ze wzorami strukturalnymi

| Typ proteaz          | Inhibitory        |                                     |
|----------------------|-------------------|-------------------------------------|
|                      | Skrót nazwy       | Struktura chemiczna                 |
| Proteazy cysteinowe  | NEM               |                                     |
|                      | pCMB              |                                     |
|                      | E-64              |                                     |
|                      | jodoacetamid      |                                     |
| Proteazy serynowe    | PMSF              |                                     |
|                      | DFP               |                                     |
|                      | chymostatyna      | <br>R=grupa boczna Leu, Val lub Ile |
|                      | leupeptyna        |                                     |
|                      | antypaina         |                                     |
| Proteazy aspartylowe | pepstatyna A      |                                     |
| Metaloproteazy       | EDTA              |                                     |
|                      | kupferron         |                                     |
|                      | 1,10-fenantrolina |                                     |
|                      | bestatyna         |                                     |

### 1.1.2. Klasyfikacja ze względu na miejsce występowania w komórce

Innym kryterium klasyfikacji jest miejsce występowania enzymu w komórce. Przykładowo, w *Arabidopsis thaliana* występuje co najmniej kilka aminopeptydaz o różnej specyficzności substratowej, zlokalizowanych w różnych częściach komórki. Na przykład, w cytozolu występują dwie aminopeptydazy metioninowe<sup>56</sup>. Natomiast z błonami komórkowymi związane są dwie aminopeptydazy odpowiedzialne za transport auksyn<sup>57</sup>, a w jądrze komórkowym znajduje się inna aminopeptydaza zaangażowana w profazę mejozy<sup>58</sup>. Ponadto, w tej roślinie występują aminopeptydazy związane z innymi organellami komórkowymi np. mitochondriami czy chloroplastami<sup>59</sup>. Opisano również aminopeptydazy sekrecjonowane przez komórki roślinne. Przykładem może być aminopeptydaza z maku lekarskiego, aktywna wobec trzech różnych aminokwasów (alaniny, fenyloalaniny i tyrozyny),<sup>60</sup> czy aminopeptydaza z amsonii nadreńskiej (bylina, roślina ozdobna o niebieskich kwiatach), hydrolizująca substraty posiadające na *N*-końcu Ala, Arg i Tyr<sup>61</sup>. Zewnątrzkomórkowe aminopeptydazy roślinne mogą w przyszłości znaleźć zastosowanie w produkcji leków, czy też zostać użyte jako biokatalizatory, w przyjaznych dla środowiska technologiach produkcji substancji chemicznych.

### 1.1.3. Klasyfikacja ze względu na optimum pH

Kolejną kategorią klasyfikacji może być optimum pH, w którym enzym wykazuje najwyższą aktywność. Ze względu na optimum pH aminopeptydazy dzieli się na dwie główne grupy: aminopeptydazy neutralne oraz zasadowe (do tej pory nie zidentyfikowano aminopeptydaz o optimum pH poniżej 6,0)<sup>35,62</sup>. Roślinne aminopeptydazy neutralne, o optimum pH 6,5-7,5, zazwyczaj preferencyjnie hydrolizują hydrofobowe aminokwasy z *N*-końca peptydów, ich masa molekularna oscyluje między 60-130 kDa i ulegają inhibicji przez związki zawierające grupy tiolowe. Przykładami takich enzymów są dwie aminopeptydazy z grochu zwyczajnego (optimum pH 6,8 i 7,0; masa molekularna 58 i 74 kDa), aminopeptydaza z moreli, nazwana AP1, o optimum pH w zakresie 6,5-7,0 (masa molekularna 58 kDa), czy też aminopeptydaza z nasion konopi siewnej (optimum pH 7,0, masa molekularna 78 kDa)<sup>35,63</sup>.

Aminopeptydazy zasadowe, wykazujące zazwyczaj optimum pH w zakresie 8,0-10,5, charakteryzują się stosunkowo dużą masą molekularną (150-330 kDa) i są z reguły metalopeptydazami, ulegającymi inhibicji pod wpływem bestatyny, EDTA czy 1,10-fenatroliny<sup>62</sup>. Do tego typu enzymów zaliczyć można co najmniej dwie aminopeptydazy z kukurydzy (nazwane AMP2 i AMP3), o optimum pH 8,5 i 8,3, aminopeptydazę z liści ogórka o optimum pH 8,0-9,0 i masie molekularnej 200 kDa, LAP z ziemniaka (pH 10,0), aminopeptydazę leucynową z jęczmienia (optimum pH 8,5-10,5, masa 260 kDa) i wiele innych<sup>35,55</sup>.

Ponadto funkcjonuje podział aminopeptydaz ze względu na punkt izoelektryczny (pI). Najczęściej podział ten stosowany jest przy charakterystyce aminopeptydaz leucynowych, które mogą

być neutralne (o neutralnym pI) lub kwaśne (o kwaśnym pI). Sztandarowymi przykładami tych aminopeptydaz są neutralna aminopeptydaza leucynowa z pomidora (LAP-N) (pI 6,29-7,8) oraz kwaśna aminopeptydaza z pomidora (LAP-A) (pI 5,6-5,9)<sup>64-66</sup>. LAP-N jest enzymem konstytutywnie występującym w pomidorze. Natomiast gen kodujący LAP-A (o kwaśnym pI) jest ekspresjonowany pod wpływem stresu biotycznego i abiotycznego<sup>54,65</sup>.

#### 1.1.4. Klasyfikacja ze względu na specyficzność substratową

Często stosuje się również podział aminopeptydaz ze względu na specyficzność substratową. Podział ten jest stosowany od dawna. Jego główną wadą jest fakt, że wiele aminopeptydaz znacznie różniących się od siebie otrzymało podobne nazwy<sup>35</sup>. Znane są zarówno aminopeptydazy o wąskiej jak i szerokiej specyficzności substratowej. Wśród licznej grupy aminopeptydaz o stosunkowo szerokiej specyficzności substratowej, często spotyka się enzymy o preferencji w stosunku do pewnej grupy aminokwasów (np. z bocznymi grupami hydrofobowymi lub hydrofilowymi, dużymi lub małymi). Wynika to z budowy tych enzymów (szczególnie budowy centrum aktywnego). Na podstawie preferencji enzymu do substratu można wyróżnić cztery główne grupy aminopeptydaz.

Pierwszą grupę stanowią najliczniejsze i najbardziej różniące się między sobą aminopeptydazy leucynowe (LAP). Enzymy preferencyjnie katalizujące hydrolizę *N*-końcowej leucyny zostały opisane w wielu gatunkach roślin, w tym w pomidorze, tytoniu, jęczmieniu, nikli indyjskiej czy ziemniaku<sup>54</sup>. Przykładowo, w liściach nikli indyjskiej zidentyfikowano dwie aminopeptydazy leucynowe. Enzymy te charakteryzowały się masą molekularną w zakresie 41-60 kDa, optimum pH 7,0 i były inhibowane przez 1,10-fenantrolinę i bestatynę. Co ciekawe, aktywność jednego z tych enzymów znacząco rosła w odpowiedzi na czynniki stresowe<sup>67</sup>. Innym przykładem aminopeptydazy leucynowej jest enzym z fasoli zwyczajnej, o masie molekularnej 360 kDa i optimum pH przypadającym na 9,0, inhibowany przez *p*CMB, bestatynę i 1,10-fenantrolinę<sup>35</sup>.

Drugą grupę stanowią aminopeptydazy metioninowe, powszechnie występujące z uwagi na udział procesach potranslacyjnych (o funkcji tych enzymów napisano szerzej w rozdziale 2.1.). Przykładem może być aminopeptydaza metioniowa z jęczmienia HvMAP, inhibowana przez EDTA i zlokalizowana w jądrze komórkowym, której aktywność zmienia się pod wpływem czynników stresowych<sup>68</sup>. Natomiast w *Arabidopsis thaliana* występuje sześć genów kodujących sześć różnych aminopeptydaz metioninowych, różniących się od siebie między innymi lokalizacją w komórce, a ich aktywność jest niezbędna do prawidłowego wzrostu rośliny<sup>56,69</sup>.

Aminopeptydazy prolinowe to inna grupa, która jest zaangażowana w mechanizmy chroniące roślinę przed skutkami suszy (np. aminopeptydaza prolinowa 1 z *Arabidopsis thaliana*<sup>70</sup>) (znaczenie fizjologiczne tych aminopeptydaz w roślinach opisano szerzej w rozdziale 2.3). Innym przykładem aminopeptydazy prolinowej jest enzym z pszenżyta, będący monomerem o masie molekularnej 43,9 kDa, o pI 7,73, inhibowany przez PMSF i DFP<sup>44,71</sup>.

Dużą grupę stanowią aminopeptydazy o wysokim powinowactwie do aminokwasów hydrofobowych takich jak fenyloalanina. Do tej grupy zalicza się aminopeptydazę z liścieni pszenicy, która charakteryzuje się wysoką aktywnością wobec substratów zawierających *N*-końcową fenyloalaninę, tryptofan czy tyrozynę. Enzym ten wykazuje optimum pH 7,6 i jest inhibowany między innymi przez *pCMB*<sup>38</sup>. Innym przykładem jest enzym z liścieni rzodkwi japońskiej, będący monomerem o masie molekularnej około 78 kDa, o wysokiej aktywności wobec substratów z *N*-końcową tyrozyną i fenyloalaniną<sup>42</sup>.

Wybrane przykłady aminopeptydaz o różnej specyficzności substratowej przedstawiono w tabeli 2.

Tab.2. Charakterystyka wybranych aminopeptydaz pochodzenia roślinnego

| Nazwa aminopeptydazy                  | Źródło                    | Typ proteazy | Optimum pH | Specyficzność substratowa   | Masa molekularna [kDa] | Lokalizacja w komórce    | Lit.  |
|---------------------------------------|---------------------------|--------------|------------|---|------------------------|--------------------------|-------|
| Aminopeptydaza 1 (AP1)                | liścienie pszenicy        | C            | 7,6        | Phe, Tryp, Tyr  | 57                     | chloroplasty, cytoplazma | 38,72 |
| Aminopeptydaza z nasion słonecznika   | nasiona słonecznika       | C            | 7,5-8,0    | aminokwasy o dużej hydrofobowej grupie bocznej, szczególnie Phe i Leu | 80                     | b.d.                     | 73    |
| Aminopeptydaza tyrozynowa             | kiełki rzodkwi japońskiej | S            | 7,5        | Phe, Tyr  | 74-78                  | b.d.                     | 42    |
| Aminopeptydaza z nasion jęczmienia    | nasiona jęczmienia        | S            | 7,5        | aminokwasy o dużej hydrofobowej grupie bocznej, szczególnie Phe i Leu | 58                     | b.d.                     | 36    |
| Prolinowa Aminopeptydaz 1 z pszenżyta | pszenżyto                 | S            | 7,5        | Pro, Ala, Hyp   | 37,5-40                | b.d.                     | 45    |
| LAP                                   | ziemniak                  | M            | 10,3       | Arg, Met, Leu   | 54                     | chloroplasty             | 35,74 |
| LAP-N                                 | pomidor                   | M            | b.d.       | Met, Phe, Leu   | 55                     | cytoplazma               | 64    |
| LAP-A                                 | pomidor                   | M            | 8,5-9,5    | Leu, Met, Arg   | 55                     | cytoplazma, chloroplasty | 8     |

C – proteaza cysteinowa; S – proteaza serynowa; M – metaloproteaza; b.d. – brak danych

## 2. Rola aminopeptydaz w organizmach roślinnych

Proteazy katalizują hydrolizę wiązań peptydowych. Główną funkcją proteaz jest degradacja nieprawidłowych, uszkodzonych i zbędnych białek. Są również niezbędne do aktywacji białek poprzez specyficzną proteolizę<sup>75</sup>. Do niedawna sądzono, że proteazom brakuje odpowiedniej specyficzności by mogły pełnić bardziej złożone funkcje regulatorowe. Przeczy temu jednak ilość genów kodujących proteazy i różnorodność enzymów proteolitycznych występujących w roślinach. W samym genomie *Arabidopsis thaliana* (rzodkiewnik pospolity - gatunek modelowy w botanice i genetyce roślin) zidentyfikowano ponad 600 genów kodujących różne proteazy<sup>34,50,59</sup>. Enzymy proteolityczne odpowiedzialne są za metabolizm, procesy fizjologiczne, wzrost i reakcje obronne roślin. Jedną ze znaczących podgrup proteaz stanowią aminopeptydazy. Enzymy te uczestniczą

w podstawowych procesach zachodzących w komórkach takich jak np. modyfikacje potranslacyjne białek<sup>59</sup> czy mejoza<sup>58</sup>. Aminopeptydazy są niezbędne na niemal każdym etapie rozwoju, poczynając od embriogenezy<sup>76</sup>, po wzrost siewek<sup>69</sup> aż do okresu więdnienia poszczególnych części rośliny<sup>7,77</sup>.

## 2.1. Udział aminopeptydaz w rozwoju i wzroście roślin

Najważniejszą grupę, ze względu na znaczenie dla człowieka, stanowią zboża oraz inne rośliny uprawne, należące do roślin okrytonasiennych. Inne rośliny z tej grupy wykorzystuje się do produkcji tkanin (bawełna), drewna (np. buk, dąb) czy substancji leczniczych (np. wyciągi z ziół). Ze względu na ogromne znaczenie tych roślin i fakt, że większość badań nad roślinnymi aminopeptydazami dotyczy właśnie tej grupy, w tym rozdziale omówiony zostanie udział aminopeptydaz w cyklu rozwojowym roślin okrytonasiennych<sup>78</sup>.

Cykl rozwojowy roślin zaczyna się od embriogenezy. W trakcie embriogenezy z pojedynczej komórki (zygoty) rozwija się wielokomórkowy organizm (zarodek), wyposażony we wszystkie typy komórek i tkanek, które są niezbędne przyszłej roślinie. W wyniku embriogenezy dochodzi do wykształcenia merystemu wierzchołkowego pędu, liścieni, hipokotylu i korzenia. Powstają także wszystkie tkanki pierwotne. Przebieg embriogenezy można podzielić na kilka stadiów. W początkowym etapie, po zapłodnieniu, pierwszy podział jest asymetryczny (powstaje komórka bazalna i apikalna). Po trzykrotnym podziale komórki apikalnej następuje stadium ośmiokomórkowego prazarodka. W kolejnej fazie (stadium dermatogenu) następuje tworzenie zawiązków przyszłych tkanek. W wyniku dalszych podziałów zarodek uzyskuje wielkość 62 komórek i wchodzi w stadium globularne. Część komórek zarodka globularnego tworzy zawiązki liścieni, a zarodek przyjmuje kształt sercowaty, od którego pochodzi nazwa tej fazy (stadium sercowate). W wyniku dalszego wydłużania się zarodka, przechodzi on w stadium torpedy, z zawiązkami liścieni, hipokotylu, epikotylu i korzenia zarodkowego. Ostatnie stadium nosi nazwę stadium odwróconej litery „U”. Wynika to z kształtu liścieni, które intensywnie rosną i zwijają się<sup>4</sup>. Badania dowodzą, że aminopeptydazy odgrywają istotną rolę w embriogenezie. Przykładowo, aminopeptydazy leucynowa i alaninowa obecne są w stadium globularnym, sercowatym i stadium odwróconej litery „U” zarodka nasturcji większej (*Tropaeolum majus*). Wraz z postępem embriogenezy ich aktywność rośnie<sup>79</sup>. W *Arabidopsis thaliana* obserwuje się natomiast wzrost ekspresji genów kodujących aminopeptydazę M1 (APM1). Aminopeptydaza M1 odpowiada za prawidłowy podział komórkowy i zrównoważony rozwój protoplasty merystemu wierzchołkowego korzenia. Udowodniono, że rośliny z mutacją w obrębie genu APM1 wykazują haploinsuficjencję – jeden nieprawidłowy allel skutkuje wystąpieniem szeregu zaburzeń w procesach komórkowych. Skutkuje to wystąpieniem nieprawidłowości w podziale komórkowym podczas embriogenezy. W stadium sercowatym roślin z nieprawidłowym genem kodującym APM1 liścienie są niesymetryczne, a merystem wierzchołkowy korzenia słabo wykształcony<sup>76</sup>.

Mimo, że cykl życia rośliny zaczyna się od embriogenezy, przyjęło się omawiać życie rośliny „od nasienia do nasienia”. Jest to między innymi podyktowane tym, że właśnie od nasienia rozpoczyna się niezależne życie nowego pokolenia rośliny. Nasienie zbudowane jest z trzech elementów: zarodka, tkanki spichrzowej i łupiny nasiennej. Ze względu na skład substancji zapasowych nasiona dzieli się na mączyste, oleiste i białkowe. W rzepaku białka stanowią 21% suchej masy nasienia. Nasiona bogate w białko, zawierają też duże ilości aminokwasów egzogennych<sup>4</sup>. Do tej pory scharakteryzowano wiele aminopeptydaz w nasionach roślin. Opisane zostały między innymi aminopeptydazy ze zbóż (np. jęczmień<sup>36</sup>, owies<sup>80</sup>), roślin oleistych (słonecznik<sup>73</sup>, rzepak<sup>81</sup>) i innych roślin uprawnych takich jak bób<sup>82</sup>.

Kielkowanie definiuje się jako zespół procesów prowadzących do aktywacji zarodka i wzrostu siewki. Jest to proces złożony, zależny od wielu czynników, między innymi warunków pogodowych i wilgotności. Kielkowanie rozpoczyna się od pobierania przez nasiona wody i pęcznienia. Zjawisko to nosi nazwę imbibicji<sup>4</sup>. Podstawowymi procesami składającymi się na prawidłowy przebieg kielkowania są przemiany prowadzące do generowania energii niezbędnej komórkom rosnącej siewki. Fazie imbibicji towarzyszy gwałtowna intensyfikacja procesu oddychania komórkowego. Substratami niezbędnymi w procesie oddychania, w początkowych etapach kielkowania nasion, są nagromadzone w nich substancje zapasowe. Ze względu na to, że są to w większości związki wielkocząsteczkowe, mobilizacja rezerw zaczyna się od ich hydrolizy, katalizowanej przez enzymy. Niektóre z enzymów niezbędnych do kielkowania są syntetyzowane jeszcze podczas embriogenezy, a ich aktywacja następuje podczas imbibicji. Inne syntetyzowane są już w trakcie imbibicji. Podczas mobilizacji białek zapasowych nasion obserwuje się wzmożoną aktywność aminopeptydaz<sup>83,84</sup>. Przykładem mogą być aminopeptydazy nasion sałaty siewnej. Wzrost aktywności tych enzymów zaczyna się po 30 godzinach od rozpoczęcia imbibicji i w ciągu kolejnych 20 godzin rośnie około 3-krotnie<sup>85</sup>. Dla kilku roślin opisano również udział aminopeptydaz w procesie kielkowania<sup>73,82</sup>. Na przykład, podczas kielkowania fasoli zwyczajnej, zidentyfikowano 5 aminopeptydaz *PvAP1-5* (od *ang. Phaseolus vulgaris* aminopeptidase). Trzy z nich to metaloaminopeptydazy (*PvAP1*, *PvAP2* i *PvAP4*), a dwie pozostałe to aminopeptydazy serynowe. Aktywność badanych aminopeptydaz zmieniała się w liściach wraz z rozwojem rośliny. Najwyższa była na początku kielkowania, a następnie obserwowano spadek aktywności w starszych siewkach (rozwinięty trzeci liść). Wyjątek od tej reguły stanowiła *PvAP5*, której aktywność utrzymywała się na wysokim poziomie, przez cały okres wzrostu<sup>86</sup>. Istotną rolę aminopeptydaz (a szczególnie LAP) potwierdzono również w innym rodzaju fasoli - *Macrotyloma uniflorum* (uprawianej głównie w Indiach). W suchych nasionach *Macrotyloma uniflorum* nie obserwowano aktywności aminopeptydaz. Natomiast po 24 h od rozpoczęcia kielkowania, aktywność LAP utrzymywała się na podobnym poziomie (6-8 U/h/10 liścieni) przez kolejne 2 dni, po czym spadła w 4 dobie (do ok. 2 U/h/10 liścieni). Co ciekawe, zmiany w aktywności aminopeptydazy leucynowej dobrze korelowały z całkowitą zawartością wolnych aminokwasów w siewkach fasoli<sup>87</sup>. Omawiane powyżej przykłady dotyczyły roślin okrytonasiennych, ale aminopeptydazy biorą też

udział w przebiegu kiełkowania roślin nagonasiennych. Przykładem nagonasiennych jest sosna zwyczajna. Od początku kiełkowania, aż do momentu, w którym siewka sosny osiągnęła długość 6 cm, aktywność aminopeptydaz wobec substratów leucynowego i fenyloalanylowego wzrosła około 6-8 krotnie<sup>88</sup>.

Dużą rolę w dalszym rozwoju roślin (po okresie kiełkowania) i wzroście siewek odgrywają aminopeptydazy metioninowe. Przykładem są enzymy MAP2A i MAP2B i MAP1A, znajdujące się w cytoplazmie komórek roślinnych. Zahamowanie aktywności cytoplazmatycznych MAP (poprzez znokautowanie genu kodującego MAP1A i dodanie specyficznego wobec MAP2B inhibitora: fumagiliny) prowadziło do zaburzeń we wzroście siewek *Arabidopsis thaliana*. Zaburzenia te objawiały się między innymi ograniczeniem wzrostu czy odbarwieniem liści<sup>69</sup>. Inną aminopeptydazą dla której udowodniono zaangażowanie we wczesny rozwój roślin jest AMP1. Jest to aminopeptydaza należąca do rodziny M1, związana z błoną komórkową, wykazująca szczególną aktywność wobec substratów z neutralnymi bądź aromatycznymi aminokwasami na N-końcu. W czasie dojrzewania tkanek drewna pierwotnego wyróżniono się dwa okresy wzmożonej ekspresji tego enzymu, podczas dojrzewania protoksylemu (3 doba) oraz metaksylemu (5 doba). Enzym był też niezbędny do prawidłowego rozwoju merystemu korzeniowego. Siewki z nieprawidłowym genem kodującym APM1 obumierały średnio w piątej dobie kiełkowania, wskutek zahamowania rozwoju korzeni, a ponadto, charakteryzowały się deformacją i redukcją liczby liści<sup>76</sup>.

Kwitnienie to jeden z najważniejszych etapów rozwoju rośliny. Po zakończeniu różnicowania wegetatywnego następuje okres rozwoju generatywnego. Morfogeneza kwiatu polega na rozwoju zawiązków kwiatów w merystematy wierzchołkowych. Zasadniczo, rozwój kwiatu polega na wykształceniu dna kwiatowego, okwiatu, pręcikowia i słupkowie. O kolejności wytworzenia tych organów decydują jeszcze nie do końca poznane mechanizmy różnicowania. Istnieje wiele teorii dotyczących czynników decydujących o gotowości rośliny do przejścia w fazę kwitnienia. Wiadomo, że wpływ na ten proces mają zarówno substancje hormonalne jak i czynniki środowiskowe<sup>4</sup>. Niektóre z roślin są wrażliwe na względne zmiany w długości dnia i nocy, związane ze zmianą pór roku (fotoperiodyzm), u innych większe znaczenie w indukcji kwitnienia ma temperatura otoczenia. Temperatura warunkuje kwitnienie zwłaszcza roślin ozimych, takich jak np. rzepak. Rośliny te wymagają minimum kilkutygodniowej ekspozycji na niską temperaturę, w innym wypadku nie zakwitną w ogóle. Zjawisko pobudzania roślin do kwitnienia niską temperaturą nosi nazwę wernalizacji<sup>4,78</sup>. Wieloczynnikowy model kontroli kwitnienia zakłada, że wpływ na inicjację kwitnienia mają wzajemnie się uzupełniające szlaki rozwojowe oraz szereg innych czynników takich jak asymilaty, substancje wzrostowe, promotory i inhibitory kwitnienia. Do wspomnianych szlaków rozwojowych należą: szlak fotoperiodyczny i autonomiczny (indukowany w wyniku wernalizacji), a także szlak giberelinowy (oparty na substancjach wzrostowych - giberelinach)<sup>4,89</sup>. Mimo złożonej natury morfogenezy kwiatu wiadomo, że obecność wolnej proliny prowadzi do przedwczesnego

kwitnienia<sup>90</sup>. Zawartość wolnej proliny w komórkach roślinnych jest regulowana między innymi obecnością i hydrolityczną aktywnością specyficznych aminopeptydaz. W modyfikowanych roślinach *Arabidopsis thaliana*, z nadekspresją genu kodującego aminopeptydazę prolinową z pszenżyta (*TsPAP1*), stwierdzono podwyższony poziom wolnej proliny i wcześniejsze kwitnienie (około 3,5 dnia wcześniej w porównaniu do dzikich roślin). Potwierdza to zaangażowanie aminopeptydazy prolinowej w regulację zawartości proliny w organach roślinnych podczas kwitnienia<sup>71</sup>. Badano również zaangażowanie aminopeptydaz w proces kwitnienia pomidora<sup>66,91</sup>. LAP-A pomidora jest konstytutywnie ekspresjonowana w płatkach, pylnikach i działkach kielicha kwiatu. Wraz ze starzeniem się, ilość enzymu stopniowo maleje w działkach kielicha. Natomiast w starszych kwiatach LAP-A obecna jest tylko w pylnikach<sup>91</sup>. Aminopeptydaza leucynowa obecna jest również w kwiatach liliowca, a jej aktywność rośnie wraz z początkiem kwitnienia, do ok. 6 godzin po osiągnięciu przez roślinę stadium pełnego rozkwitu. Następnie aktywność aminopeptydazy leucynowej stopniowo spada. Na podstawie zmian aktywności stwierdzono, że stężenie tego enzymu jest regulowane w zależności od stopnia rozwoju kwiatu. Aminopeptydaza uczestniczy w procesie metabolizmu białek zarówno podczas otwierania się kwiatu, jak i we wczesnych fazach wędnięcia płatków<sup>77</sup>.

Po zawiązaniu się kwiatu dochodzi do powstania komórek generatywnych. W wyniku mejozy powstają mikrospory i makrospory, z których powstają dalej komórka jajowa i ziarnka pyłku. Mejoza u roślin poprzedza gametofitogenezę, czyli powstawanie pokolenia haploidalnego. Przebieg mejozy dzieli się na następujące etapy: profazę I, metafazę I, anafazę I, telofazę I, interkinezę, metafazę II, anafazę II i telofazę II<sup>4</sup>. Przykładem aminopeptydaz zaangażowanych w przebieg mejozy są aminopeptydazy wrażliwe na puromycynę (PSAs – puromycin-sensitive aminopeptidases). Enzymy te obecne są w wielu organizmach żywych. PSAs biorą udział w procesach proteolitycznych, niezbędnych do prawidłowego rozwoju komórek, ich żywotności i podziału. U roślin (*Arabidopsis thaliana*) z wyciszonym genem kodującym PSA (mutant *mpa1*), mejoza przebiega nieprawidłowo. Co prawda etap profazy I przebiega normalnie, jednak później, w etapie metafazy I, większość chromosomów homologicznych jest niezdolna do tworzenia kompleksu synaptonemalnego (który jest niezbędny do wymiany materiału genetycznego w procesie crossing-over odpowiedzialnym za różnorodność genetyczną<sup>78</sup>), co w konsekwencji prowadzi do nieprawidłowej segregacji chromosomów. Podobne zjawisko obserwuje się u dzikich roślin, które poddano działaniu inhibitorów PSA. Świadczy to o istotnym udziale tych aminopeptydaz w prawidłowym przebiegu mejozy. Ponadto, wyeliminowanie aktywności wrażliwych na puromycynę aminopeptydaz, skutkuje obniżoną płodnością i produkcją mniejszych owoców, które zawierają ograniczoną liczbę nasion<sup>58</sup>.

Życie każdej rośliny nieuchronnie prowadzi do śmierci. Zanim nastąpi śmierć całej rośliny wędnięciu ulegają jej poszczególne organy. U niektórych roślin obumieranie wybranych organów ma charakter sezonowy (liście drzew, nadziemne części wieloletnich roślin zielnych). Krótkim czasem



życia charakteryzują się też kwiaty i owoce<sup>4,92</sup>. Badania dowodzą, że aminopeptydazy zaangażowane są w procesy więdnienia kwiatów (np. liliowca, u którego są najprawdopodobniej odpowiedzialne są za hydrolizę protein związanych z więdnieniem płatków<sup>77</sup>), owoców (np. grapefruit<sup>93</sup>) i liści. Udział aminopeptydaz w starzeniu i więdnieniu liści potwierdzono w badaniach nad LAP2 z *Arabidopsis thaliana*. W przypadku tej rośliny aminopeptydaza leucynowa jest silnie ekspresjonowana w tkance naczyniowej liścia<sup>7</sup>, a rośliny ze znokautowanym genem kodującym LAP2 charakteryzują się wcześniejszym starzeniem liści i zwiększoną wrażliwością rośliny na czynniki stresowe. W czasie więdnienia, z powodu mniejszej aktywności niektórych proteaz, obserwuje się wzrost ilości uszkodzonych białek. Aminopeptydazy hydrolizując te nieprawidłowe i uszkodzone białka, opóźniają procesy starzenia. Potwierdzono, że zahamowanie aktywności aminopeptydaz sprzyja szybszemu więdnieniu i starzeniu się roślin<sup>7,94</sup>.

## 2.2. Inne funkcje aminopeptydaz w roślinach

Aminopeptydazy, oprócz zaangażowania w rozwój i wzrost roślin, uczestniczą również w modyfikacjach potranslacyjnych białek. Translacja mRNA zazwyczaj zaczyna się od kodonu AUG, który koduje metioninę<sup>5</sup>. Pierwszą modyfikacją nowo powstałego białka jest odszczepienie *N*-końcowej metioniny. Proces ten często określa się skrótem NME od *ang.* **N-terminal Met Excision**. W większości przypadków, NME następuje we wczesnych etapach translacji, przed prawidłowym sfałdowaniem białka. Proces ten jest katalizowany przez aminopeptydazy metioninowe (MAP). W organizmach eukariotycznych znane są dwa typy aminopeptydaz metioninowych: MAP1 i MAP2<sup>68,95</sup>. W roślinach, w mechanizm usuwania metioniny z końca łańcucha białkowego zaangażowanych jest sześć aminopeptydaz (MAP1A, MAP1B, MAP1C, MAP1D, MAP2A i MAP2B), o różnej lokalizacji w komórce (cytoplazma, mitochondrium, chloroplasty)<sup>5</sup>.

Prawidłowe funkcjonowanie białek w komórce zależy nie tylko od modyfikacji potranslacyjnych, ale często jest zależne od białek opiekuńczych (czaperonów – *ang.* chaperones). Czaperony uczestniczą w fałdowaniu, ponownym fałdowaniu, translokacji, stabilizacji i degradacji białek. Wiele z nich to tzw. białka szoku cieplnego, których wzmożoną ekspresję obserwuje się podczas zaistnienia niekorzystnych warunków np. promieniowania UV, chłodu, zranienia, a także podczas szoku cieplnego, od którego wywodzi się ich nazwa. W roślinach funkcjonuje stosunkowo liczna grupa białek opiekuńczych. Czaperony można podzielić na pięć głównych klas (Hsp70, Hsp60, Hsp90, Hsp100 i sHsp), które dalej dzielą się na podklasy i podgrupy<sup>96</sup>.

Do niedawna aminopeptydazy nie były rozpatrywane jako białka opiekuńcze. Jednak najnowsze badania *in vitro* nad LAP-A i LAP-N z pomidora oraz LAP1 i LAP2 z *Arabidopsis thaliana* wykazały, że enzymy te mogą zachowywać się jak czaperony. W celu udowodnienia cech białek opiekuńczych tych aminopeptydaz, w eksperymentach wykorzystano następujące modelowe procesy:

- ochrona przed denaturacją termiczną enzymu restrykcyjnego (endonukleazy z *Neisseria denitrificans* - NdeI);
- ochrona przed termiczną agregacją syntazy cytrynianowej (CS);
- ponowne fałdowanie termowrażliwej lucyferazy (Luc).

W przypadku NdeI stwierdzono działanie opiekuńcze wszystkich czterech aminopeptydaz, z czego LAP-N i LAP2 wykazywały około pięciokrotnie wyższą skuteczność w ochronie NdeI przed termiczną inaktywacją niż LAP-A i LAP1. LAP-A i LAP-N również wykazały właściwości chroniące przed termiczną agregacją syntazy cytrynianowej. Aminopeptydazy te zapobiegły w 40% agregacji CS, w porównaniu do próby kontrolnej. Wykazano, że LAP-A uczestniczy również w ponownym fałdowaniu Luc. Obecność tego enzymu powodowała, że około 35% lucyferazy uległo ponownemu fałdowaniu. W przypadku pozostałych trzech badanych aminopeptydaz zaobserwowano ponowne fałdowanie jedynie około 17% badanego białka. Udowodnione właściwości opiekuńcze czterech badanych aminopeptydaz sugerują istnienie w roślinach szóstej klasy białek opiekuńczych<sup>65</sup>.

Aminopeptydazy są również wykorzystywane jako markery polimorfizmu podczas reprodukcji i krzyżowania<sup>35</sup>. Izoenzymy aminopeptydaz to markery molekularne użyteczne w badaniu struktury genetycznej populacji roślin, wyznaczaniu stopnia heterozygotyczności i polimorfizmu, a także potwierdzania czystości genetycznej bądź mieszańcowości badanych organizmów. Izoenzymy aminopeptydazy leucynowej wykorzystuje się między innymi w genetycznych badaniach porównawczych nad rzepakiem (*Brassica napus*), kapustą właściwą (*B. campestris* L.) i chińskim jarmuzem (*B. alboglabra*)<sup>97</sup>. Izoenzymy LAP (E.C. 3.4.11.1) stanowią także marker przy określaniu czystości populacji rzepaku linii androgenetycznych (powstałych z męskiego gametofitu)<sup>98</sup>.

### **2.3. Rola aminopeptydaz w reakcjach roślin na czynniki stresowe**

Rośliny rosnące w warunkach naturalnych nieustannie narażone są na działanie różnego rodzaju stresów. Działanie czynnika stresującego (stresora) na roślinę zawsze powoduje odpowiedź, czyli reakcję stresową, jak również wynikający z niej proces dostosowania. Możliwość rozwoju roślin w danym środowisku silnie zależy od tego, w jakim stopniu rozpatrywany gatunek jest dostosowany do funkcjonowania w danych warunkach i czy wykazuje odporność na stresory. Czynnikiem, który jest stresujący dla jednego gatunku roślin nie musi wpływać negatywnie na inną roślinę. Przykładowo, okresowe występowanie temperatur powyżej 35°C nie jest szkodliwe dla roślin ciepłolubnych, ale szkodzi roślinom klimatu umiarkowanego. W wyniku działania stresora, w zależności od jego natężenia oraz czasu działania, może nastąpić zahamowanie wzrostu rośliny, zmiana w fazach rozwojowych, lub nawet obumieranie rośliny<sup>4</sup>.

Odpowiedź rośliny na stres składa się z kilku etapów, które wspólnie nazywa się syndromem reakcji na stres. Pierwszym etapem jest faza alarmu, w której działanie stresora wywołuje destabilizację warunków strukturalnych i funkcjonalnych w roślinie. W reakcji na stres procesy kataboliczne zaczynają przeważać nad anabolicznymi. Dochodzi do zakłóceń w obrębie organelli

komórkowych, gospodarki jonowej i funkcjonowaniu podstawowych ścieżek metabolicznych. Jeżeli działający czynnik nie jest zbyt intensywny, bądź roślina posiada mechanizmy obrony na ten czynnik, następuje faza restytucji. W fazie tej uruchamiane zostają procesy naprawcze lub obronne. W wyniku tego rozpoczyna się faza odporności, zwiększona odporność komórek na działanie stresu prowadzi do tzw. hartowania, a roślina dostosowuje się do warunków stresowych. Co ciekawe, nagły powrót do warunków normalnych zahartowanej rośliny, również może stanowić stres. Jeśli jednak stan stresowy trwa zbyt długo następuje faza wyczerpania. W tej fazie roślina jest bardziej podatna na infekcje i działanie patogenów. Może dojść do nieodwracalnych uszkodzeń i w konsekwencji do śmierci rośliny. Jeżeli natomiast czynnik stresujący ustąpi, roślina wchodzi w fazę regeneracji. Odpowiedź na działanie stresora może być lokalna, czyli dotyczyć tylko miejsca działania czynnika lub też systemiczna, gdy zaatakowana tkanka wysłała informacje do innych tkanek i organów, które również odpowiadają na zaistniały czynnik stresujący<sup>4</sup>.

Organizmy roślinne szczególnie negatywnie reagują na stres abiotyczny (wywołany przez czynniki fizykochemiczne czy ekologiczne). Takim rodzajem stresu jest np. długotrwała susza, zasolenie gleby, czy brak składników odżywczych. Szacuje się, że w wyniku działania abiotycznego czynnika stresowego, plon roślin uprawnych może być nawet kilkanaście razy mniejszy, od plonu uzyskanego z roślin niepoddanych działaniu żadnego stresora. Równie niekorzystny wpływ na rozwój rośliny ma stres pochodzenia biotycznego. Stres tego rodzaju wywołany jest przez inne organizmy żywe. Przykładem może być żerowanie roślinożerców, czy zacienienie jednej rośliny przez drugą. Do tej grupy stresorów zalicza się również działalność człowieka np. różnego rodzaju zanieczyszczenia. Badania prowadzone w ostatnich latach dostarczają licznych dowodów na udział aminopeptydaz w reakcji roślin zarówno na stres abiotyczny jak i biotyczny<sup>45,99</sup>. Ponadto, udowodnione właściwości opiekuńcze LAP-A i LAP-N z pomidora oraz LAP1 i LAP2 z *Arabidopsis thaliana* rzucają nowe światło na rolę aminopeptydaz leucynowych w reakcjach obronnych rośliny na stres związany na przykład z suszą czy zasoleniem<sup>65</sup>. W kolejnych podrozdziałach omówione zostaną wybrane czynniki stresujące i ich wpływ na zmiany w aktywności roślinnych aminopeptydaz oraz możliwe funkcje aminopeptydaz w przezwyciężeniu stresu.

### 2.3.1. Niska temperatura

Niska temperatura to jeden z najczęściej występujących w Polsce stresów abiotycznych. Przymrozki zdarzają się zarówno w miesiącach wiosennych jak i jesiennych, przez co stanowią zagrożenia zarówno dla upraw odmian jarych, jak i ozimych. Uszkodzenia wywołane chłodem występują przede wszystkim w błonach cytoplazmatycznych. Efektem tych uszkodzeń są zaburzenia występujące w procesach komórkowych. Jednym z mechanizmów obronnych rośliny jest aklimatyzacja. Aklimatyzacja polega na indukcji genów odpowiedzialnych za syntezę enzymów antyoksydacyjnych, w wyniku czego w komórkach roślinnych dochodzi do wzrostu poziomu m.in. glutationu i kwasu askorbinowego. W odpowiedzi na niskie temperatury, rośliny dokonują też

modyfikacji składu błon komórkowych, polegającej na zwiększeniu udziału wielonienasyconych kwasów tłuszczowych i lipidów zawierających duże grupy polarne<sup>4</sup>. Ważną rolę odgrywają także niskocząsteczkowe białka i związki pełniące funkcje osmoregulacyjne. W trakcie hartowania chłodem zachodzą zmiany w syntezie białek, wytwarzane są izoenzymy białek, charakteryzujące się większą stabilnością w warunkach chłodu. Wskutek zaburzeń metabolicznych dochodzi też do akumulacji toksyn np. kwas pirogronowy przekształcony zostaje do etanolu, na skutek zahamowania enzymów mitochondrialnych. Ekspozycja na niską temperaturę prowadzi też do odwodnienia, spowodowanego nagłym wzrostem stężenia jonów wapnia w cytozolu. Wysokie stężenie jonów wapnia prowadzi do otwierania aparatów szparkowych co w połączeniu z ograniczonym pobieraniem wody przez korzenie skutkuje szybszym wędnięciem rośliny.

Udział aminopeptydaz w odpowiedzi roślin na stres związany z niską temperaturą, udowodniono badając m.in. aminopeptydazę metioninową z jęczmienia *Hordeum vulgare* (HvMAP). Siewki jęczmienia poddano działaniu niskiej temperatury (4 °C) w czasie 0,5-48 h. Gen kodujący HvMAP ulegał podwyższonej ekspresji w odpowiedzi na chłód już po 0,5 h od zadziałania na siewki niską temperaturą, wysoka ekspresja *HvMAP* utrzymywała się do 12 h, następnie następował spadek poziomu ekspresji. Ponadto zmieniała się lokalizacja enzymu w komórce. W warunkach normalnego wzrostu, HvMAP była związana z DNA i znajdowała się w jądrze komórkowym. Natomiast w czasie stresu wywołanego chłodem, HvMAP zmieniała lokalizację z jądra do cytoplazmy. W związku z tym wysnuto wniosek, że aminopeptydaza ta, bierze udział w procesie dostosowania się do niskiej temperatury w jęczmieniu, poprzez modyfikację białek<sup>68</sup>. Inną aminopeptydazą metioninową, której zmiany aktywności zaobserwowano podczas stresu wywołanego niską temperaturą była aminopeptydaza metioninowa z petunii. Rośliny poddano działaniu temperatury 2°C przez 5 dni. Po tym czasie zaobserwowano obniżenie poziomu ekspresji aminopeptydazy metioninowej w porównaniu do kontroli<sup>100</sup>.

### 2.3.2. Deficyt wody

Do czynników abiotycznych należy także niedobór wody w środowisku. Nawet łagodny deficyt wody na poziomie RWC 8-10% (RWC - *ang.* Relative Water Content, względna zawartość wody), powoduje wzrost poziomu hormonów stresu, te z kolei stymulują aktywność enzymów odpowiedzialnych za syntezę związków ochronnych, w tym niektórych aminokwasów np. alaniny, glicyny, proliny czy seryny. Większość aminokwasów dostarczanych do komórki w trakcie stresu osmotycznego, jest syntetyzowana *de novo*, ale ok. 15 % pochodzi z hydrolizy białek. W przypadku silnego deficytu wody (RWC>20%) następuje wiele niekorzystnych zmian komórkowych, w tym hamowanie aktywności reduktazy azotanowej, odpowiedzialnej za asymilację azotu mineralnego. Następuje także hamowanie ekspresji genów kodujących enzymy, dochodzi do uszkodzenia struktury trzeciorzędowej białek oraz hydrolizy białek zapasowych i konstytutywnych katalizowanej przez proteazy. Wszystkie te zjawiska mogą zachodzić przy współdziałaniu aminopeptydaz. Badania

wykazały, że w reakcji na deficyt wody u rzodkiewnika pospolitego (*Arabidopsis thaliana*), gen kodujący aminopeptydazę prolinową *AtPAP1* ulegał wzmożonej ekspresji (odnotowano około 2,5-krotny wzrost). Doświadczenia przeprowadzono na czterotygodniowych siewkach, dla których wstrzymano podlewanie na 15 dni<sup>70</sup>. Podobny eksperyment wykonano na trzytygodniowych siewkach pomidora (*Lycopersicon esculentum*), u których zaprzestano podlewania na 4,5 doby (do pierwszych oznak wędnięcia). W wyniku reakcji na suszę zaobserwowano wzrost aktywności kwaśnej aminopeptydazy leucynowej (LAP-A), wzmożoną ekspresję tego białka oraz kodującego go RNA (*LapA*)<sup>66</sup>. Wzrost aktywności aminopeptydazy prolinowej (PAP) zauważono również w przypadku trzytygodniowych siewek pszenżyta (*Triticosecale*), specjalnie odwadnianych przez 24 h<sup>45</sup>. W fasoli zwyczajnej (*Phaseolus vulgaris*) obserwowano zmiany w aktywności aż pięciu aminopeptydaz, w wyniku narażenia tygodniowych siewek na suszę. Enzymy te wyizolowano z liści fasoli i scharakteryzowano. Trzy aminopeptydazy (*PvAP1*, *PvAP2* i *PvAP4*) były metaloproteazami, o szerokiej specyficzności substratowej i podwyższonej aktywności wobec substratów zawierających na *N*-końcu alaninę i lizynę. Pozostałe dwa enzymy *PvAP3* i *PvAP5* wykazywały cechy charakterystyczne dla aminopeptydaz serynowych, o wąskiej specyficzności substratowej. *PvAP3* i *PvAP5*, preferowały substraty zawierające fenyloalaninę i lizynę. Zmiany aktywności aminopeptydaz zależą od typu aminopeptydazy i fazy rozwoju rośliny. W większości przypadków obserwowano wzrost aktywności. Wyjątek stanowiły *PvAP5* i *PvAP4*, których aktywność spadała<sup>86</sup>. W korzeniach i liściach siewek dwóch odmian pszenicy ozimej podlewanych regularnie (Yantar - odmiana odporna na suszę, Miziya - odmiana wrażliwa na suszę) nie obserwowano znaczących różnic pomiędzy aktywnością aminopeptydaz. Działanie enzymów badano stosując osiem różnych substratów (Ala-, Arg-, Gly-, Leu-, Lys-, Met-, Phe- i Pro-*p*NA). Natomiast w warunkach suszy (zaprzestano regularnego podlewania przez 7 dni dla 8-dniowych siewek obu odmian pszenicy ozimej) w liściach zaobserwowano wzrost aktywności aminopeptydaz w stosunku do prawie wszystkich substratów (średnio o ok. 30%), za wyjątkiem Gly- i Phe-*p*NA w obu odmianach. Natomiast w korzeniach aktywność aminopeptydaz w odmianie wrażliwej nie zmieniała się, a w odmianie odpornej na suszę rosła (nawet dwukrotnie) w stosunku do Ala-, Arg-, Gly-, Lys- i Pro-*p*NA. Prawdopodobnie w pszenicy ozimej występują dwie aminopeptydazy, jedna o szerokiej specyficzności substratowej i jedna o wąskiej. Obie odpowiedzialne są za mobilizację aminokwasów podczas suszy. Wzrost aktywności aminopeptydaz może wpływać na podwyższone stężenia osmoprotektantów np. proliny, a także prekursorów niezbędnych do syntezy glutationu jak cysteina, glicyna czy kwas glutaminowy<sup>101</sup>.

### 2.3.3. Zasolenie

Zasolenie stanowi jedno z największych wyzwań współczesnego rolnictwa. W naturalnym środowisku może być zarówno czynnikiem pochodzenia abiotycznego (strefy przybrzeżne mórz, obrzeża pustyń śródłądowych), jak i biotycznego (np. sól stosowana do posypywania dróg,

niewłaściwe nawożenie lub przedawkowanie nawozów). Terminem tym określa się nie tylko nadmierne stężenie jonów chloru i sodu, ale i wysoką łączną zawartość wszystkich jonów w podłożu. Jony sodu są toksyczne dla większości roślin, w których się akumulują, hamując syntezę białek i aktywność wielu enzymów. W odpowiedzi obronnej roślin na zasolenie udział biorą niskocząsteczkowe substancje kompatybilne w tym: prolina, kwas glutaminowy, alanina, kwas asparaginowy, trehaloza, rafinoza i inne mono- i oligosacharydy, a także betaina<sup>4</sup>.

W literaturze dostępnych jest kilka doniesień na temat wpływu zasolenia na aktywność i ekspresję aminopeptydaz roślinnych. Jednym z przykładów jest LAP-A (kwaśna aminopeptydaza leucynowa) pomidora. Przeprowadzono eksperyment, w którym sadzonki pomidora przez trzy doby podlewano roztworem chlorku sodu (300 lub 400 mM). W wyniku działania tego związku ilość RNA kodującego LAP-A wzrosła 3-6-krotnie. Zaobserwowano również wzrost aktywności enzymu o około 30%<sup>66</sup>. Wzrost aktywności aminopeptydaz (szczególnie aminopeptydazy prolinowej, PAP) odnotowano także w pszenżycie. Trzytygodniowe siewki pszenżyta podlewano 50 mM roztworem NaCl. Odnotowano nawet 11-krotny wzrost aktywności PAP, po 144 godzinach od momentu aplikacji NaCl<sup>45</sup>. Ostateczny dowód na udział aminopeptydaz w reakcji na wysokie zasolenie, przyniosły badania nad pszenicą samopszą (*Triticum monococcum* L). Pszenica samopsza, to gatunek zboża uprawiany dzisiaj rzadko i jedynie na górzystych terenach Zakaukazia. Mała popularność tego gatunku wynika z jego niskiej plenności. Siewki *T. monococcum* były poddawane działaniu różnych stężeń NaCl (80-320 mM), przez 48 h. Po tym czasie pozwolono roślinom na 48-godziną regenerację. W wyniku prowadzonych badań wykryto 81 białek odpowiedzialnych za reakcję stresową w tej roślinie. Wśród nich znajdowała się aminopeptydaza leucynowa 2, której akumulacja była znacząca zarówno w czasie działania chlorkiem sodu jaki i w okresie regeneracji<sup>102</sup>.

#### 2.3.4. Metale ciężkie

Obecność metali ciężkich jest czynnikiem najczęściej pochodzenia biotycznego, antropogenicznego i stanowi poważny problem ekologiczny na terenach rolniczych. Poprzez rośliny, pierwiastki toksyczne są włączane do łańcucha pokarmowego. Niektóre z metali ciężkich, w niewielkich ilościach są niezbędne do prawidłowego funkcjonowania organizmów żywych. Określa się je mianem metali funkcyjnych (Fe, Cu, Mn, Co, Zn, Se, Ni) i dopiero ich nadmiar jest szkodliwy. Metale niefunkcyjne (Cd, Pb, Hg, Ag i Cr), są natomiast toksyczne nawet w małych ilościach i należą do substancji ksenobiotycznych. W odpowiedzi na zwiększone stężenie metali ciężkich w roślinach, uruchamiane są systemy obronne: zewnętrzny, uniemożliwiający wnikanie metali do rośliny i wewnętrzny, polegający na neutralizacji (chelatowaniu) jonów metali. Badania wykazały, że obecność metali ciężkich w środowisku, wpływa w różny sposób na aktywność peptydaz w roślinach. W literaturze, wiele jest doniesień na temat wpływu dwuwartościowych jonów metali na aktywność aminopeptydaz *in vitro*<sup>36,45,55</sup>. Najczęściej badania te dotyczą metaloaminopeptydaz i przeprowadza się je w celu głębszej charakterystyki enzymu. Zazwyczaj w takich badaniach stosuje

się szeroki wachlarz jonów metali np.  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  czy  $\text{Zn}^{2+}$ . Przykładowo, większość aminopeptydaz leucynowych posiada w swym centrum aktywnym dwa jony metali. Najczęściej jeden z nich stanowi silnie związany jon cynku. Drugi jon natomiast jest labilny i może ulegać wymianie<sup>36</sup>. W niniejszym podrozdziale uwaga została skupiona głównie na badaniach *in vivo*, tj. eksperymentach, w których na całą roślinę działano solami metali ciężkich (najczęściej w roztworach do podlewania), a następnie badano aktywność aminopeptydaz w ekstraktach lub ekspresję genów kodujących aminopeptydazy. W literaturze mało jest doniesień na temat tego typu eksperymentów, a najczęściej stosowanymi w tych badaniach metalami są np. kadm, arsen, glin lub cynk.

Kadm należy do pierwiastków toksycznych, powoduje między innymi zaburzenia fotosyntezy, zmiany struktury DNA czy zmiany w przepuszczalności błon komórkowych. Przy stężeniu 5-30 mg/kg gleby, obserwuje się u roślin objawy toksyczności, w postaci np. plam chlorotycznych, skręcenia liści i redukcji korzeni<sup>103</sup>. Aktywność aminopeptydaz roślinnych może ulegać zmianie na skutek działania związków kadmu. Przykładowo, zaobserwowano znaczny wzrost aktywności dwóch peroksosomalnych izoenzymów aminopeptydazy leucynowej (AP1 i AP2) w siewkach grochu zwyczajnego (*Pisum sativum*), który po 14 dniach normalnego wzrostu zaczęto podlewać roztworem chlorku kadmu (50  $\mu\text{M}$ ), przez 28 dni (wzrost aktywności o 55% dla AP1 i o 31% dla AP2 w stosunku do roślin kontrolnych). Jednocześnie, obecność kadmu sprzyjała przyspieszonemu wędnięciu liści<sup>104</sup>. Badano również wpływ kadmu na aminopeptydazę leucynową znajdującą się w korzeniach pomidora. Trzytygodniowe siewki poddano 10-dniowemu działaniu roztworu  $\text{CdCl}_2$ , o stężeniu od 0,3 do 300  $\mu\text{M}$ . Aktywność kwaśnej aminopeptydazy leucynowej (LAP-A) rosła wraz ze wzrostem stężenia kadmu (obserwowano nawet 4-krotny wzrost). Zaobserwowano również wzrost aktywności badanej aminopeptydazy wobec czterech innych substratów (Met-, Lys-, Pro- i Arg-*pNA*). Nie zauważono takiego efektu wobec Phe-*pNA*<sup>105</sup>. Obecność kadmu wpływała także na aktywność aminopeptydaz prolinowych. W wyniku działania 50  $\mu\text{M}$  chlorku kadmu na trzytygodniowe siewki pszenżyta, ośmiokrotnie wzrosła aktywność aminopeptydazy prolinowej w badanych roślinach<sup>45</sup>.

Aktywność tej samej aminopeptydazy rosła również w odpowiedzi na obecność chlorku glinu (50  $\mu\text{M}$ ). Glin jest pierwiastkiem niezbędnym dla roślin, jednak w większych ilościach ma działanie toksyczne (wyjątek stanowi herbata, w której obserwuje się wysoką akumulację glinu). Najbardziej korzystne stężenie  $\text{Al}^{3+}$  w glebie to 0,5-5 mg/kg gleby, a zdolność do pobierania tego pierwiastka zależy silnie od odczynu gleby i gatunku rośliny<sup>106</sup>.

Cynk z kolei odgrywa istotną rolę w metabolizmie roślin. Zarówno niedobór, jak i nadmiar tego pierwiastka ogranicza wzrost i rozwój roślin. Cynk wchodzi w skład wielu enzymów np. anhidrazy węglanowej, dehydrogenazy alkoholowej czy metaloproteaz, jest składnikiem rybosomów i błon komórkowych. Niedobór cynku powoduje dezintegrację rybosomalnego RNA i zaburzenia w metabolizmie cukrów, a charakterystycznym objawem jest zmniejszona powierzchnia liści<sup>4</sup>. Nadmiar cynku objawia się natomiast zmianami chlorotycznymi i nekrotycznymi liści i ich

marszczeniem, co powoduje obniżenie fotosyntezy i zahamowanie wzrostu rośliny. Ponadto obecność cynku sprzyja pobieraniu z gleby innego metalu ciężkiego - kadmu<sup>103</sup>. Wpływ cynku na aktywność aminopeptydaz badano na przykładzie aminopeptydazy prolinowej z pszenżyta. Gen kodujący PAP pszenżyta został sklonowany i nadekspresjonowany w *Arabidopsis thaliana*. Następnie dwutygodniowe siewki tej rośliny (typ dziki i mutant), poddano działaniu cynku w postaci  $ZnCl_2$ , o stężeniu 20 mM. W wyniku tego zabiegu nie tylko podniósł się poziom transkrypcji genu kodującego PAP (*TaPAPI*), ale także poziom wolnej proliny. Nadekspresja *TaPAPI* przełożyła się na wzrost stężenia PAP w siewkach, szczególnie w korzeniach, a tym samym na aktywność tego enzymu. Zaobserwowano również, że vitalność mutantów była wyższa, niż w przypadku roślin typu dzikiego poddanych działaniu cynku. Rośliny transgeniczne odznaczały się większą masą w porównaniu do kontroli. Wyszło zatem wnioskiem, że zwiększenie odporności rośliny na działanie jonów cynku (szczególnie w wysokich stężeniach) związana jest z aktywnością aminopeptydazy prolinowej i podwyższonym stężeniem proliny<sup>107</sup>.

Arsen jest pierwiastkiem szeroko rozpowszechnionym w środowisku, wchodzi w skład ponad 200 minerałów. Za obecność w środowisku arsenu odpowiedzialny jest też człowiek (odpady produkcyjne, wytop rud i inne)<sup>108</sup>. Arsen na trzecim stopniu utlenienia jest akumulowany przez organy roślinne. Toksyczność związków arsenu wynika z możliwości reagowania z grupami funkcyjnymi takimi jak grupa sulfhydrylowa w reszcie cysteiny, czy azot w pierścieniu imidazolowym, w reszcie histydyny<sup>109</sup>. Badano wpływ tlenku arsenu(III) (arseniku) na aktywność aminopeptydaz w 20-dniowych siewkach ryżu (*Oryza sativa*), które od początku wzrostu były suplementowane tlenkiem arsenu w stężeniach 25 i 50  $\mu M$ . W przypadku wyższego stężenia  $As_2O_3$ , zaobserwowano 62-81% zmniejszenie aktywności aminopeptydazy leucynowej (LAP) w pędach i spadek aktywności o 55-60% w korzeniach ryżu. Co ciekawe, stwierdzono również zwiększoną akumulację wolnej proliny w siewkach ryżu<sup>110</sup>.

Podsumowując, rośliny poddane działaniu stresora (w tym metali ciężkich) akumulują wolne aminokwasy, które służą jako osmoprotektanty. Aminopeptydazy mogą po części przyczyniać się do wzrostu poziomu tych wolnych aminokwasów, szczególnie proliny. Dlatego też, wzrost aktywności aminopeptydaz prolinowych może być indykatorem wystąpienia stresu w roślinie. Natomiast spadek aktywności aminopeptydaz (np. LAP z ryżu) może wynikać z oddziaływania metali ciężkich z grupami -SH w centrum aktywnym enzymu.

#### 2.3.4. Makro i mikroelementy

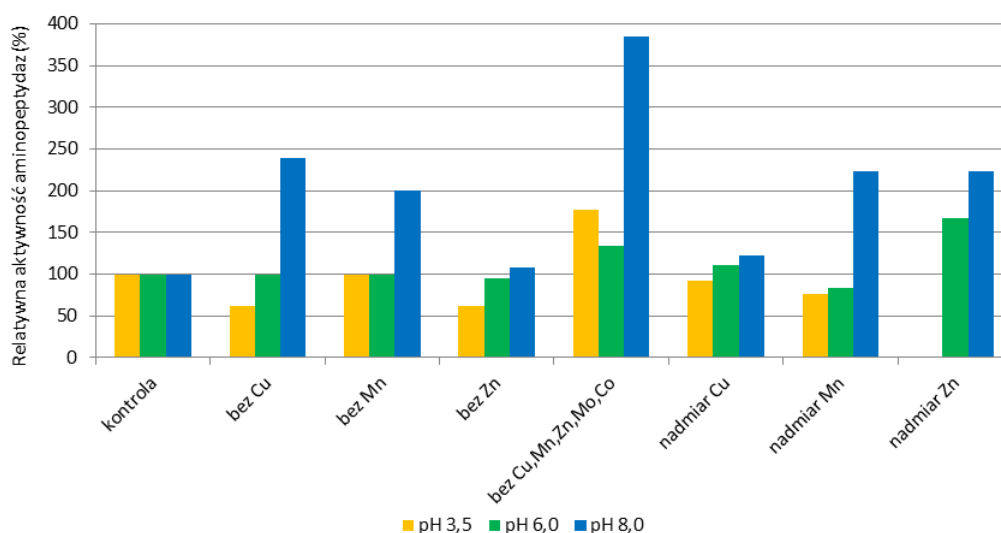
Do makroelementów roślinnych zalicza się: azot, fosfor, potas, siarkę, wapń, magnez i chlor. Do mikroelementów należą: żelazo, miedź, mangan, cynk, bor, chlor, molibden i nikiel. W literaturze najczęściej opisywane są skutki niedoboru poszczególnych makro- i mikroelementów<sup>4</sup>. Pobieranie pierwiastków niezbędnych jest zależne od wielu czynników, przede wszystkim od gatunku rośliny i formy makro- i mikroelementu. Ponadto jego przyswajalność zależy od pH gleby, jej nawodnienia,



a także obecności innych jonów. Przedostawanie się jonów do tkanek korzenia rośliny, zależy zarówno od właściwości błon komórkowych, jonów, jak i gradientów potencjałów elektrochemicznych. Pobieraniu łatwiej ulegają kationy niż aniony, co wynika z ładunku ujemnego błon i ścian komórkowych korzeni. Ponadto występuje selektywne pobieranie jonów przez kanały jonowe. Dodatkowo wchłanianie poszczególnych jonów może następować na całej powierzchni korzenia (potas, fosfor, azot) lub tylko przez wierzchołkową część włóśników korzeni (wapń)<sup>4</sup>.

Ilość publikacji na temat wpływu poszczególnych pierwiastków na aktywność aminopeptydaz jest stosunkowo niewielka. Wpływ zróżnicowanej suplementacji mikro- i makroelementami na ekspresję/aktywność aminopeptydaz można określić na podstawie badań prowadzonych na roślinach podczas ich wzrostu.

Wpływ taki (suplementacja jonami miedzi, manganu, cynku, molibdenu i kobaltu), badano między innymi w siewkach kukurydzy. Siewki kukurydzy próby kontrolnej kiełkowały i rosły na pożywce Knopa (stosunkowo uboga pożywka dedykowana do upraw hydroponicznych i kiełkowania nasion), uzupełnionej o mikroelementy w ilościach rekomendowanych przez Rinkis'a, w publikacji na temat optymalizacji nawożenia roślin składnikami mineralnymi, (N 120 mg/l; P 60 mg/l; K 150 mg/l; Ca 200 mg/l; Mg 60 mg/l; S 50 mg/l; Fe 5 mg/l; Cu 0,3 mg/l; Zn 1 mg/l; Mn 2 mg/l; Co 0,03 mg/l; Mo 0,02 mg/l; B 0,2 mg/l)<sup>111-113</sup>. Dla części roślin zwiększono 20-krotnie stężenie poszczególnych mikroelementów w pożywce, w innych próbach rośliny pozbawiono jednego lub wszystkich badanych mikroelementów. Po 50 dniach wzrostu rośliny zebrano i oznaczono aktywność aminopeptydaz w ekstraktach białkowych. Pomiar aktywności prowadzono w trzech różnych pH (3,5, 6,0 i 8,0), wobec substratu z *N*-końcówką lizyną<sup>113</sup>. Zmiany w aktywności aminopeptydaz siewek kukurydzy przedstawiono na rysunku nr 2.



Rys.2. Wpływ zróżnicowanej suplementacji miedzi, manganu, cynku, molibdenu i kobaltu na aktywność aminopeptydaz z siewek kukurydzy w różnym pH<sup>113</sup>

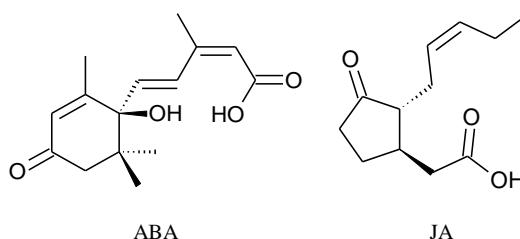
Badania aktywności enzymów w różnym pH ujawniły, że zarówno niedobór jak i nadmiar mikroelementów wpływał na wzrost aktywności aminopeptydaz zasadowych. Największy wzrost zaobserwowano, gdy siewki kukurydzy rosły na pożywce pozbawionej jonów miedzi, manganu, cynku i kobaltu<sup>113</sup>.

Wpływ intensywnego nawożenia makroelementami na aktywność aminopeptydaz badano na siewkach ziemniaka. Aktywność aminopeptydazy leucynowej z liści ziemniaka nie ulegała znaczącym zmianom pod wpływem intensywnego nawożenia (dwukrotność rekomendowanych dawek) azotem, fosforem, potasem, magnezem i wapniem<sup>114</sup>.

Z uwagi na małą ilość doniesień literaturowych jak i faktu, że dotyczą one różnych gatunków roślin oraz różnych aminopeptydaz, trudno jest wysnuć jednoznaczne wnioski na temat wpływu nadmiaru lub deficytu mikro i makroelementów na te enzymy. Na podstawie przytoczonych danych literaturowych można przypuszczać, że na ekspresję aminopeptydaz silniej wpływają zmiany w suplementacji mikroelementów niż makroelementów. Zapewne wynika to z funkcji jakie poszczególne pierwiastki pełnią w roślinie. Wiele aminopeptydaz to metaloenzymy, których aktywność zależy od obecności dwuwartościowych jonów magnezu, cynku czy manganu (mikroelementy). Zarówno ich niedobór jak i nadmiar może zatem wpływać na aktywność tych enzymów.

### 2.3.5. Fitohormony

Fitohormony, czyli związki organiczne regulujące wzrost i rozwój rośliny, można podzielić na dwie grupy. Pierwszą grupę stanowią hormony stresu: kwas abscysynowy (ABA) i kwas jasmonowy (JA) (rysunek nr 3), kwas salicylowy (SA) oraz etylen. Druga grupa, to związki będące pozytywnymi regulatorami wzrostu roślin (auksyny, cytokiny, gibereliny oraz brassinosteroidy)<sup>4,115</sup>. Znane są również specyficzne fitohormony, występujące tylko w wybranych gatunkach roślin, np. systemina. Istnieje stosunkowo niewiele danych literaturowych dotyczących bezpośredniego wpływu dodatku fitohormonów na aktywność aminopeptydaz w roślinach. Najwięcej doniesień dotyczy wpływu pochodnej kwasu jasmonowego na aktywność aminopeptydaz leucynowych.



Rys.3. Struktury chemiczne wybranych roślinnych hormonów stresu (ABA-kwas abscysynowy, JA-kwas jasmonowy)

Kwas jasmonowy jest zaangażowany w regulację wzrostu, kiełkowania, morfogenezy i starzenia się roślin. Pośredniczy w reakcji rośliny na stres, np. w obronie przed patogenami czy stresem związanym z ozonem i zasoleniem<sup>4</sup>. Ponadto JA indukuje ekspresję genów odpowiedzi na zranienie<sup>116</sup>. Za aktywną postać tego fitohormonu uważa się jego lotny ester metylowy (MeJA)<sup>4</sup>. Związek ten jest wykorzystywany w badaniach nad wpływem jasmonidów na aktywność aminopeptydaz roślinnych. Przykładowo, jasmonian metylu powoduje aż 57-krotny wzrost ilości transkryptu *LapA* (aminopeptydazy leucynowej) w pomidorze<sup>66</sup>. Ponadto, LAP-A w roślinach pomidora poddanych działaniu MeJA, akumuluje się w większości w cytozolu komórek liści i w niewielkim stopniu również w plastydach<sup>117</sup>. W odpowiedzi na działanie JA indukcji ulega również mRNA kodujące LAP z ziemniaka<sup>118</sup>. Wykazano także, że aktywność aminopeptydazy leucynowej z nikli indyjskiej (*Cajanas cajan*) rośnie nawet dwukrotnie (zarówno lokalnie jak i systemicznie) w odpowiedzi na działanie jasmonianu metylu<sup>9</sup>.

Jasmonidy jako „długodystansowe” cząsteczki sygnałowe przenoszą informację o zranieniu do odległych, niezranionych miejsc i wywołują odpowiedź obronną. Natomiast systemina (peptyd zbudowany z 18 aminokwasów), odkryta u niektórych roślin psiankowatych (pomidor, papryka, wilcza jagoda, tytoń)<sup>119</sup>, działa wyłącznie w miejscu zranienia. Co ciekawe, systemina stymuluje syntezę JA. Ponadto w pomidorze o podwyższonym poziomie prosysteminy zachodzi konstytutywna ekspresja genów odpowiedzi na zranienie, jak gdyby roślina była permanentnie raniona. Natomiast u roślin z wyciszonym genem obserwowano obniżoną odporność na atak szkodników<sup>119</sup>. Kwas abscysynowy - ABA (dawniej nazywany dorminą), wpływa na hamowanie kiełkowania, uczestniczy w regulacji wzrostu i starzenia się roślin oraz odpowiedzi na czynniki stresowe<sup>4</sup> takie jak susza, zasolenie, niska temperatura czy wysokie stężenie ołowiu<sup>115</sup>. Etylen z kolei, odgrywa ważną rolę w indukowaniu genów obronnych, odpowiada za opadanie liści i owoców oraz za programowaną śmierć komórki. Etylen reguluje dojrzewanie owoców i podnosi odporność na stres związany z zasoleniem. Poziom tego związku można podnieść przez inkubację rośliny z przejrzałymi owocami (jabłkami lub bananami)<sup>115</sup>. Zbadano wpływ trzech wymienionych wyżej fitohormonów (systeminy, kwasu abscysynowego oraz etylenu) na aktywność aminopeptydaz w pomidorze. W wyniku działania wszystkich tych fitohormonów zaobserwowano dwukrotny wzrost aktywności aminopeptydaz i ilości transkryptu *LapA*<sup>66</sup>. Indukcji (szczególnie pod wpływem ABA) ulega również mRNA kodujące LAP z ziemniaka<sup>118</sup>.

#### 2.3.6. Zranienie

Zranienie roślin może wynikać z uszkodzeń przy zabiegach rolniczych, niekorzystnej pogody (silny wiatr, grad), czy też być efektem działania roślinożerców. Co ciekawe, roślina jest w stanie rozpoznać różnice pomiędzy mechanicznym zranieniem, a atakiem insektów i odpowiednio dobrać strategię obronną<sup>115</sup>. W badaniach mechanizmów obronnych zaobserwowano, że rośliny poddane mechanicznym uszkodzeniom, cechują się podwyższoną aktywnością szeregu enzymów i białek<sup>120</sup>.

Ponadto, zranienie działa stymulująco na produkcję etylenu oraz kwasu jasmonowego<sup>115</sup>, które, jak wspomniano wcześniej, wpływają na zwiększenie aktywności LAP w pomidorze<sup>66</sup>. Zatem można się spodziewać, że zranienie również będzie miało wpływ na ten enzym. Hipotezę tę potwierdzają badania nad aktywnością aminopeptydazy leucynowej w nikli indyjskiej. Liście rośliny poddano mechanicznemu zranieniu za pomocą igły i zauważono około dwukrotny wzrost aktywności aminopeptydazy leucynowej, zarówno w przypadku liści porażonych lokalnie, jak i systemicznie<sup>67</sup>. Tę samą tendencję zaobserwowano w przypadku LAP-A z pomidora. Enzym kodowany jest przez dwa geny *LapA1* i *LapA2*, które ulegają indukcji pod wpływem zranienia<sup>117</sup>. Wykazano, że w pomidorze mRNA kodujące LAP-A, jak i sam enzym akumulują się w zranionych liściach (w cytozolu i plastydach)<sup>66</sup>. W odpowiedzi na zranienie, indukcji ulegało również mRNA kodujące LAP z ziemniaka<sup>118</sup>.

### 2.3.7. Atak patogenów

Rośliny są również narażone na atak patogenów, czyli wirusów, bakterii i grzybów. Atak mikroorganizmów skutkuje zazwyczaj spowolnieniem kiełkowania i rozwoju roślin, a w sytuacjach ekstremalnych prowadzi do śmierci rośliny<sup>4</sup>.

Wśród najgroźniejszych bakteryjnych patogenów roślinnych pierwsze miejsce zajmują bakterie Gram-ujemne z gatunku *Pseudomonas syringae*. *P. syringae* odpowiedzialna jest za występowanie szeregu chorób zwanych bakteriozami, do których zaliczyć można: raka bakteryjnego drzew owocowych, bakteryjną brązową plamistość fasoli, bakteryjną kanciastą plamistość ogórka, bakteriozę lilaka, gnicie róż kalafiora, bakteryjną cętkowatość pomidora i plamistość pochew liści kukurydzy<sup>121</sup>. Infekcja może nastąpić zarówno po mechanicznym uszkodzeniu tkanek roślinnych, jak i po zranieniu wynikającym z żerowania roślinożerców. Stres wywołany przez infekcje bakteryjne może mieć wpływ na aktywność aminopeptydaz roślinnych. Udowodniono, że cDNA kodujące aminopeptydazę leucynową w pomidorze, ulega indukcji w odpowiedzi na infekcję *P. syringae*<sup>122</sup>. Późniejsze badania dowiodły, że mechanizm indukcji *LapA* jest w zasadzie odpowiedzią na zranienie wywołane przez koronatynę<sup>123</sup>. Koronatyna to toksyna produkowana przez *P. syringae*, która zarówno budową jak i działaniem naśladuje kwas jasmonowy<sup>119</sup>. Oprócz aminopeptydaz leucynowych również aminopeptydazy aspartyłowe wydają się kluczowe w przypadku infekcji patogenami *P. syringae*. Przykładowo, podczas infekcji tytoniu patogenami *P. syringae* pv. *Tomato*, wyciszenie genów kodujących aminopeptydazy aspartyłowe powoduje opóźnienie rozwoju roślin oraz obniżoną odporność roślin na infekcje<sup>124</sup>.

Podczas wczesnego rozwoju roślin, szczególnie niebezpieczne są infekcje wywołane przez grzyby chorobotwórcze. W porównaniu do zakażeń powodowanych przez wirusy i bakterie, przy infekcjach grzybiczych nie musi dojść do mechanicznego uszkodzenia tkanki roślinnej. Wiele fitopatogenicznych gatunków grzybów wypracowało mechanizmy aktywnego transferu przez tkanki roślinne (kutykulę i epidermalną ścianę komórkową). Grzyby produkują w tym celu koktajl enzymów

hydrolitycznych, w których skład wchodzi: celulazy, pektynazy, proteazy i kutynazy<sup>125</sup>. Zarodniki grzybów są wszechobecne w glebie, więc aby doszło do infekcji wystarczy brak odpowiedniej ochrony agrochemicznej i sprzyjające warunki. W klimacie umiarkowanym, duża okresowa wilgotność zwiększa prawdopodobieństwo wystąpienia tego typu infekcji. Jednymi z najczęściej występujących grzybów chorobotwórczych atakujących rośliny są *Fusarium oxysporum* i *Aspergillus Niger*. Grzyby te odpowiadają za znaczące straty w uprawach roślin<sup>126</sup>. Rośliny mogą rozpoznać atak grzybów na podstawie substancji produkowanych przez patogen, a nie występujących naturalnie w roślinie. Dotyczy to zarówno związków obecnych na powierzchni grzyba (np. chityna, fragmenty glukanu), jak i sekrecjonowanych białek. Sygnałem infekcji grzybiczej mogą też być produkty hydrolizy ściany komórkowej roślin (oligogalakturonidy) powstałe w wyniku działania enzymów pochodzących od grzyba<sup>125</sup>. Infekcje grzybami często skutkują zmianami w ekspresji i aktywności enzymów proteolitycznych rośliny. Zmiany takie zostały zaobserwowane po infekcji grzybami z gatunku *Fusarium* nasion kukurydzy i pszenicy<sup>127,128</sup> oraz korzeni ciecierzycy<sup>129</sup>. Odkryto również zmiany w aktywności aminopeptydaz w siewkach nikli indyjskiej (*Cajanas cajan*), zainfekowanych grzybami *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceri* i *Aspergillus niger* var. *Niger*. W wyniku infekcji siewek tymi gatunkami grzybów zaobserwowano wyższą aktywność jednej z dwóch zidentyfikowanych aminopeptydaz - AP1. W normalnych warunkach, podczas kiełkowania, aktywność AP1 (aminopeptydaza o masie ~97 kDa) stopniowo obniżała się (w 72 h kiełkowania zanikała całkowicie), natomiast obserwowano wzrost aktywności AP2 (o masie ~42,8 kDa). Wyszło zatem wniosek, że aminopeptydaza AP1, indukowana infekcją grzybiczą, zaangażowana była w reakcje obronne rośliny na zaistniały atak patogenów. Być może aminopeptydazy zaangażowane są w hydrolizę składników ściany komórkowej grzybów lub białek wydzielanych przez patogeny<sup>130</sup>. Postulat ten zdają się potwierdzać badania nad aminopeptydazami z siewek kukurydzy. W tym przypadku, wystarczającym czynnikiem powodującym zmiany w aktywności aminopeptydaz, jest już samo spryskanie dwutygodniowych siewek kukurydzy roztworem zawierającym karboksymetylo-chitynoglukan (związek wyizolowany ze ściany komórkowej *Aspergillus niger*). W wyniku tego zabiegu aktywność aminopeptydaz w liściach kukurydzy rośnie o 50%, mimo braku właściwej infekcji patogenem<sup>131</sup>.

#### 2.3.8. Związki ropopochodne i wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne

Związki ropopochodne i wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (WWA) są szeroko rozpowszechnionymi zanieczyszczeniami gleb. Wszystkie substancje ropopochodne są związkami niepolarnymi, lipofilowymi i słabo- lub nierozpuszczalnymi w wodzie<sup>132</sup>. WWA pojawiają się w środowisku w wyniku naturalnych procesów takich jak pożary lasów czy aktywność wulkaniczna. Jednak współcześnie głównym ich źródłem jest działalność człowieka (spalanie biomasy i paliw kopalnych, transport i przemysł)<sup>133</sup>. Skażeniu substancjami ropopochodnymi i WWA często ulegają gleby, szczególnie w okolicy dużych szlaków komunikacyjnych. Zanieczyszczenia te wpływają

na aktywność aminopeptydaz w mikroorganizmach zasiedlających te gleby. Przykładowo, wyciek oleju napędowego do gleby wpływa na wzrost aktywności (nawet 10-krotny) zewnątrzkomórkowej aminopeptydazy serynowej i alanylowej, pochodzących od ogółu mikroorganizmów bytujących w tej glebie<sup>134</sup>. Na aktywność aminopeptydaz mikroflory glebowej ma też wpływ remediacja i fitoremediacja, która następuje po wystąpieniu skażenia<sup>134,135</sup>. W przypadku roślin, zanieczyszczenie gleby utrudnia, a nawet uniemożliwia pobieranie wody, soli mineralnych i upośledza oddychanie przez system korzeniowy<sup>132</sup>, co z kolei wpływa na obniżenie zawartości poszczególnych makroelementów w roślinie, np. mogą powodować spadek zawartości azotu, potasu czy fosforu<sup>136</sup>. Jeśli natomiast zanieczyszczenia ropopochodne pokryją nadziemne części rośliny, wówczas wnikają do tkanek bogatych w substancje tłuszczowe, żywicowe i olejki eteryczne (co wynika z ich lipofilowości). Następnie może dojść do zaburzeń w przewodzeniu wody, co skutkuje obumieraniem wyżej położonych części roślinnych<sup>4,132</sup>. W wyniku akumulacji związków ropopochodnych i WWA w roślinach, związki te włączane są w łańcuch pokarmowy człowieka. Skoro inne zanieczyszczenia, takie jak zasolenie czy metale ciężkie, wpływają na aktywność roślinnych aminopeptydaz, można spodziewać się, że w przypadku zanieczyszczeń substancjami ropopochodnymi efekt będzie podobny. Szczególnie, że wpływają na aktywność enzymów (w tym aminopeptydaz) ryzosfery<sup>137</sup>. Niestety niewiele jest doniesień na temat bezpośredniego wpływu związków ropopochodnych na aktywność tych enzymów w roślinach. Znany jest jedynie wpływ WWA na aktywność aminopeptydazy w siewkach owsa, poddanego różnym metodom remediacji. Otrzymane wyniki sugerują, że na wzrost aktywności aminopeptydaz największy wpływ ma metoda remediacji polegająca na natlenianiu gleby nadtleniem wodoru<sup>138</sup>.

### 2.3.9. Środki ochrony roślin

Stosowanie środków ochrony roślin ma na celu ochronę plonu przed niekorzystnym wpływem chwastów (herbicydy) ale też ma przeciwdziałać żerowaniu owadów (insektycydy), infekcjom grzybiczym (fungicydy) i innym zagrożeniom roślin uprawnych (np. zoocydy). Ponadto, do tej grupy zalicza się związki służące do regulowania wzrostu roślin uprawnych, np. defloranty, defolianty i desykanty<sup>139</sup>. Desykanty to środki stosowane w celu wywołania obumierania i zasychania zielonych części roślin. Znajdują zastosowanie w uprawie rzepaku. W latach wilgotnych zwiększają wytrzymałość łuszczyń na pęknięcie i przyczyniają się do zwiększenia plonu<sup>3</sup>. W literaturze brak jest doniesień na temat wpływu środków ochrony roślin na działanie roślinnych aminopeptydaz. Proteazy w tym aminopeptydazy są enzymami szeroko rozpowszechnionymi we wszystkich organizmach żywych. Proteazy odrywają kluczowe role w reakcji na takie stresory jak pestycydy. Wykazano, że owady o podwyższonej aktywności proteaz wykazują większą odporność na działanie insektycydów<sup>140</sup>. Ponadto, niektóre pestycydy wpływają na aktywność aminopeptydaz leucynowych w mikroorganizmach występujących w glebie<sup>141</sup>, można się spodziewać, że substancje te będą wpływały również na aktywność aminopeptydaz roślinnych. Dowiedzono również, że wybrane

aminopeptydazy zaangażowane są w obronę rośliny przed skutkami deficytu wody<sup>45,86</sup>, zatem stosowanie desykantów może wywoływać podobne zmiany w aktywności aminopeptydaz co susza.

Podsumowując, aktywność wybranych aminopeptydaz może się zmieniać pod wpływem różnych stresorów. W większości badanych gatunków roślin zaobserwowano wzrost aktywności tych enzymów (tabela nr 3). Najprawdopodobniej, zmiany te są związane z uruchomieniem systemów obronnych, mających na celu walkę z atakującym patogenem lub przystosowanie się do niekorzystnych warunków.

Tab.3. Przykłady roślin i występujących w nich aminopeptydaz, których aktywność/ekspresja rośnie w odpowiedzi na dany czynnik stresujący

| <b>Czynnik stresujący</b> | <b>Roślina (aminopeptydaza)</b>  |
|---------------------------|--|
| niska temperatura         | jęczmień (HvMAP) <sup>68</sup>   |
| deficyt wody              | <p>                     pomidor (LAP-A)<sup>66</sup><br/>                     pszenżyto (PAP)<sup>45</sup><br/>                     rzodkiewnik pospolity (PAP)<sup>70</sup><br/>                     fasola zwyczajna (PvAP1-5)<sup>86</sup> </p> |
| zasolenie                 | <p>                     pomidor (LAP-A)<sup>66</sup><br/>                     pszenżyto (PAP)<sup>45</sup><br/>                     pszenica samopsza (aminopeptydaza leucynowa 2)<sup>102</sup> </p>  |
| metale ciężkie            | <p>                     groch zwyczajny (AP1, AP2)<sup>104</sup><br/>                     pomidor (LAP)<sup>105</sup><br/>                     pszenżyto (PAP)<sup>45,107</sup> </p>   |
| fitohormony               | <p>                     nikla indyjska (LAP)<sup>9</sup><br/>                     pomidor (LAP-A)<sup>66</sup> </p>  |
| zranienie                 | <p>                     nikla indyjska (LAP)<sup>9</sup><br/>                     pomidor (LAP-A)<sup>66</sup> </p>  |
| atak patogenów            | <p>                     nikla indyjska (AP1)<sup>130</sup><br/>                     pomidor (LAP-A)<sup>123</sup> </p>   |

### 3. Rzepak – znaczenie

#### 3.1. Rys historyczny i uprawa rzepaku

Rzepak (*Brassica napus* L.) należy do rodziny kapustowatych (*Brassicaceae*), dawniej określanych jako krzyżowe (*Cruciferae*). Gatunek ten powstał w wyniku przekrzyżowania, w warunkach naturalnych, kapusty (*B. oleracea* L.) i rzepiku (*B. campestris* L.). Wyróżnia się zarówno rzepak ozimy jak i jary. Przeważa jednak uprawa odmiany ozimej, charakteryzującej się większą odpornością i plonowaniem (nawet o 40% wyższym w porównaniu do odmiany jarej). Protoplastą rzepaku jest rzepik, czyli kapusta polna. Rośliny te są do siebie bardzo podobne, do tego stopnia, że w znaleziskach archeologicznych nie da się odróżnić nasion rzepaku od nasion rzepiku. Historia uprawy rzepaku sięga nawet 2000 p.n.e.. Prawdziwy rozkwit popularności rzepaku przypada na drugą połowę XX w. i dotyczy głównie Kanady i Europy. Dzięki hodowli ulepszonych odmian, uprawa rzepaku stała się popularna również w USA, Chinach i Australii<sup>142</sup>.

Rzepak to współcześnie najważniejsza roślina oleista w Polsce i w Europie. W 2016 roku, światowa produkcja nasion tej rośliny osiągnęła poziom prawie 69 milionów ton, z czego Europa zapewnia około 33% światowej produkcji. Co prawda głównymi producentami rzepaku są Chiny, Kanada i Indie, jednak wiele krajów europejskich (np. Francja, Niemcy, Wielka Brytania) znajduje się w pierwszej dziesiątce, jeśli chodzi o wysokość plonów. W Polsce w 2016 roku produkcja wynosiła około 2,2 mln ton, dzięki czemu nasz kraj zajął siódme miejsce w światowej klasyfikacji<sup>1</sup>. W tym samym roku, według danych GUS, 866,8 tys. ha pól zostało przeznaczonych w Polsce pod uprawę roślin oleistych, z tego rzepak stanowił 95,4%. Najwięcej upraw rzepaku znajduje się w zachodniej i południowej części kraju<sup>143</sup>.

Nasiona współczesnych odmian rzepaku zawierają ok. 40-50% tłuszczu, 20-25% białka, 6-7% włókna, 4-6% popiołu i 18-22% bezazotowych związków wyciągowych w suchej masie. Na związki wyciągowe składają się głównie wielocukry zapasowe (skrobia, glikogen, inulina), dwucukry i cukry proste<sup>3,142,144</sup>. Olej rzepakowy z nasion odmian ulepszonych jest olejem uniwersalnym, znajdującym zastosowanie zarówno spożywcze jak i przemysłowe. W porównaniu do odmian tradycyjnych, olej ten charakteryzuje się zwiększoną ilością kwasu oleinowego, linolowego i linolenowego, a także zmniejszoną zawartością kwasu erukowego<sup>3,142</sup>. Porównanie zawartości najważniejszych kwasów tłuszczowych w oleju z odmian tradycyjnych i ulepszonych przedstawiono w tabeli 4.



Tab. 4. Porównanie zawartości poszczególnych kwasów tłuszczowych w oleju rzepakowym odmian tradycyjnych i ulepszonych<sup>142</sup>

| Kwas tłuszczowy          | Zawartość w oleju odmiany tradycyjnej (%) | Zawartość w oleju odmiany ulepszonej (%) |
|--------------------------|---|--|
| erukowy                  | 48-54                                     | 0-2                                      |
| oleinowy                 | 14-16                                     | 56-68                                    |
| linolowy                 | 13-15                                     | 18-22                                    |
| linolenowy               | 9-11                                      | 10-13                                    |
| eikozenowy               | 7-9                                       | 1-2                                      |
| palmitynowy i stearynowy | 3-4                                       | 4-6                                      |

Olej odmian tradycyjnych charakteryzuje się wysoką zawartością kwasu erukowego i glukozynolanów. Obydwa te składniki wpływają negatywnie na zdrowie człowieka i zwierząt karmionych paszą na bazie śruty rzepakowej<sup>3,142</sup>. W oleju rzepakowym, obok wymienionych wcześniej kwasów tłuszczowych, znajdują się także inne substancje aktywne biologicznie, wpływające na wartość oleju jako żywności funkcjonalnej (np. tokoferole, fitosterole i karotenoidy)<sup>3,142</sup>. Olej rzepakowy jest najpopularniejszym olejem spożywczym w Polsce. W 2014 produkcja wyniosła ponad 1,1 mln ton, a dla porównania w tym samym roku w Polsce wyprodukowano tylko około 19 tys. ton oleju słonecznikowego<sup>145</sup>. W przemyśle produkt ten jest wykorzystywany do produkcji estrów metylowych kwasów tłuszczowych oleju rzepakowego (RME), które stanowią cenny dodatek do oleju napędowego. Ponadto, stosowany jest także w produkcji środków powierzchniowo czynnych, lakierów, farb, rozpuszczalników, a nawet ekologicznych wykładzin podłogowych. Dodatkowo, śruta rzepakowa stanowi cenne źródło białka w produkcji pasz<sup>142,3,2</sup>.

### 3.2. Fazy rozwoju rzepaku

Do określania fitofizjologicznych faz wzrostu roślin stosuje się w krajach UE skalę BBCH (*niem.* Biologische Bundesanstalt, Bundessortenamt und Chemische Industrie). Skala ta dzieli rozwój rośliny na dziesięć faz głównych (od 0 do 9), a te z kolei składają się z dziesięciu drugorzędnych faz. Pełnię danej fazy roślina osiąga wtedy, gdy 50% roślin znajduje się w danym stadium wzrostu. Według skali BBCH rozwój rzepaku ozimego przebiega następująco<sup>2,142,146</sup>:

#### *BBCH 0 – Kielkowanie i wschody*

00 nasiona suche

01 pęcznienie nasion

02 przemiany substancji zapasowych w nasieniu

03 ukazanie się korzonka zarodkowego

04 formowanie przez zarodek łodyżki podliścieniowej (hypokotylu)

05 łodyżka podliścieniowa pojawia się nad powierzchnią gleby w postaci zagiętego kolanka

06 prostowanie kolanka nad ziemią i rozwój liścieni (początek wschodów)

07–09 wzrost liścieni

*BBCH 1 – Formowanie i rozwój rozety liściowej*

- 10 liścienie całkowicie rozwinięte, między nimi pojawia się ogonek pierwszego liścia
- 11 faza 2. liścia
- 12 faza 3 liści
- 13 faza 4 liści
- 14–18 faza kolejnych liści
- 19 ponad 9 liści w rozecie

*BBCH 2 – Okres zimowego spoczynku roślin*

- 20 zakończenie wzrostu roślin i tworzenia nowych liści BBCH 20
- 21 przedzimie
- 23 pełnia zimy
- 26 po zimie
- 27 zaranie wiosny
- 29 przedwiośnie

*BBCH 3 – Formowanie i wzrost pędu*

- 30 ruszenie wegetacji wiosennej
- 31 odtwarzanie przemarzniętej rozety
- 32 początek wydłużania pędu głównego
- 33 widoczne 1. międzywęźle
- 34 widoczne 2. międzywęźle
- 35 widoczne 3. międzywęźle
- 36–38 widoczne kolejne międzywęźla
- 39 widoczne 7 i więcej międzywęźli

*BBCH 5 – Pąkowanie*

- 50 pąki kwiatowe zamknięte w liściach
- 51 zielony pąk (pąki kwiatowe widoczne z góry)
- 52 pąki kwiatowe wydostają się z najmłodszych liści
- 53 pąki kwiatowe rozwinięte nad najmłodszymi liśćmi
- 54 pąki kwiatowe na pędzie głównym całkowicie wyodrębnione z okrywy liściowej
- 55–58 pąki kwiatowe na kolejnych rozgałęzieniach bocznych całkowicie wyodrębnione z okrywy liściowej
- 59 żółty pąk (widoczne pierwsze płatki w pąkach pędu głównego)

*BBCH 6 – Kwitnienie*

- 60 otwarte pierwsze kwiaty
- 61 początek kwitnienia (otwartych 10% kwiatów w kwiatostanie głównym)
- 62 otwartych 20% kwiatów w kwiatostanie głównym
- 63 otwartych 30% kwiatów w kwiatostanie głównym
- 64 otwartych 40% kwiatów w kwiatostanie głównym
- 65 pełnia kwitnienia: otwartych 50% kwiatów w kwiatostanie głównym, starsze płatki opadają
- 66–67 końcowa faza kwitnienia
- 68 przekwitanie (większość płatków kwiatowych opadła)
- 69 pojedyncze rośliny kończą kwitnienie – dokwitanie

*BBCH 7 – Formowanie i rozwój łuszczyn*

- 70 pierwsze łuszczyny osiągną typową wielkość
- 71 około 10% łuszczyn osiągnęło typową wielkość
- 72 około 20% łuszczyn osiągnęło typową wielkość
- 73 około 30% łuszczyn osiągnęło typową wielkość
- 74 około 40% łuszczyn osiągnęło typową wielkość
- 75 około 50% łuszczyn osiągnęło typową wielkość

- 76 około 60% łuszczyń osiągnęło typową wielkość
- 77 około 70% łuszczyń osiągnęło typową wielkość
- 78 około 80% łuszczyń osiągnęło typową wielkość
- 79 prawie wszystkie łuszczyzny osiągnęły typową wielkość

#### *BBCH 8 – Wzrost i dojrzewanie nasion*

- 80 początek dojrzewania
- 81 około 10% łuszczyń zawiera nasiona brązowe
- 82 około 20% łuszczyń zawiera nasiona brązowe
- 83 około 30% łuszczyń zawiera nasiona brązowe
- 84 około 40% łuszczyń zawiera nasiona brązowe
- 85 około 50% łuszczyń zawiera nasiona brązowe
- 86 około 60% łuszczyń zawiera nasiona brązowe
- 87 około 70% łuszczyń zawiera nasiona brązowe
- 88 około 90% łuszczyń zawiera nasiona brązowe
- 89 dojrzałość pełna (nasiona we wszystkich prawie łuszczyznach brązowo-czarne i twarde)

#### *BBCH 9 – Zamieranie roślin*

- 90–97 rośliny stopniowo zamierają i zasychają
- 98 obumarłe rośliny czernieją
- 99 okres spoczynku zebranych nasion<sup>2,142,146</sup>

Brakujące numery kodu dziesiątego (4) oznaczają, że dana faza nie ma zastosowania dla wzrostu rzepaku. Stosowanie kodu nie tylko ułatwia wskazania technologiczne w nawożeniu rzepaku i innych zabiegach agrochemicznych, ale też jest przydatne w ocenie wczesności odmian. Ponadto skala BBCH stosowana jest w literaturze i ułatwia dyskusję naukową<sup>2,142,146</sup>.

### **3.3. Środki uprawy roślin stosowane w produkcji rzepaku**

Uprawy rzepaku narażone są na działanie licznych owadów, chwastów i mikroorganizmów, które niejednokrotnie wywołują szereg chorób. Ponadto rzepak może być atakowany przez gryzonie, ślimaki oraz ptaki<sup>2,3,147</sup>. Ze względu na liczne zagrożenia niezbędna jest jego ochrona. Obecnie stosuje się tzw. integrowaną ochronę rzepaku. Jest to koncepcja, mająca na celu całościowe spojrzenie na ochronę danej uprawy i walkę z agrofagami (niepożądane organizmy obniżające plony roślin uprawnych), uwzględniająca metody agrotechniczne, hodowlane i chemiczne. Według FAO (*ang.* Food and Agriculture Organization of the United Nations), integrowana ochrona uprawy to: “wykorzystanie wszystkich dostępnych metod i technik, z zachowaniem ochrony środowiska, w celu utrzymania populacji agrofaga na poziomie, który nie zagraża spowodowaniem nieakceptowanych ekonomicznie uszkodzeń lub strat.”<sup>2,145</sup>.

Do najpopularniejszych metod ochrony rzepaku przed szkodliwymi organizmami zalicza się stosowanie pestycydów. Rozróżnia się: herbicydy (zwalczające chwasty), fungicydy (środki grzybobójcze i grzybobstatyczne), zoocydy (w tym: insektycydy, akarycydy, nematocydy i wiele innych). Ponadto, w rolnictwie stosuje się regulatory wzrostu roślin, synergetyki (środki potęgujące działanie innych substancji), defolianty (usuwające liście), defloranty (usuwające nadmierną ilość kwiatów) i desykanty (do wysuszania roślin)<sup>148,149</sup>.

Środki ochrony roślin oprócz substancji czynnych zawierają w swoim składzie także adiuwanty, mające wspomagać ich działanie. Stosuje się między innymi penetranty (związki mające ułatwić wnikanie substancji czynnej do tkanki agrofaga), preparaty zwiększające przyczepność cieczy, obciążacze i wiele innych. Stosuje się też związki mające ułatwić mieszalność preparatu np. z nawozami<sup>150</sup>. Środki ochrony roślin mogą mieć różne formy użytkowe, np. zawiesiny, oleje, emulsje czy areozole. Każdy rodzaj formulacji ma swój unikalny kod np. AL to ciecz do bezpośredniego użycia, EC – koncentrat do sporządzania emulsji wodnej, SC – koncentrat w postaci stężonej zawiesiny, SE – zawiesino-emulsja i wiele innych<sup>151</sup>. W tym rozdziale omówione zostaną szczególnie fungicydy i herbicydy stosowane w ochronie rzepaku.

Większość chorób dotyczących uprawy rzepaku powodowanych jest przez liczne gatunki grzybów. Do najczęstszych należą: sucha zgnilizna kapustnych, zgnilizna twardzikowa, czerń krzyżowych, szara pleśń, kiła kapusty i inne (tabela nr 5)<sup>152</sup>. Straty w plonach rzepaku wywołane tymi chorobami mogą dochodzić nawet do kilkunastu procent<sup>3</sup>.

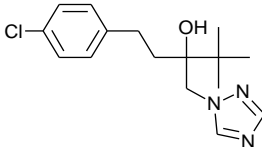
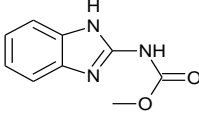
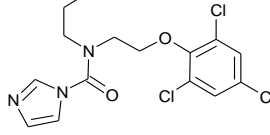
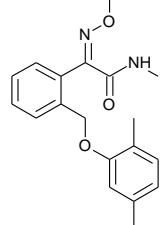
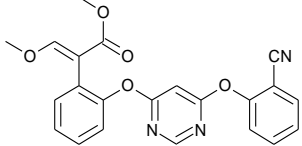
Tab. 5. Najczęstsze choroby rzepaku i mikroorganizmy odpowiedzialne za ich wystąpienie<sup>3,152</sup>

| Choroba                              | Mikroorganizmy  |
|--------------------------------------|---|
| sucha zgnilizna kapustnych           | <i>Leptosphaeria maculans</i> (grzyb)<br><i>L. biglobosa</i> (grzyb)  |
| zgnilizna twardzikowa                | <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> (grzyb)<br><i>Pythium debaryanum</i> (grzyb)<br><i>Rhizoctonia solani</i> (grzyb) |
| czerń krzyżowych                     | <i>Alternaria spp.</i> (grzyb)  |
| szara pleśń                          | <i>Botryotinia fuckeliana</i> (grzyb)   |
| kiła kapusty                         | <i>Plasmodiophora brassicae</i> (pierwotniak)   |
| werticilioza                         | <i>Verticillium dahliae</i> (grzyb)   |
| cylindrosporioza                     | <i>Pyrenopeziza brassicae</i> (grzyb)   |
| mączniak prawdziwy roślin kapustnych | <i>Erysiphe cruciferarum</i> (grzyb)  |
| mozaika rzepaku                      | <i>Turnip mosaic virus</i> (wirus)  |

W celu ograniczenia strat wywołanych przez grzyby chorobotwórcze stosuje się fungicydy. W uprawie rzepaku ozimego i jarego stosuje się często związki należące do grupy triazoli (np.: tebukonazol, metkonazol czy protiokonazol). Hamują one 14- $\alpha$ -demetylazę lanosterolu, blokując w ten sposób biosyntezę ergosterolu w komórkach grzybów<sup>153</sup>. Ponadto stosuje się benzimidazole, (np.: karbendazym) oraz imidazole (np. prochloraz). Interesującą grupą fungicydów są strobiluryny hamujące syntezę ATP (np. dimoksystrobina i azoksystrobina). Ich nazwa pochodzi od gatunku grzyba *Strobilurus tenacellus*, który wytwarza azoksystrobine<sup>2,154</sup>. Strobiluryny wpływają również na produkcję fitohormonów i opóźniają starzenie się liści oraz zmniejszają przewodnictwo szparkowe i zużycie wody, co powoduje zwiększenie aktywności fotosyntetycznej, zwiększają także aktywność enzymów antyoksydacyjnych<sup>155</sup>. W ostatnich latach popularne stały się inhibitory dehydrogenazy kwasu bursztynowego. Zalicza się do nich między innymi boskalid, fluopyram i izopirazam<sup>155</sup>.

Fungicydy stosuje się od razu po pojawieniu się objawów chorobowych, a nawet wcześniej jeżeli występują warunki sprzyjające rozwojowi grzybów. Wybrane substancje czynne fungicydów wraz ze strukturami chemicznymi oraz przykładami chorób które zwalczają przedstawiono w tabeli nr 6.

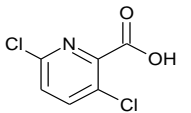
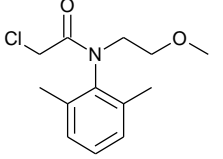
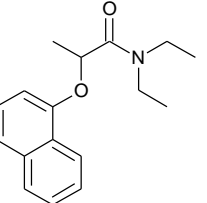
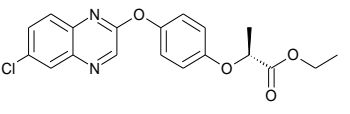
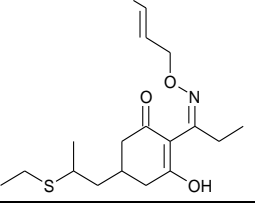
Tab. 6. Wykaz wybranych fungicydów stosowanych w uprawie rzepaku oraz sposób działania na grzyby<sup>2,154</sup>

| Nazwa zwyczajowa | Grupa chemiczna | Struktura chemiczna   | Działanie   | Przykłady zwalczanych chorób  |
|------------------|-----------------|---|---|---|
| tebukonazol      | triazol         |    | Inhibitor biosyntezy ergosterolu, działanie zapobiegawcze, lecznicze i wyniszczające.         | Zgorzel siewek (gdy stosowany jako zaprawa nasienna), zgnilizna twardzikowa, cylindrosporioza, czerń krzyżowych i sucha zgnilizna kapustnych. |
| karbendazym      | benzimidazol    |    | Inhibitor mitozy i podziałów komórkowych, działanie zapobiegawcze, lecznicze i wyniszczające. | Szara pleśń, sucha zgnilizna kapustnych, czerń krzyżowych, cylindrosporioza.  |
| prochloraz       | imidazol        |    | Inhibitor 14- $\alpha$ -demetylasy lanosterolu – niszczenie błon komórkowych.                 | Czerń krzyżowych, szara pleśń, zgnilizna twardzikowa.   |
| dimoksytrobina   | strobiluryna    |   | Inhibitor oddychania komórkowego. Działanie zapobiegawcze i interwencyjne.                    | Czerń krzyżowych, szara pleśń, zgnilizna twardzikowa.   |
| azoksytrobina    | strobiluryna    |  | Inhibitor oddychania komórkowego. Działanie zapobiegawcze i interwencyjne.                    | Czerń krzyżowych, szara pleśń, sucha zgnilizna kapustnych, zgnilizna twardzikowa.   |

Zachwaszczenie stanowi kolejny problem w uprawie rzepaku ozimego, ze względu na powolny jesienny wzrost. Częste powtarzanie tych samych upraw na jednym polu, powoduje nagromadzenie wybranych gatunków. Przykładami chwastów popularnych w uprawach rzepaku zarówno ozimego jak i jarego są: perz właściwy, maruna bezwonna, przytulina czepna, rumian polny czy tobołki polne<sup>2,3,147</sup>. W uprawie rzepaku ozimego herbicydy stosuje się z reguły jesienią, dogłębowo (przed wschodami) lub dolistnie (po wschodach). Jako substancje aktywne, używa się szeregu związków należących do różnych grup chemicznych i o zróżnicowanym działaniu. Przykładowo, chlopyralid (pochodna kwasu pirydynokarboksyłowego) jest regulatorem wzrostu (syntetyczną auksyną) i stosuje się go do zwalczania wielu gatunków chwastów dwuliściennych. Dużą grupę używanych związków stanowią też inhibitory wzrostu siewek, do których należą acetamidy i chloroacetamidy (np. dimetachlor, metazachlor, propachlor, napropamid, propyzamid) oraz

pochodne dinitroaniliny (trifluralina)<sup>2,154</sup>. Graminicydy (chizalofop, kletodym, cykloksydym, fluazyfop, haloksyfop i propachizafop), to odrębna grupa substancji stosowanych w ochronie rzepaku przed roślinami wieloletnimi, chwastami jednoliściennymi oraz samosiewami zbóż<sup>2,3</sup>. Struktury chemiczne oraz sposób działania niektórych z wymienionych substancji czynnych przedstawiono w tabeli 7. Ponadto w uprawie rzepaku stosuje się także glifosat, który jest inhibitorem syntezy kwasu 5-endopirogrono-3-fosfozikimowego (ESPS) i stosowany jest zarówno jako herbicyd, jak i desykant<sup>156</sup>. W niektórych przypadkach to rzepak może być uznawany za chwast, a jego samosiewy są zagrożeniem dla upraw np. kukurydzy. W zwalczaniu samosiewów rzepaku stosuje się herbicydy z grupy trójketonów (np. mezotrion, tembotrion), które inhibują syntezę karotenoidów.

Tab.7. Wykaz wybranych herbicydów stosowanych z w uprawie rzepaku wraz ze strukturami chemicznymi i sposobie działania na chwasty<sup>2,154,157</sup>

| Nazwa zwyczajowa     | Grupa chemiczna                         | Struktura chemiczna   | Działanie  | Przykłady zwalczanych chwastów   |
|----------------------|---|---|--|--|
| chlorypyralid        | pochodna kwasu pirydyno-karboksylowego  |    | Zaburzenie równowagi hormonalnej, działanie podobne do auksyn.   | Babka lancetowata, krwawnik pospolity, maruna bezwonna, mlecze, rdesty i inne.                               |
| dimetachlor          | chloroacetamid                          |  | Inhibicja enzymów odpowiedzialnych za syntezę kwasów tłuszczowych o bardzo długich łańcuchach węglowych - zahamowanie podziałów komórkowych.   | Komosa biała, maruna bezwonna, miotła zbożowa, niezapominajka polna, przetacznik perski, rumian polny i inne |
| napropamid           | acetamid                                |  | Inhibicja enzymów odpowiedzialnych za syntezę kwasów tłuszczowych o bardzo długich łańcuchach węglowych - zahamowanie podziałów komórkowych, ponadto upośledzenie wzrostu i rozwoju korzeni. | Chwastnica jednostronna, gwiazdnica pospolita, miotła zbożowa, mlecze, rumian polny, samosiewy zbóż i inne.  |
| chizalofop-P-etylowy | pochodna kwasu arylofenoksypropionowego |  | Inhibitor karboksylazy acetylo-CoA.  | Chwastnica jednostronna, miotła zbożowa, owies głuchy, perz właściwy, samosiewy zbóż i inne.                 |
| kletodym             | cykloheksanodion                        |  | Inhibitor karboksylazy acetylo-CoA.  | Chwastnica jednostronna, miotła zbożowa, owies głuchy, perz właściwy, samosiewy zbóż i inne.                 |

## CZEŚĆ EKSPERYMENTALNA

### 4. Materiały i metody

#### 4.1. Stosowane odczynniki

Stosowano odczynniki i rozpuszczalniki o czystości analitycznej. Poniżej (tabela 8) przedstawiono zestawienie odczynników i substancji, które stosowano oraz źródła ich pochodzenia.

Tab.8. Wykaz odczynników i ich producentów

| Odczynniki   | Producent/ źródło   |
|--|---|
| Tris, 2-merkaptotanol, PVP, <i>p</i> -nitroanilina, 4-metylomorfolina, chloromrówczan izobutyłu, naftalen  | Acros Organics (Geel, Belgia)   |
| antracen, DMSO, siarczan amonu, chlorek sodu, fenantren, <i>n</i> -heksan, dichlorometan, pirydyna, 2-propanol, THF, Triton X-100, TFA, TCA  | Avantor Performance Materials (dawniej POCH, Gliwice, Polska)   |
| APS, SDS, TEMED, żele do ogniskowania izoelektrycznego, standardy białkowe do elektroforezy SDS-PAGE (Precision Plus Protein Dual Xtra Standards)  | Bio Rad (Hercules, CA, USA)   |
| benzen, podchloryn sodu, etanol, metanol, octan etylu, toluen  | Chempur   |
| Coomassie R-350  | GE Healthcare (Upsala, Szwecja)   |
| glicyna, albumina wołowa frakcja V, kwas ortofosforowy   | Merck (Dramstadt, Niemcy)   |
| Leu- <i>p</i> NA, Ala- <i>p</i> NA, bestatyna, 1,10-fenantrolina, EDTA, EGTA, PMSF, E-64, Sephadex G-25, DTT, DEAE-Sephacryl HR 300, standardy białkowe do ogniskowania izoelektrycznego, Coomassie G-250, HCl (1 M) w octanie etylu, jasmonian metylu, kwas abscysynowy | Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA)   |
| Gly-Phe- <i>p</i> NA, Phe-Gly- <i>p</i> NA, Gly-Phe-Gly-Phe- <i>p</i> NA   | Otrzymano dzięki uprzejmości dr Macieja Makowskiego z Uniwersytetu Opolskiego.  |
| herbicydy: benzobicykolan, mezotriol, sulkotriol i tembotriol  | Zostały udostępnione dzięki uprzejmości dr inż. Hanny Barchańskiej z Politechniki Śląskiej.   |
| benzyna bezołowiowa 95 oraz olej napędowy  | zakupiono na stacji benzynowej Lukoil w Rybniku.  |
| fungicydy: Pictor 400 SC, Propulse 250 SE oraz Symetra 325   | Zostały udostępnione dzięki uprzejmości dr hab. Marioli Głazek prof. nadzw. Instytutu Ochrony Roślin – Państwowego Instytutu Badawczego oraz dr Agnieszki Mączyńskiej z Instytutu Ochrony Roślin, Państwowego Instytutu Badawczego – Oddział Sośnicowice. |
| Niezaprawione nasiona rzepaku ozimego odmiany Bellevue   | Zostały nieodpłatnie dostarczone przez firmę Bayer CropScience Polska.  |
| Pozostałe sole i kwasy nieorganiczne   | Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA) bądź Avantor Performance Materials (Gliwice, Polska)  |

## 4.2. Stosowany sprzęt

Tab.9. Wykaz stosowanej aparatury

| Sprzęt   | Producent         |
|--|-------------------|
| Sprzęt do średniociśnieniowej chromatografii ciekowej do rozdzielania białek FPLC Pathfinder wyposażony w pH-metr, konduktometr, spektrofotometr i kolektor frakcji; zestaw do elektroforezy pionowej Mini-PROTEAN® Tetra Cell | Bio Rad           |
| Spektrofotometr model V-650  | Jasco             |
| Czytnik mikroplamki SpectraMax i3x   | Molecular Devices |
| Spektrometr Direct Detect™ Quantitation System   | Merck Millipore   |
| Spektrometr NMR MR-400   | Varian            |
| Wirówka 5084R  | Eppendorf         |
| Homogenizator ErgoMix (750 W)  | Bosch             |
| pH-metr CP411  | Elmerton          |
| Wyrząsarka o ruchu drgającym vortex PV-1   | Grant-bio         |
| Mieszadło magnetyczne z kontrolą temperatury Hei-Standard; mieszadło mechaniczne RZR 2021, zaopatrzone w homogenizator Pottera   | Heidolph          |
| Elektroda EER-11   | Hydromet          |
| Waga analityczna WAA 160/C/2; waga techniczna WPS 510/C/1  | Radwag            |

## 4.3. Ogólna metodyka oznaczania aktywności aminopeptydaz

Aktywność aminopeptydaz oznaczano według zmodyfikowanej metody opisanej w literaturze<sup>158</sup>. Metoda ta polegała na spektrofotometrycznym pomiarze stężenia *p*-nitroaniliny uwolnionej w wyniku enzymatycznej hydrolizy *p*-nitroanilidu wybranego aminokwasu. Reakcję prowadzono przez 10 min. Pomiar wykonano przy długości fali 405 nm i w temperaturze 37°C. Wyznaczony molowy współczynnik absorpcji *p*-nitroaniliny wynosił  $\epsilon=96207 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3$ . Stosowano następujące substraty: Ala-*p*NA, Gly-*p*NA, Leu-*p*NA, Met-*p*NA, Phe-*p*NA i Pro-*p*NA, rozpuszczone w DMSO, o stężeniu 40 mM. Objętość substratu w próbce nie przekraczała 2,5%. Stosowano bufor 50 mM PBS, o pH 7,0. W próbie kontrolnej ekstrakt enzymatyczny lub oczyszczone białko zastąpiono buforem. Pomiar aktywności enzymatycznej wykonywano w minimum 3 powtórzeniach. W zależności od tego, czy analizowano oczyszczone białko czy ekstrakt białkowy, stosowano różne objętości roztworu enzymów i stężenia substratów, które zostały szczegółowo podane w dalszych rozdziałach.

Jedna jednostka enzymatyczna (U) katalizuje przekształcenie 1  $\mu\text{mola}$  substratu w ciągu 1 minuty w temperaturze 37°C.



Zawartość białka oznaczano metodą Bradforda<sup>159</sup>, przy długości fali 595 nm, wykonując minimum 3 pomiary. Krzywą wzorcową do tej metody wykonano stosując albuminę wołową (frakcja V).

Stężenie białka w roztworach kontrolowano również metodą spektrometrii w podczerwieni (IR), korzystając z czytnika Direct Detect™ Quantitation System. Metoda polegała na pomiarze absorpcji promieniowania podczerwonego przez wiązania amidowe białek. Wyznaczenie stężenia białka zostało przeprowadzone przy użyciu testu Direct Detect™. Roztwory białka o objętości 2 µl aplikowano na membrany PTFE, otoczone hydrofobowym pierścieniem, znajdujące się na specjalnej, jednorazowej karcie dedykowanej do tego czytnika. Po nałożeniu białka, odczekano 3 minuty na wyschnięcie membran, a następnie kartę umieszczono w czytniku i wykonano pomiar. Wykonano również próbę ślepą, którą stanowił bufor 50 mM PBS, o pH 7,0. Stosowana metoda nie wymaga dodatkowych kalibracji ani wyznaczania krzywych wzorcowych. Otrzymany wynik to średnia z minimum trzech pomiarów.

#### **4.4. Nasiona rzepaku - izolacja aminopeptydaz oraz charakterystyka enzymów**

200 g nasion rzepaku ozimego odmiany Bellevue, moczono przez 24 h w 750 ml, 50 mM buforu Tris-HCl (pH 8,0), zawierającego 50 mM NaCl i 1% PVP. Tak przygotowane nasiona homogenizowano przez 10 min, z użyciem homogenizatora marki Bosch, a następnie odwirowano (4°C, 10 000 obr/min (12208 rcf), 30 min). Osad odrzucono, a supernatant zdekantowano. Następnie supernatant trzykrotnie wytrząsano *n*-heksanem na zimno, w celu usunięcia frakcji olejowych. Tak otrzymany ekstrakt wysolono siarczanem(VI) amonu do 35%, a następnie odwirowano (4°C, 12208 rcf, 30 min). Ponownie odrzucono osad, a supernatant wysolono do 65% siarczanem(VI) amonu. Optymalna ilość siarczanu(VI) amonu, użyta do wysalania ekstraktów, została wyznaczona eksperymentalnie. We wstępnych badaniach stosowano różne stopnie wysolenia ekstraktu, a następnie badano aktywność aminopeptydaz w supernatancie i w rozpuszczonym osadzie. W przypadku pierwszego wysolenia zastosowano maksymalną ilość soli, przy której osad nie wykazywał aktywności aminopeptydaz. W przypadku drugiego wysolenia, dodawano siarczanu(VI) amonu do momentu, aż supernatant nie wykazywał aktywności aminopeptydaz.

Po ponownym odwirowaniu (4°C, 12208 rcf, 30 min), supernatant został odrzucony, osad rozpuszczono w 150 ml, 50 mM buforu Tris-HCl (pH 8,0), zawierającego 50 mM NaCl i 10 mM BME.

Otrzymany surowy ekstrakt oczyszczano metodą FPLC, z zastosowaniem następujących kolumn:

- Sephadex G-25 (2,5 x 30 cm), przepływ: 2 ml/min, eluent: bufor 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), zawierający 50 mM NaCl i 10 mM BME; zbierano frakcje o objętości 3 ml.

- DEAE-Sepharose (1,5 x 20 cm), przepływ: 1 ml/min, eluent: bufor Tris-HCl, pH 8,0; stosowano gradient NaCl od 50 do 250 mM, przez 120 minut; zbierano frakcje o objętości 1 ml. Frakcje wykazujące aktywność aminopeptydaz eluowały przy stężeniu soli 125-190 mM.
- Sephacryl HR 300 (1,5 x 50 cm), przepływ: 0,2 ml/min, eluent: bufor 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), zawierający 50 mM NaCl i 10 mM BME; zbierano frakcje o objętości 1 ml.
- Macro Prep High Q (1,5 x 20 cm), przepływ: 1 ml/min, eluent: bufor Tris-HCl o pH 8,0, stosowano gradient NaCl od 0 do 300 mM, przez 200 minut; zbierano frakcje o objętości 1 ml. Frakcje wykazujące aktywność aminopeptydaz eluowały przy stężeniu soli 130-165 mM.

Zebrane frakcje analizowano pod kątem stężenia białka (metodą Bradforda) i aktywności enzymatycznej. Oznaczenie aktywności przeprowadzono według metody opisanej w podrozdziale 4.3, stosując jako substrat Leu-*p*NA, o końcowym stężeniu w próbce 1,3 mM (roztwór 40 mM, 25  $\mu$ l) oraz dodając 25  $\mu$ l analizowanej próbki. Całkowita objętość analizowanej mieszaniny wynosiła 1 ml.

#### 4.4.1. *Oszacowanie masy molekularnej otrzymanego białka*

Wyznaczenie masy molekularnej białek otrzymanych po poszczególnych etapach oczyszczania dokonano poprzez kombinację dwóch metod elektroforetycznych: NATVE-PAGE i barwienia enzymatycznego oraz SDS-PAGE. W pierwszym etapie przeprowadzono pionową elektroforezę natywną (NATIVE-PAGE) w 7,5% żelu poliakrylamidowym. Dziesięć próbek białka o stężeniu 2 mg/ml i objętości 30  $\mu$ l zaaplikowano do dziesięciu dołków żelu. Elektroforezę prowadzono przy stałym napięciu 60 V przez pierwsze 15 minut (wnikanie białek do żelu zatężającego), a następnie przy 120 V przez 1 h (migracja białek w żelu rozdzielającym). W celu uniknięcia temperaturowej denaturacji białek, komorę do elektroforezy umieszczono w łaźni z wodą z lodem, utrzymując temperaturę nieprzekraczającą 5°C. Po elektroforezie żel pocięto wzdłuż na dziesięć pasek, odpowiadających porcjom nałożonego białka. Pasek nr 1 inkubowano w 50 mM buforze Tris-HCl (pH 8,0), zawierającym Leu-*p*NA, o stężeniu 5 mM. Pasek nr 2 inkubowano w tym samym buforze zawierającym Ala-*p*NA, o stężeniu 5 mM. Barwienie enzymatyczne prowadzono przez 30 min, w temperaturze pokojowej. Trzeci pasek żelu barwiono z użyciem roztworu Comassie Brilliant Blue G-250 przez 1 h, w celu wykrycia wszystkich białek. Odbarwienie paska nr 3 przeprowadzono mieszaniną metanol - kwas octowy - woda (10:7:83). Pozostałe paski żelu (4-10) pocięto na fragmenty odpowiadające poszczególnym grupom prążków zwizualizowanych na pasku nr 3. Dokonano ekstrakcji białek z żelu. Pocięte fragmenty żelu umieszczono w próbkach wirówkowych o objętości 2 ml. Zalano 1 ml 50 mM buforu Tris-HCl (pH 8,0). Zawartość probówek mieszano przez noc w temperaturze pokojowej. Próbkę odwirowano, a supernatant zawierający białka zebrano. Żel przemywano jeszcze dwukrotnie świeżymi porcjami buforu (po 0,5 ml). Supernatanty

połączono i zateżono do 100 µl, wykorzystując probówki filtracyjne Amicon®Ultra4 (NMWL 30kDa) firmy Merck.

Tak otrzymane białka poddano elektroforezie pionowej w warunkach denaturujących (SDS-PAGE), w 12% żelu poliakrylamidowym. W jednym z dołków umieszczono standard białkowy o zakresie mas od 10-250 kDa, firmy Bio Rad. Elektroforezę prowadzono przy stałym napięciu 60 V przez pierwsze 15 minut (wnikanie białek do żelu zateżającego), a następnie przy 130 V przez 1,5 h (migracja białek w żelu rozdzielającym). Po elektroforezie, białka wybarwiono, inkubując żel w roztworze Coomassie Brilliant Blue G-250, przez 1 h. Następnie żel odbarwiano mieszaniną metanol - kwas octowy - woda (10:7:83). Na podstawie współczynników retencji i wzorca mas określono masę molekularną wyizolowanego enzymu.

#### 4.4.2. Wyznaczanie punktu izoelektrycznego

Do oczyszczonego białka dodano glicerynę (1:1 v/v), a następnie nałożono na żel do ogniskowania izoelektrycznego (pH 5-8), firmy BioRad, wraz ze standardem IEF zawierającym mieszaninę dziewięciu protein o pI od 4,6 do 9,3, firmy Sigma-Aldrich. Bufor katodowy stanowił 50 mM roztwór NaOH, bufor anodowy: 7 mM roztwór H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. Warunki elektroforezy: 100 V przez 1 h, 250 V przez 1 h, 500 V przez 30 min.

Do wybarwienia żelu stosowano następujące roztwory:

- A - 0,2% wodny r-r CuSO<sub>4</sub> + 20% lodowatego kwasu octowego;
- B - 60% roztwór metanolu w wodzie;
- C - 0,4% roztwór Coomassie Brilliant Blue R-350 w roztworze B.

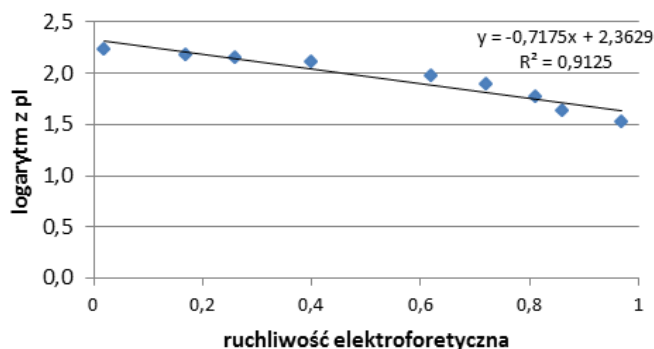
Procedura barwienia obejmowała kolejno:

- 1) Kondycjonowanie żelu w 20% roztworze kwasu trichlorooctowego w wodzie, przez 10 min.
- 2) Przemycanie roztworami A + B w proporcji 1:1, przez 2 min.
- 3) Barwienie w mieszaninie roztworów A i C (w stosunku 1:1) przez 15 min, w temperaturze 50°C.
- 4) Odbarwianie mieszaniną A + B (1:1).
- 5) Utrwalanie w roztworze wodnym zawierającym 5% glicerolu i 10% kwasu octowego.

Na podstawie współczynników ruchliwości elektroforetycznej dla wzorców (tabela 10) sporządzono wykres zależności ruchliwości białek od logarytmu punktu izoelektrycznego (rysunek 4).

Tab.10. Współczynniki ruchliwości elektroforetycznej dla wzorców białkowych

| Białko         | Trypsynogen | Lektyna z soczewicy I | Lektyna z soczewicy II | Lektyna z soczewicy III | Mioglobina | Ludzka anhidraza węglanowa | Wołowa anhidraza węglanowa | $\beta$ -lactoglobulina | Inhibitor trypsyny |
|----------------|-------------|-----------------------|------------------------|-------------------------|------------|----------------------------|----------------------------|-------------------------|--------------------|
| pI             | 9,3         | 8,8                   | 8,6                    | 8,2                     | 7,2        | 6,6                        | 5,9                        | 5,1                     | 4,6                |
| R <sub>f</sub> | 0,02        | 0,17                  | 0,26                   | 0,40                    | 0,62       | 0,72                       | 0,81                       | 0,86                    | 0,97               |



Rys.4. Wykres zależności ruchliwości białek wzorca od logarytmu punktu izoelektrycznego

#### 4.4.3. Wyznaczanie $K_m$ i $V_{max}$

Parametry kinetyczne zostały wyznaczone dla aminopeptydaz z użyciem substratu Leu-*p*NA oraz Phe-*p*NA. Przygotowano osiem roztworów Leu-*p*NA, o stężeniach od 0,026 do 1,30 mM oraz osiem roztworów Phe-*p*NA, o stężeniach od 0,026 do 0,780 mM. Aktywność enzymatyczną mierzono spektrofotometrycznie, zgodnie z procedurą opisaną w rozdziale 4.3. W oznaczeniu użyto 25  $\mu$ l oczyszczonego białka, 25  $\mu$ l substratu rozpuszczonego w DMSO, całkowita objętość próbki wynosiła 1 ml. Na podstawie otrzymanych wyników absorbancji, obliczono wartości  $K_m$  i  $V_{max}$  stosując program Hyper32.

#### 4.4.4. Wyznaczanie stabilności termicznej enzymu oraz określenie zależności aktywności od temperatury

Stabilność termiczną badanego enzymu wyznaczono dla temperatur: 25, 30, 35, 37, 40, 45, 50, 55°C. Enzym inkubowano w danej temperaturze przez 15, 30, 45 i 60 min, po czym określano jego aktywność, stosując 1,3 mM roztwór Phe-*p*NA jako substrat, według procedury opisanej w rozdziale 4.3. W celu wyznaczenia zależności aktywności badanego enzymu od temperatury, enzym inkubowano przez 10 min w 50 mM buforze PBS, w określonej temperaturze (25-65°C), a następnie analizowano jego aktywność z zastosowaniem 1,3 mM roztworu Phe-*p*NA jako substratu, według procedury opisanej w rozdziale 4.3.

#### 4.4.5. Określenie zależności aktywności aminopeptydaz od pH

Wpływ pH na aktywność aminopeptydaz badano stosując następujące bufony: octanowo sodowy (pH 5,0 i 5,5), PBS (pH 6,0, 6,5 i 7,0), Tris-HCl (pH 7,5, 8,0 i 8,5) oraz węglanowy ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  -  $\text{NaHCO}_3$ ) (pH 9,0, 9,5 i 10,0). Aktywność hydrolityczną oznaczano w temperaturze 37°C, stosując jako substraty 1,3 mM roztwory Ala-*p*NA, Leu-*p*NA lub Phe-*p*NA, według procedury opisanej w rozdziale 4.3.

#### 4.4.6. Badanie wpływu wybranych jonów metali

Zbadano wpływ następujących jonów metali:  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Na}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  i  $\text{Zn}^{2+}$  na aktywność aminopeptydaz z nasion rzepaku. Stosowano roztwory wodne soli:  $\text{AlCl}_3$ ,  $\text{BaCl}_2$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{CdCl}_2$ ,  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{FeSO}_4$ ,  $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{MnCl}_2 \cdot 14\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NaCl}$ ,  $\text{NiCl}_2$ ,  $\text{ZnCl}_2$ , o końcowym stężeniu w analizowanej próbce odpowiednio 0,1 i 1 mM. Enzym (stężenie białka w próbce wynosiło 0,02 mg/ml) był inkubowany w 50 mM buforze PBS (pH 7,0), z dodatkiem danej soli metalu przez 2 godziny, w temperaturze 4°C. Wykonano próbę kontrolną w tych samych warunkach, bez dodatku soli. Aktywność aminopeptydaz oznaczono stosując 1,3 mM Phe-*p*NA jako substrat, według procedury opisanej w rozdziale 4.3.

#### 4.4.7. Określenie wpływu wybranych inhibitorów na aktywność aminopeptydaz rzepaku

Enzym (stężenie białka w próbce wynosiło 0,02 mg/ml) inkubowano w roztworach EDTA, EGTA, 1,10-fenantroliny, bestatyny, E-64 i PMSF w 30°C, przez 30 min. Wykonano także próbę kontrolną bez dodatku inhibitora. Stosowane stężenia inhibitorów (dobrane na podstawie literatury<sup>36,160</sup> i eksperymentalnie) podano w tabeli nr 11.

Tab.11. Inhibitory i ich stężenie stosowane w badaniach

| Inhibitor         | Stężenie [mM] |
|-------------------|---------------|
| EDTA              | 33            |
|                   | 10            |
|                   | 1             |
| EGTA              | 10            |
| 1,10-fenantrolina | 10            |
| PMSF              | 4             |
|                   | 2             |
| Bestatyna         | 0,1           |
|                   | 0,025         |
| E-64              | 0,1           |

## **4.5. Wyznaczenie profilu aktywności aminopeptydaz w pierwszych godzinach rozwoju siewek rzepaku oraz charakterystyka enzymów**

### *4.5.1. Warunki uprawy rzepaku*

Zastosowana metoda uprawy opierała się na procedurze opisanej w literaturze dla jęczmienia<sup>161</sup> i została zaadaptowana do szybkości wzrostu siewek rzepaku. Nasiona rzepaku ozimego odmiany Bellevue (50 g), poddano sterylizacji w 1% roztworze chloranu(I) sodu, przez 15 minut. Następnie nasiona były przepłukiwane wodą destylowaną, aż do otrzymania pH 7,0. W celu uzyskania pełnej imbibicji, nasiona rzepaku zalano wodą destylowaną na 24 h. Tak otrzymane nasiona wysiano na płytki Petriego wyłożone ligniną. Rośliny kiełkowały przez 48 h w ciemności. Następnie siewki rzepaku przeniesiono do pomieszczenia o stałych warunkach temperatury (26°C) i wilgotności (65%), oświetlanego dwoma lampami (moc 2 x 600 W), w trybie 16 h światła i 8 h ciemności. W takich warunkach rośliny były hodowane do 144 godziny wzrostu.

### *4.5.2. Przygotowanie ekstraktów białkowych*

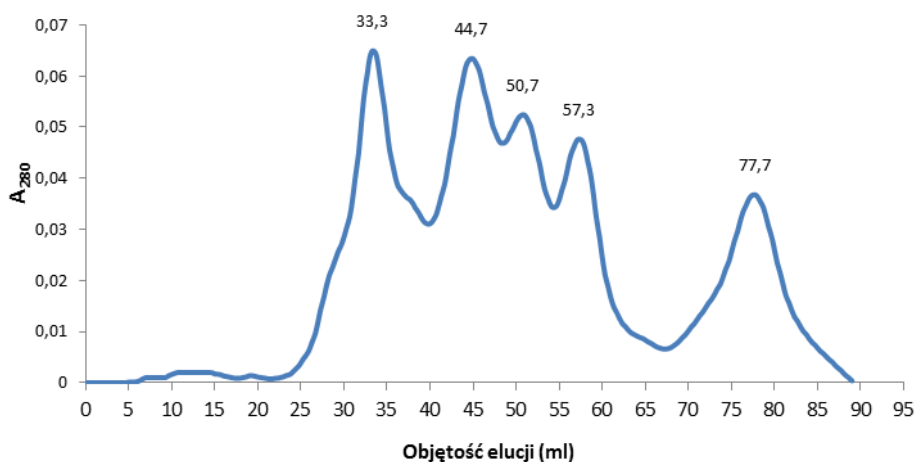
Ekstrakty białkowe przygotowano z rzepaku na różnym stopniu rozwoju: suche ziarna, nasiona moczone przez, 6, 12 i 24 h. Następnie, po wysianiu, próbki pobierano co 24 h, aż do szóstej doby uprawy. Materiał roślinny zbierany był w porcjach po 0,6 g i zamrażany w temperaturze -80°C. Próbkę roślinną były homogenizowane w zimnym mrożdzierzu, z 5 ml 50 mM buforu PBS (pH 7,0), z 0,1 M dodatkiem NaCl. Następnie do homogenatu dodano 0,1% Triton X-100, a próbkę poddano homogenizacji w homogenizatorze Pottera (przez 3 min). Po homogenizacji próbki inkubowano przez 20 min w lodzie, a następnie odwirowano (10000 rpm (11984 rcf), 10 min, 4°C). Supernatant przeniesiono do osobnej probówki, a pozostały osad rozpuszczono w świeżej porcji buforu (4 ml) i ponownie odwirowano. Połączone supernatanty wysolono do 35% siarczanem amonu. Próbkę odwirowano (10000 rpm (11984 rcf), 10 min, 4°C), osad odrzucono, a supernatant wysolono do 65% siarczanem(VI) amonu. Próbkę odwirowano (10000 rpm (11984 rcf), 20 min, 4°C). Supernatant odrzucono a osad rozpuszczono w 4 ml 50 mM buforu PBS (pH 7,0), z dodatkiem 0,1 M NaCl. Tak przygotowany ekstrakt posłużył dalej do oznaczania aktywności aminopeptydaz, zawartości białka i innych badań.

Oznaczenie stężenia białka i aktywności wykonano zgodnie z procedurami podanymi w rozdziale 4.3. Objętość ekstraktu białkowego użytego w pojedynczym oznaczeniu to 25 µl. Oznaczenia aktywności wykonano wobec wszystkich sześciu substratów, o ostatecznym stężeniu w próbce 3 mM.

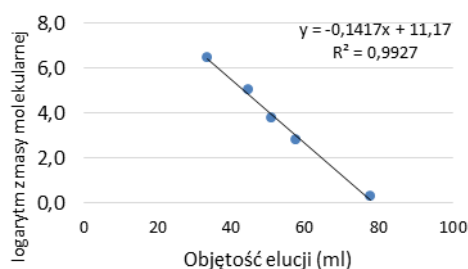
#### 4.5.3. Oszacowanie masy molekularnej

Oznaczenie masy molekularnej aminopeptydaz z siewek rzepaku wykonano za pomocą dwóch metod: filtracji żelowej oraz elektroforezy SDS-PAGE.

Filtracja żelowa: Ekstrakt białkowy z roślin po 120 h uprawy został zateżony w probówkach Amicon®Ultra 4 (NMWL 30kDa) firmy Merck, do objętości 0,5 ml. Próbkę nałożono na kolumnę (1 x 50 cm) wypełnioną złożem Sephacryl HR 300. Jako eluentu użyto 50 mM buforu PBS (pH 7,0), z dodatkiem 0,1 M NaCl. Przepływ eluentu wynosił 0,2 ml/min. Zbierano frakcje o objętości 1 ml. Aktywność aminopeptydaz w poszczególnych frakcjach oznaczano spektrofotometrycznie, z użyciem trzech substratów: Leu-pNA, Phe-pNA oraz Pro-pNA, o końcowym stężeniu w próbce 1 mM. Jako wzorców użyto mieszaninę standardów białkowych o znanych masach molekularnych: tyreoglobuliny wołowej (670 kDa),  $\gamma$ -globuliny wołowej (158 kDa), albuminy jaja kurzego (44 kDa), mioglobiny końskiej (17 kDa) i witaminy B<sub>12</sub> (1,35 kDa). Profil elucji wzorców przedstawiono na rysunku 5. Na jego podstawie sporządzono wykres zależności logarytmu masy molekularnej białek wzorca od objętości elucji, wyrażonej w ml (rysunek 6).



Rys.5. Profil elucji standardów mas molekularnych



Rys.6. Wykres zależności logarytmu masy molekularnej wzorców białkowych od objętości elucji

Elektroforeza SDS-PAGE: Aktywne frakcje po filtracji żelowej zatężono i naniesiono na 12% żel do pionowej elektroforezy SDS-PAGE, stosując jako wzorzec masy Precision Plus Protein Dual Xtra Standards firmy Bio Rad, zawierający 12 białek o różnych masach. Elektroforezę prowadzono przy stałym napięciu 60 V przez pierwsze 15 minut (wnikanie białek do żelu zatężającego), a następnie przy 130 V przez 1,5 h (migracja białek w żelu rozdzielającym). Po elektroforezie, białka wybarwiono, inkubując żel w roztworze Comassie Brilliant Blue G-250, przez 1 h. Następnie żel odbarwiano mieszaniną metanol - kwas octowy - woda (10:7:83).

#### *4.5.4. Wyznaczanie zależności aktywności od temperatury*

Dla aminopeptydaz z siewek uprawianych przez 120 h wyznaczono optimum temperaturowe. Ekstrakty białkowe inkubowano przez 10 minut w temperaturze z zakresu 25-65°C, w 50 mM buforze PBS (pH 7,0). Oznaczenie aktywności przeprowadzono zgodnie z procedurą opisaną w rozdziale 4.3, stosując jako substraty Ala-*p*NA, Leu-*p*NA, Phe-*p*NA oraz Pro-*p*NA, o stężeniu 1 mM w analizowanej próbce.

#### *4.5.5. Wyznaczanie zależności aktywności od pH*

Dla aminopeptydaz z siewek uprawianych przez 120 h, wyznaczono optimum pH. Oznaczenia aktywności przeprowadzono zgodnie z procedurami opisanymi w rozdziale 4.3, stosując jako substraty Ala-*p*NA, Leu-*p*NA i Phe-*p*NA, w dwóch stężeniach: 1 i 3 mM. Stosowano następujące bufony: octanowo sodowy (pH 5,0 i 5,5), PBS (pH 6,0, 6,5 i 7,0), Tris-HCl (pH 7,5, 8,0 i 8,5) oraz węglanowy (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-NaHCO<sub>3</sub>) (pH 9,0, 9,5 i 10,0).

#### *4.5.6. Badanie wpływu wybranych jonów metali*

Do badań nad wpływem wybranych jonów metali na aktywność aminopeptydaz w ekstraktach białkowych z siewek rzepaku, uprawianych przez 120 h, użyto następujących soli nieorganicznych CaCl<sub>2</sub>, CdCl<sub>2</sub>, CoCl<sub>2</sub>, CrCl<sub>2</sub>, CuCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, FeSO<sub>4</sub>, MgCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub>·14H<sub>2</sub>O, NiCl<sub>2</sub> i ZnCl<sub>2</sub>. Ekstrakt białkowy był inkubowany przez 1 h, w temperaturze 4°C, w 50 mM buforze PBS (pH 7,0), z 0,1 mM dodatkiem soli metalu. Przygotowano również próbę kontrolną bez dodatku jonów metalu. Aktywność wyznaczono z użyciem trzech substratów Ala-*p*NA, Phe-*p*NA oraz Pro-*p*NA, o końcowym stężeniu 1 mM w próbce, zgodnie z procedurą opisaną w rozdziale 4.3.

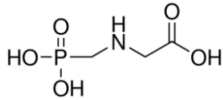
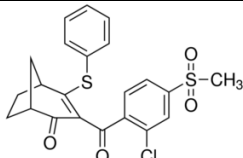
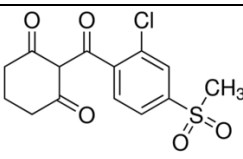
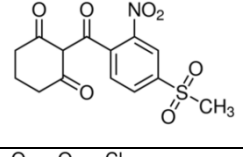
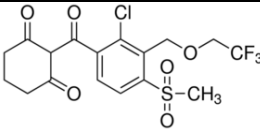
#### *4.5.7. Badanie wpływu wybranych herbicydów*

Nazwy zwyczajowe herbicydów, użytych w badaniach, wraz ze strukturą i stosowanym stężeniem przedstawiono w tabeli 12. Ekstrakt białkowy (z siewek rzepaku ozimego uprawianych przez 120 h), inkubowano z każdym z pestycydów przez 1 h, w 4°C. Następnie aktywność



aminopeptydaz zmierzono spektrofotometrycznie, z użyciem trzech substratów Ala-*p*NA, Phe-*p*NA oraz Pro-*p*NA o końcowym stężeniu 1 mM w próbce, zgodnie z procedurą opisaną w rozdziale 4.3.

Tab.12. Struktury chemiczne i stężenia stosowanych herbicydów

| Nazwa zwyczajowa (skrót) | Struktura chemiczna   | Stosowane stężenie (μM) | Maximum absorpcji UV/VIS             |
|--------------------------|---|-------------------------|--------------------------------------|
| Glifosat                 |    | 1000                    | 290 nm <sup>154</sup>                |
| Benzobicyklon            |    | 0,56                    | b.d.                                 |
| Sulkotrion (SUL)         |    | 500                     | 285, 283,5 i 259 nm <sup>154</sup>   |
| Mezotrion (MES)          |   | 100                     | 256 nm <sup>154</sup>                |
| Tembotrion (TEMB)        |  | 500                     | 203, 232, 284 i 291nm <sup>154</sup> |

b.d – brak danych

#### 4.6. Badanie wpływu wybranych czynników na aktywność aminopeptydaz w siewkach rzepaku

Uprawę rzepaku prowadzono zgodnie z metodą opisaną w punkcie 4.5.1. Standardowo uprawę prowadzono w trybie: 24 h imbibicji + 144 h kiełkowania. Wszelkie zaistniałe odstępstwa były bezpośrednio związane z badanym czynnikiem i zostały przedstawione w tabeli 13.

Tab.13. Zestawienie wybranych czynników stosowanych na siewkach rzepaku ozimego

| <b>Czynnik</b>  | <b>Modyfikacja uprawy</b>  |
|---|--|
| niska temperatura   | Siewki poddano działaniu niskiej temperatury (4°C) w 5 i 6 dobie wzrostu, przez odpowiednio 0,5, 1, 2,5 lub 5 h (przeniesienie hodowli do lodówki).  |
| ograniczony dostęp do światła                                     | Próba kontrolna rosła w świetle przez 96 h zgodnie z procedurą ogólną. Próby (1-3) przebywały w świetle o 24, 48 i 72 h krócej. Ostatnia próbka (4) była uprawiana tylko w warunkach zaciemnienia.   |
| jasmonian metylu (MeJA)   | Siewki rzepaku podzielono na dwie grupy, jedną podlewano w 5, a drugą w 6 dobie uprawy, 15 ml roztworu MeJA o stężeniu 100 µM. (Ze względu na trudną rozpuszczalność MeJA w wodzie, roztwór zawierał dodatek metanolu nie przekraczający 5%). Rośliny zebrano w 7 dobie. |
| kwas abscysynowy (ABA)  | Siewki rzepaku podzielono na dwie grupy, jedną podlewano w 5, a drugą w 6 dobie uprawy, 15 ml roztworu ABA o stężeniu 500 µM. Rośliny zebrano w 7 dobie.   |
| H <sub>3</sub> BO <sub>4</sub>                                    | Siewki rzepaku podlewano raz dziennie, od drugiej doby uprawy, roztworami kwasu o stężeniach: 0,3, 1,5, 3, 15 i 30 mM. Rośliny zebrano po 144 h uprawy.  |
| Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> ·10H <sub>2</sub> O | Siewki rzepaku podlewano raz dziennie, od drugiej doby uprawy, roztworami soli o stężeniach: 0,3, 1,5, 3, 15 i 30 mM. Rośliny zebrano po 144 h uprawy.   |
| CaCl <sub>2</sub>   | Siewki rzepaku podlewano raz dziennie, od drugiej doby uprawy, roztworami soli o stężeniach: 0,3, 1,5, 3, 15 i 30 mM. Rośliny zebrano po 144 h uprawy.   |
| CdCl <sub>2</sub>   | Siewki rzepaku podlewano raz dziennie, od drugiej doby uprawy, roztworami soli o stężeniach: 0,3, 1,5, 3, 15 i 30 mM. Rośliny zebrano po 144 h uprawy.   |
| CuCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O                              | Siewki rzepaku podlewano raz dziennie, od drugiej doby, roztworami soli o stężeniach: 0,3, 1,5, 3, 15 i 30 mM. Rośliny zebrano po 144 h uprawy. Eksperyment powtórzono stosując stężenia soli: 0,03, 0,15, 0,3, 1,5 i 3 mM.  |
| FeCl <sub>3</sub>   | Siewki rzepaku podlewano raz dziennie, od drugiej doby uprawy, roztworami soli o stężeniach: 0,3, 1,5, 3, 15 i 30 mM. Rośliny zebrano po 144 h uprawy.   |
| HgCl <sub>2</sub>   | Siewki rzepaku podlewano raz dziennie, od drugiej doby uprawy, roztworami soli o stężeniach: 0,3, 1,5, 3, 15 i 30 mM. Rośliny zebrano po 144 h uprawy.   |
| KCl   | Siewki rzepaku podlewano raz dziennie, od drugiej doby uprawy, roztworami soli o stężeniach: 0,3, 1,5, 3, 15 i 30 mM. Rośliny zebrano po 144 h uprawy.   |
| MgCl <sub>2</sub>   | Siewki rzepaku podlewano raz dziennie, od drugiej doby uprawy, roztworami soli o stężeniach: 0,3, 1,5, 3, 15 i 30 mM. Rośliny zebrano po 144 h uprawy.   |
| MnCl <sub>2</sub> ·14H <sub>2</sub> O                             | Siewki rzepaku podlewano raz dziennie, od drugiej doby uprawy, roztworami soli o stężeniach: 0,3, 1,5, 3, 15 i 30 mM. Rośliny zebrano po 144 h uprawy.   |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub>   | Siewki rzepaku podlewano raz dziennie, od drugiej doby uprawy, roztworami soli o stężeniach: 0,3, 1,5, 3, 15 i 30 mM. Rośliny zebrano po 144 h uprawy.   |
| NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>                                   | Siewki rzepaku podlewano raz dziennie, od drugiej doby uprawy, roztworami soli o stężeniach: 0,3, 1,5, 3, 15 i 30 mM. Rośliny zebrano po 144 h uprawy.   |
| NiCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O                              | Siewki rzepaku podlewano raz dziennie, od drugiej doby uprawy, roztworami soli o stężeniach: 0,3, 1,5, 3, 15 i 30 mM. Rośliny zebrano po 144 h uprawy.   |
| NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                    | Siewki rzepaku podlewano raz dziennie, od drugiej doby uprawy, roztworami soli o stężeniach: 0,3, 1,5, 3, 15 i 30 mM. Rośliny zebrano po 144 h uprawy.   |
| Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>                                 | Siewki rzepaku podlewano raz dziennie, od drugiej doby uprawy, roztworami soli o stężeniach: 0,3, 1,5, 3, 15 i 30 mM. Rośliny zebrano po 144 h uprawy.   |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>                   | Siewki rzepaku podlewano raz dziennie, od drugiej doby uprawy, roztworami soli o stężeniach: 0,3, 1,5, 3, 15 i 30 mM. Rośliny zebrano po 144 h uprawy.   |
| ZnCl <sub>2</sub>   | Siewki rzepaku podlewano raz dziennie, od drugiej doby uprawy, roztworami soli o stężeniach: 0,3, 1,5, 3, 15 i 30 mM. Rośliny zebrano po 144 h uprawy.   |

Przygotowanie ekstraktów białkowych wykonano zgodnie z metodą opisaną w punkcie 4.5.2. Próbkę roślinną były homogenizowane w zimnym moździerzu z dodatkiem 4 ml 50 mM buforu PBS (pH 7,0), z 0,1 M dodatkiem NaCl.

Oznaczenie aktywności wykonano zgodnie z procedurami podanymi w punkcie 4.3., stosując wszystkie sześć substratów, o końcowym stężeniu w próbce 1 mM oraz 100 µl ekstraktu białkowego.

*Przeliczenie dawek danego mikro-, makroelementu i metalu ciężkiego na kg/ha*

Standardowa płytka Petriego ma średnicę około 9 cm, co odpowiada polu powierzchni równemu  $\approx 63,6 \text{ cm}^2$ . Rośliny podlewano po 20 ml danego roztworu przez 5 dni, co daje całkowitą objętość 100 ml. Przykładowe przeliczenie dawki siarki dla 30 mM roztworu  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ :

$$\begin{array}{r} 30 \text{ mM} \cdot 1000 \text{ ml} \\ x \text{ mM} - 100 \text{ ml} \\ \hline x = 3 \text{ mM (całkowita dawka } (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4) \end{array}$$

$$\begin{array}{r} 32 \text{ g} - 1000 \text{ mM siarki} \\ x \text{ g} - 3 \text{ mM siarki} \\ \hline x = 0,096 \text{ g (całkowita dawka siarki)} \end{array}$$

$$\begin{array}{r} 0,096 \text{ g} - 63,6 \text{ cm}^2 \text{ (powierzchnia płytki Petriego)} \\ x \text{ g} - 100000000 \text{ cm}^2 \text{ (1 ha)} \\ \hline x = 150943,4 \text{ g/ha} \approx 150,9 \text{ kg/ha całkowita dawka siarki} \end{array}$$

**4.7. Badanie wpływu wybranych węglowodorów aromatycznych, benzyny i oleju napędowego, na aktywność aminopeptydaz siewek rzepaku**

*4.7.1. Tryb i warunki uprawy*

Nasiona rzepaku po uprzedniej sterylizacji i namaczaniu w wodzie destylowanej przez 24 h wysiewano w ilości ok. 100 ziaren, do naczyń wypełnionych 100 g ziemi uniwersalnej. Siewki rzepaku rosły w pomieszczeniu o stałych warunkach temperatury (26°C) i wilgotności (65%), oświetlanego dwoma lampami (600 W), w trybie 16 h światła i 8 h ciemności.

W eksperymencie zbadano wpływ benzenu, naftalenu, antracenu, fenantrenu, benzyny bezołowiowej (95) oraz oleju napędowego. Stosowano 2,5, 5 i 10% dodatek tych substancji, w stosunku do masy stosowanej ziemi uniwersalnej.

Rośliny zebrano po 14 dniach uprawy. Dla kontroli oraz dla większości eksperymentów określono wzrost rzepaku na poziomie BBCH 10 w 14 dniu (dzień zbioru). Przygotowanie ekstraktów białkowych wykonano zgodnie z metodą opisaną w punkcie 4.5.2.

#### 4.7.2. Oznaczenie aktywności aminopeptydaz

Aktywność aminopeptydaz oznaczono spektrofotometrycznie, z użyciem czytnika mikroplitek SpectraMax i3x firmy Molecular Devices. Próba ślepa zawierała: 97,5 µl buforu PBS, pH 7,0 + 2,5 µl substratu. Próbkę analizowaną zawierała: 87,5 µl buforu PBS pH 7,0 + 2,5 µl substratu + 10 µl ekstraktu białkowego. Oznaczenia prowadzono w temperaturze 37°C. Pozostałe parametry programu pracy czytnika podano w tabeli 14. Stężenie białka oznaczano zgodnie z procedurą opisaną w rozdziale 4.3.

Tab.14. Parametry stosowane przy pomiarach z zastosowaniem czytnika mikroplitek SpectraMax i3x

|                             |                                 |
|-----------------------------|---------------------------------|
| Kinetyczny pomiar absorpcji | $\lambda = 405 \text{ nm}$      |
| Czas                        | 10 min                          |
| Interwał                    | 00:05:00                        |
| Odczyty                     | 3 (0 min, 5 min i 10 min)       |
| Rodzaj płytki               | standardowa 96-dołkowa płytka   |
| Mieszanie                   | wstępne: 5 s, linearne, szybkie |
| Odczyt                      | kolumnowy                       |

### 4.8. Badanie wpływu zakażenia grzybami chorobotwórczymi na aktywność aminopeptydaz w siewkach rzepaku

#### 4.8.1. Tryb i warunki uprawy

Uprawę rzepaku prowadzono w szklarni Instytutu Ochrony Roślin oddział Sońnicowice, pod opieką merytoryczną dr Agnieszki Mączyńskiej. Przed przystąpieniem do uprawy, przygotowywano inokulum czterech gatunków grzybów na nasionach pszenicy. Patogenami użytymi w eksperymencie były cztery gatunki grzybów wywołujących zgorzel siewek:

- *Pythium Aristosporum*
- *Rhizoctonia cerealis*
- *Rhizoctonia solani*
- *Fusarium culmorum*

Przygotowanie inokulum: Szczepy grzybów hodowano osobno na szalkach Petriego (średnica 9 cm). 1 kg pszenicy zalano 400 ml wody na 24 h. Nasiona sterylizowano dwukrotnie w autoklawie przez 1 h, w temperaturze 120°C, w odstępie 24 h. Nasiono zainfekowano grzybami, a następnie mieszano raz w tygodniu w celu wyrównania procesu zarodnikowania w całej objętości nasion. Proces prowadzono przez 6 tygodni, w temperaturze pokojowej, w świetle dziennym.

Uprawa: Przygotowano 10 litrów podłoża (ziemia uniwersalna + perlit, w stosunku 1:1) z poszczególnymi szczepami poprzez wymieszanie z inokulum (75 ml). Kontrolę stanowiła ziemia bez żadnych dodatków. Do 60-cio dołkowych wielodoniczek z odprowadzeniem wody, wprowadzono do połowy wysokości dołka przygotowane podłoże (po 2 wielodoniczki dla każdej odmiany grzyba i 2 dla kontroli). W każdym dołku umieszczono po jednym nasionku rzepaku i zasypano podłożem do brzegów dołka. Podlano i pozostawiono w szklarni. Siewki rzepaku rosły w kontrolowanych warunkach. Średnia dobową temperatura podczas uprawy wynosiła 16°C, a średnia wilgotność około 67%. Rośliny podlewano wodą wodociągową.

Zbiór: Eksperyment przerwano po 33 lub po 47 dniach uprawy. W obu przypadkach rośliny znajdowały się w stadium wzrostu BBCH 15 czyli fazy 5 liścia. Zliczono ilość wykiełkowanych siewek rzepaku. Rośliny zebrano w całości. Korzenie, wypłukano w wodzie destylowanej w celu usunięcia podłoża. Następnie krótko osuszono z nadmiaru wody na ręczniku papierowym. Przygotowano próbki zawierające osobno korzenie, części zielone i całe siewki rzepaku. Próbki zważono i umieszczono w osobnych woreczkach strunowych, a następnie zamrożono w temperaturze -80°C. W tabeli 15 podano masy zebranych próbek.

Tab.15. Masy zebranych próbek roślin rzepaku [g] z eksperymentu z zakażeniem grzybami chorobotwórczymi

| <b>Zbiór po 33 dniach</b> |          |     |                             |     |                             |     |                           |     |                          |     |  |
|---------------------------|----------|-----|-----------------------------|-----|-----------------------------|-----|---------------------------|-----|--------------------------|-----|--|
|                           | Kontrola |     | <i>Pythium Aristosporum</i> |     | <i>Rhizoctonia cerealis</i> |     | <i>Rhizoctonia solani</i> |     | <i>Fusarium culmorum</i> |     |  |
| Całe siewki               | 2,6      | 2,3 | 2,6                         | 2,4 | 2,4                         | 2,4 | 2,5                       | 2,4 | 2,5                      | 2,5 |  |
| Części zielone            | 2,4      | 2,4 | 2,4                         | 2,4 | 2,0                         | 2,0 | 2,4                       | 2,4 | 2,4                      | 2,4 |  |
| Korzenie                  | 0,6      | 0,6 | 0,6                         | 0,6 | 0,6                         | 0,6 | 0,6                       | 0,6 | 0,6                      | 0,6 |  |
| <b>Zbiór po 47 dniach</b> |          |     |                             |     |                             |     |                           |     |                          |     |  |
| Całe siewki               | 2,4      | 2,3 | 2,5                         | 2,4 | 2,4                         | 2,4 | 2,3                       | 2,3 | 2,5                      | 2,5 |  |
| Części zielone            | 2,4      | 2,4 | 2,4                         | 2,4 | 2,2                         | 2,2 | 2,4                       | 2,4 | 2,4                      | 2,4 |  |
| Korzenie                  | 0,6      | 0,6 | 0,6                         | 0,6 | 0,6                         | 0,6 | 0,6                       | 0,6 | 0,6                      | 0,6 |  |

Przygotowanie ekstraktów białkowych wykonano zgodnie z metodą opisaną w punkcie 4.5.2, stosując proporcjonalnie do masy roślin większe ilości buforu i pozostałych odczynników.

#### 4.8.2. Oznaczenie aktywności aminopeptydaz

Aktywność aminopeptydaz oznaczono spektrofotometrycznie z użyciem czytnika mikroplótek SpectraMax i3x firmy Molecular Devices. Próba ślepa zawierała: 97,5 µl buforu PBS pH 7,0 + 2,5 µl substratu, natomiast próbki właściwe: 87,5 µl buforu PBS pH 7,0 + 2,5 µl substratu + 10 µl ekstraktu białkowego. Oznaczenia prowadzono w temperaturze 37°C. Pozostałe parametry pracy czytnika podano w tabeli 16. Stężenie białka oznaczono zgodnie z procedurą opisaną w rozdziale 4.3.

Tab.16. Parametry stosowane przy pomiarach z zastosowaniem czytnika mikroplótek SpectraMax i3x

|                             |                                 |
|-----------------------------|---------------------------------|
| Kinetyczny pomiar absorpcji | $\lambda = 405 \text{ nm}$      |
| Czas                        | 10 min                          |
| Interwał                    | 00:05:00                        |
| Odczyty                     | 3 (0 min, 5 min i 10 min)       |
| Rodzaj płytki               | standardowa 96-dołkowa płytka   |
| Mieszanie                   | wstępne: 5 s, linearne, szybkie |
| Odczyt                      | kolumnowy                       |

#### 4.9. Badanie wpływu wybranych fungicydów na aktywność aminopeptydaz rzepaku na etapie formowania się łuszczyn

##### 4.9.1. Warunki uprawy polowej

W czasie sezonu wegetacyjnego 2014/2015 w gminie Słupsk, w województwie śląskim, w warunkach polowych, przeprowadzono doświadczenie w układzie bloków losowych, złożone z czterech powtórzeń. Eksperyment prowadzono na poletkach wielkości 20 m<sup>2</sup>, w kształcie prostokąta, na terenie płaskim. Powierzchnia netto całego doświadczenia wynosiła 1040 m<sup>2</sup>. Skład mechaniczny gleby to piasek gliniasty, o zawartości materii organicznej na poziomie 1,9% i pH 6,5. Badaną uprawą był rzepak ozimy odmiany Hybribock F1. Przedplonem była pszenica ozima. Stosowano nawożenie zalecane dla tego typu uprawy. Kontrolę szkodników prowadzono z użyciem herbicydów i insektycydów rekomendowanych przez Instytut Ochrony Roślin, Państwowy Instytut Badawczy (IOR-PIB). W celu ochrony uprawy przed grzybem *Sclerotinia sclerotiorum* i chorobami łuszczyn, zastosowano trzy wybrane i dostępne handlowo fungicydy. Wszystkie badane związki są dopuszczone do użycia w Polsce. Fungicydy aplikowano w trzech różnych terminach, na różnych etapach rozwoju rzepaku, opisanych w skali BBCH.

#### 4.9.2. Terminy aplikacji fungicydów oraz dawki

Podstawowe informacje na temat stosowanych fungicydów, takie jak zawartość substancji aktywnych oraz terminy aplikacji czy dawka, przedstawiono w tabeli 17.

Tab.17. Zestawienie stosowanych w eksperymencie fungicydów wraz z ich podstawową charakterystyką oraz terminami aplikacji

| Fungicyd               | Producent                   | Substancje aktywne         | Zawartość substancji aktywnych | Termin aplikacji |
|------------------------|-----------------------------|----------------------------|--------------------------------|------------------|
| <b>Pictor 400 SC</b>   | BASF Crop Protection Polska | Dimoksytrobina + boskalid  | 100 g/ha +100 g/ha             | BBCH 59-61       |
|                        |                             |                            |                                | BBCH 63-65       |
|                        |                             |                            |                                | BBCH 67-69       |
| <b>Symetra 325 SC</b>  | Syngenta                    | Izopirazam + azoksytrobina | 125 g/ha +200 g/ha             | BBCH 59-61       |
|                        |                             |                            |                                | BBCH 63-65       |
|                        |                             |                            |                                | BBCH 67-69       |
| <b>Propulse 250 SE</b> | Bayer CropScience           | Protiokonazol + fluopyram  | 125 g/ha +125 g/ha             | BBCH 59-61       |
|                        |                             |                            |                                | BBCH 63-65       |
|                        |                             |                            |                                | BBCH 67-69       |

#### 4.9.3. Przygotowanie ekstraktów

Rośliny zostały zebrane na etapie BBCH 69-73 (koniec kwitnienia, 30% łuszczyn uzyskało właściwy rozmiar). Rośliny podzielono na kwiaty, liście, łodygi i łuszczyny. Każdą część roślinną zebrano osobno. Próbki po 10 g zamrożono w temperaturze -80°C, do czasu ich analizy. Próbki homogenizowano z 50 ml 50 mM buforu PBS (pH 7,0), z 0,1% dodatkiem Triton X-100. Po odwirowaniu (12208 ref, 30 min, 4°C), osad odrzucono, a supernatant zebrano i wysolono do 35% siarczanem(VI) amonu, a następnie mieszano przez 10 min. Po ponownym odwirowaniu (12208 ref, 30 min, 4°C), osad odrzucono, a supernatant wysolono siarczanem(VI) amonu do 65%. Ponownie mieszano wysolony ekstrakt przez 10 min, a następnie odwirowano (12208 ref, 30 min, 4°C), supernatant odrzucono, a osad rozpuszczono w 20 ml 50 mM buforu PBS (pH 7,0). Tak przygotowany ekstrakt białkowy posłużył do oznaczania aktywności aminopeptydaz i stężenia białka.

#### 4.9.4. Oznaczenie aktywności aminopeptydaz

Oznaczenie aktywności aminopeptydaz przeprowadzono tak jak opisano w rozdziale 4.3. Stosując wszystkie sześć substratów, o końcowym stężeniu 1 mM w próbce i dodając do próbki 100 µl ekstraktu białkowego. Dodatkowo stężenie białka w roztworach skontrolowano ponownie metodą spektrometrii podczerwieni (IR) korzystając z Direct Detect™ Quantitation System.

#### 4.9.5. Określenie wpływu badanych fungicydów na aktywność aminopeptydaz w ekstraktach białkowych próby kontrolnej

Ekstrakty białkowe z kwiatów, liści, łodyg i łuszczyń grupy kontrolnej przygotowano zgodnie z procedurą opisaną w punkcie 4.9.3. Fungicydy Pictor 400 SC, Propulse 250 SE i Symetra 325 SC rozpuszczono w DMSO. Stężenia poszczególnych substancji aktywnych podano w tabeli 18. Stężenia tak dobrano, by uzyskać całkowite rozpuszczenie fungicydów (ostatecznie stężenie składników aktywnych fungicydu w mieszaninie reakcyjnej wahało się od 0,1000 do maksymalnie 0,1425 mM).

Tab.18. Stężenia składników aktywnych stosowanych w badaniach kontrolnych nad wpływem fungicydów na aktywność aminopeptydaz rzepaku

| Fungicyd        | Substancja aktywna | Stężenie (mM) |
|-----------------|--------------------|---------------|
| Pictor 400 SC   | boscalid           | 4,0           |
|                 | dimoksystrobina    | 4,2           |
| Propulse 250 SE | fluopyram          | 4,0           |
|                 | protriokonazol     | 4,7           |
| Symetra 325 SC  | azoksystrobina     | 4,0           |
|                 | izopyrazam         | 5,7           |

Ekstrakty białkowe inkubowano z każdym z roztworów fungicydów, przez 1 h, w temperaturze pokojowej. Mieszanina zawierała 850  $\mu$ l 50 mM buforu PBS (pH 7,0), 100  $\mu$ l ekstraktu białkowego, 25  $\mu$ l roztworu fungicydu. Po jednej godzinie do mieszaniny dodano substrat (Leu-*p*NA, Phe-*p*NA lub Pro-*p*NA) w ilości 25  $\mu$ l (stężenie substratu w próbce wynosiło 1 mM). Pomiar aktywności przeprowadzono zgodnie z procedurą opisaną w punkcie 4.3.

#### 4.10. Analiza statystyczna

Analizę statystyczną dla większości badań przeprowadzono za pomocą programu Excel. Słupki błędów na rysunkach reprezentują odchylenia standardowe. Dane dotyczące różnic między aktywnością aminopeptydaz w całych siewkach, liścieniach i korzeniach zostały poddane wielokrotnemu porównaniu post-hoc średnich, za pomocą testu HSD Tukey'a ( $\alpha=0,05$ ). Różne litery powyżej słupków wskazują na istotne różnice między średnimi. Dla danych dotyczących wpływu jonów metali na aktywność aminopeptydazy przeprowadzono test t-studenta ( $n=3$ ), poprzedzony testem F, służącym do identyfikacji istotności. Kropki powyżej słupków wskazują względny poziom istotności p: \* oznacza istotność na poziomie  $p<0,05$ , \*\* oznacza  $p<0,01$ , \*\*\* oznacza  $p<0,001$ , a \*\*\*\* oznacza  $p<0,0001$ .

Analizę statystyczną do badań nad wpływem wybranych fungicydów na aktywność aminopeptydaz w rzepaku na etapie formowania się łuszczyń wykonał dr hab. inż. Tomasz Krawczyk.



Dane poddano analizie wariancji, wykorzystując moduł ANOVA programu STATISTICA 12 (StatSoft). Czynniki takie jak: czas aplikacji fungicydu, organ roślinny, rodzaj fungicydu czy substrat zostały zidentyfikowane jako stałe efekty, a ich znaczenie określono stosując test F. W większości przypadków dane poddano przekształceniu Boxa-Coxa, aby spełnić założenia homoscedastyczności i normalności, co zweryfikowano testami Hartleya, Cochrańa i Bartletta. W przypadku badań nad wpływem poszczególnych fungicydów na aktywność aminopeptydaz, dane analizowano oddzielnie dla każdego z substratów,  $\lambda$  dla Ala=0,56, Gly=0,43, Leu=0,38, Met=0,29, Phe=0,44, Pro=0,28 oraz kontrola=0,44. Dane dotyczące masy 1000 ziaren, zawartości oleju w nasionach oraz wydajności plonu (otrzymane z Instytutu Ochrony Roślin, Państwowego Instytutu Badawczego – Oddział Sośnicowice), poddano analizie wariancji ANOVA. Dane te nie wymagały transformacji by spełnić wymagania tej metody statystycznej. Wartości skrajne odrzucono.

#### 4.11. Synteza substratów

##### 4.11.1. Synteza Gly-pNA, Met-pNA i Phe-pNA

Gly-pNA, Met-pNA i Phe-pNA otrzymano metodą opisaną w literaturze przez Rijkersa i innych<sup>162</sup>. Boc-aminokwasy (glicyna, L-metionina lub L-feniloalanina) (w ilości 5 mmol) sprzężono z *p*-nitroaniliną (5 mmol), z użyciem trichlorku fosforu (0,5 ml) w zimnej pirydynie (15 ml). Reakcję prowadzono przez 2 h w zamrażarce. Reakcję przzerwano, dodając 30 ml zimnej wody destylowanej. Otrzymaną mieszaninę ekstrahowano octanem etylu (4x40 ml) a następnie przemyto nasyconym roztworem NaHCO<sub>3</sub> i NaCl (3 x 30 ml, każdy). Roztwór suszono nad bezwodnym Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Otrzymany olej przemyto toluenem (10 ml), a rozpuszczalnik odparowano na wyparce rotacyjnej. Operacje tą wykonano trzykrotnie. Półprodukt oczyszczono przez krystalizację z 2-propanolu. Otrzymane kryształy *N*-Boc amidu rozpuszczono w octanie etylu (3 ml) i odbezpieczono 1 M HCl w octanie etylu (3 ml), w temperaturze pokojowej. Reakcję prowadzono przez 24 h, a następnie przzerwano, dodając 1 M NaOH (3 ml). Mieszaninę ekstrahowano octanem etylu (4 x 5 ml) oraz przemyto nasyconym roztworem NaHCO<sub>3</sub> i NaCl (3 x 10 ml, każdy). Roztwór suszono nad bezwodnym Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, a rozpuszczalnik odparowano na wyparce rotacyjnej. Otrzymane ciało stałe poddano krystalizacji z 2-propanolu. Struktury otrzymanych związków potwierdzono za pomocą spektroskopii <sup>1</sup>H NMR i <sup>13</sup>C NMR. Związki otrzymano z wydajnością: Phe-pNA 64%, Gly-pNA 58% i Met-pNA 12%.

*p*-nitroanilid glicyny: <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  11.45 (s, 1H, NHCO), 8.17 (d, 2H, ArH, *ortho* do NO<sub>2</sub>), 7.94 (d, 2H, ArH), 3.91 (s, 2H, CH<sub>2</sub>CO), <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  164.9 (CO), 143.6 (CNO<sub>2</sub> (ipso)), 142.2 (CNHCO (ipso)), 124.0 (ArC (*ortho* do NO<sub>2</sub>)), 118.4 (ArC), 41.0 (CHCO).

*p*-nitroanilid L-metioniny:  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  10.08 (s, 1H,  $\text{NHCO}$ ), 8.21 (d, 2H,  $\text{ArH}$ , *ortho* do  $\text{NO}_2$ ), 7.77 (d, 2H,  $\text{ArH}$ ), 3.70 (dd, 1H,  $\text{CHCO}$ ), 2.69 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{S}$ ), 2.34 (m 1H,  $\text{CH}_2\text{CH}$ ), 2.14 (s, 3H  $\text{CH}_3\text{S}$ ), 1.86 (m 1H,  $\text{CH}_2\text{CH}$ ),  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  173.2 ( $\text{CO}$ ), 143.5 ( $\text{CNO}_2$  (ipso)), 143.4 ( $\text{CNHCO}$  (ipso)), 125.1 ( $\text{ArC}$  (*ortho* do  $\text{NO}_2$ )), 118.8 ( $\text{ArC}$ ), 54.5 ( $\text{CHCO}$ ), 33.4 ( $\text{CHCH}_2$ ), 30.7 ( $\text{CH}_2\text{S}$ ), 15.3 ( $\text{CH}_3\text{S}$ ).

*p*-nitroanilid L-fenylalaniny:  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  9.88 (s, 1H,  $\text{NHCO}$ ), 8.19 (d, 2H,  $\text{ArH}$ , *ortho* do  $\text{NO}_2$ ), 7.74 (d, 2H,  $\text{ArH}$ ), 7.27 (m, 5H, Ph), 3.77 (dd, 1H,  $\text{CHCO}$ ), 3.35 (dd, 1H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 2,81 (dd 1H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  172.9 ( $\text{CO}$ ), 143.5 ( $\text{CNO}_2$  (ipso)), 143.4 ( $\text{CNHCO}$  (ipso)), 137.1, 129.2, 128.9, 127,18 (Ph), 125.1 ( $\text{ArC}$  (*ortho* do  $\text{NO}_2$ )), 118.8 ( $\text{ArC}$ ), 56.7 ( $\text{CHCO}$ ), 40.4 ( $\text{CH}_2\text{Ph}$ ).

#### 4.11.2. Synteza Pro-pNA

Synteze *p*-nitroanilidu proliny prowadzono korzystając z procedury opisanej przez Pansare i Kirby<sup>163</sup>. Boc-prolinę (5 mmol) rozpuszczono w THF (13 ml) i sprzężono z *p*-nitroaniliną (5 mmol) z użyciem chloromrówczanu izobutyli (0,7 ml) i 4-metylomorfliny (0,6 ml). Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej przez 24 h. Następnie mieszaninę reakcyjną ekstrahowano octanem etylu (4 x 15 ml) i przemywano wodą (18 ml). Fazę organiczną przemywano nasyconym  $\text{NaHCO}_3$  (2 x 6 ml), 0,5 N HCl (8 ml) i solanką (4 ml), a następnie suszono nad bezwodnym  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Rozpuszczalnik odparowano na wyparce rotacyjnej. Otrzymano ciało stałe o czerwono-brunatnym zabarwieniu, przemywano mieszaniną heksan:2-propanol (w stosunku 3:1). Otrzymany *N*-Boc amid (jasnożółte ciało stałe) odbezpieczono kwasem trifluoroctowym (2 ml) w dichlorometanie (2,5 ml), reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej przez 24 h. Reakcję przerwano odparowując rozpuszczalnik na wyparce rotacyjnej. Otrzymane ciało stałe rozpuszczono w dichlorometanie (3 ml) i ekstrahowano wodą (4 x 2 ml). Roztwór wodny schłodzono do 4°C i doprowadzono do pH 12 dodając NaOH. Przeprowadzono ekstrakcję dichlorometanem (2 x 2 ml), a następnie suszono nad bezwodnym  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Rozpuszczalnik odparowano na wyparce rotacyjnej. Otrzymane ciało stałe rekrytalizowano w mieszaninie octan etylu:heksan (w stosunku 1:1). Strukturę otrzymanego związku potwierdzono za pomocą spektroskopii  $^1\text{H}$  NMR i  $^{13}\text{C}$  NMR. Otrzymano związek z wydajnością 21%.

*p*-nitroanilid L-proliny:  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  10.18 (s, 1H,  $\text{NHCO}$ ), 8.20 (d, 2H,  $\text{ArH}$ , *ortho* do  $\text{NO}_2$ ), 7.78 (d, 2H,  $\text{ArH}$ ), 3.90 (dd, 1H,  $\text{CHCO}$ ), 3.13 (dt, 1H,  $\text{CH}_2\text{N}$ ), 3.00 (dt 1H,  $\text{CH}_2\text{N}$ ), 2.24 (m, 1H,  $\text{CH}_2\text{CH}$ ), 2.04 (m, 2H,  $\text{NH}$ ,  $\text{CH}_2\text{CH}$ ), 1.77 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  174.1 ( $\text{CO}$ ), 143.6 ( $\text{CNO}_2$  (ipso)), 143.3 ( $\text{CNHCO}$  (ipso)), 125.0 ( $\text{ArC}$  (*ortho* do  $\text{NO}_2$ )), 118.7 ( $\text{ArC}$ ), 61.0 ( $\text{CHCO}$ ), 47.4 ( $\text{CH}_2\text{NH}$ ), 30.7 ( $\text{CH}_2\text{CH}$ ), 26.3 ( $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$ ).

## WYNIKI

### 5. Omówienie wyników

Rośliny z rodziny *Brassicaceae* (np. rzepak, brokuł, brukselka czy gorczyca) należą do ważnych i popularnych upraw rolniczych. Rzepak (*Brassica napus*) jest kluczowym reprezentantem tej rodziny, ze względu na zastosowanie zarówno w przemyśle spożywczym jak i paliwowym. Jako roślina oleista, rzepak zajmuje pierwsze miejsce w Polsce i w Europie pod względem wielkości upraw. Rośliny uprawne, ze względu na ich znaczenie w gospodarce i żywieniu, często stają się obiektami badań naukowych. Ważnym aspektem badań nad roślinami rolniczymi jest poznanie procesów fizjologicznych w nich zachodzących. Określenie, jak procesy te wpływają na wysokość plonów jest istotne ze względów ekonomicznych. W wielu procesach fizjologicznych roślin uczestniczą aminopeptydazy: między innymi w przemianie, dojrzewaniu i degradacji białek. Znany jest również udział aminopeptydaz w kiełkowaniu i wędnięciu roślin, reakcjach obronnych oraz w odpowiedzi na czynniki stresowe. Do tej pory zidentyfikowano aminopeptydazy z kilku roślin z rodziny *Brassicaceae*, między innymi z kapusty, brukselki, kalarepy, brokułu, kalafiora czy kapusty chińskiej. Badane enzymy charakteryzowały się podobną masą cząsteczkową (około 60 kDa) i optimum pH w zakresie 7,2 do 7,5. Aminopeptydazy te wykazywały szczególną specyficzność w stosunku do *N*-końcowej fenyloalaniny i alaniny<sup>62,164</sup>.

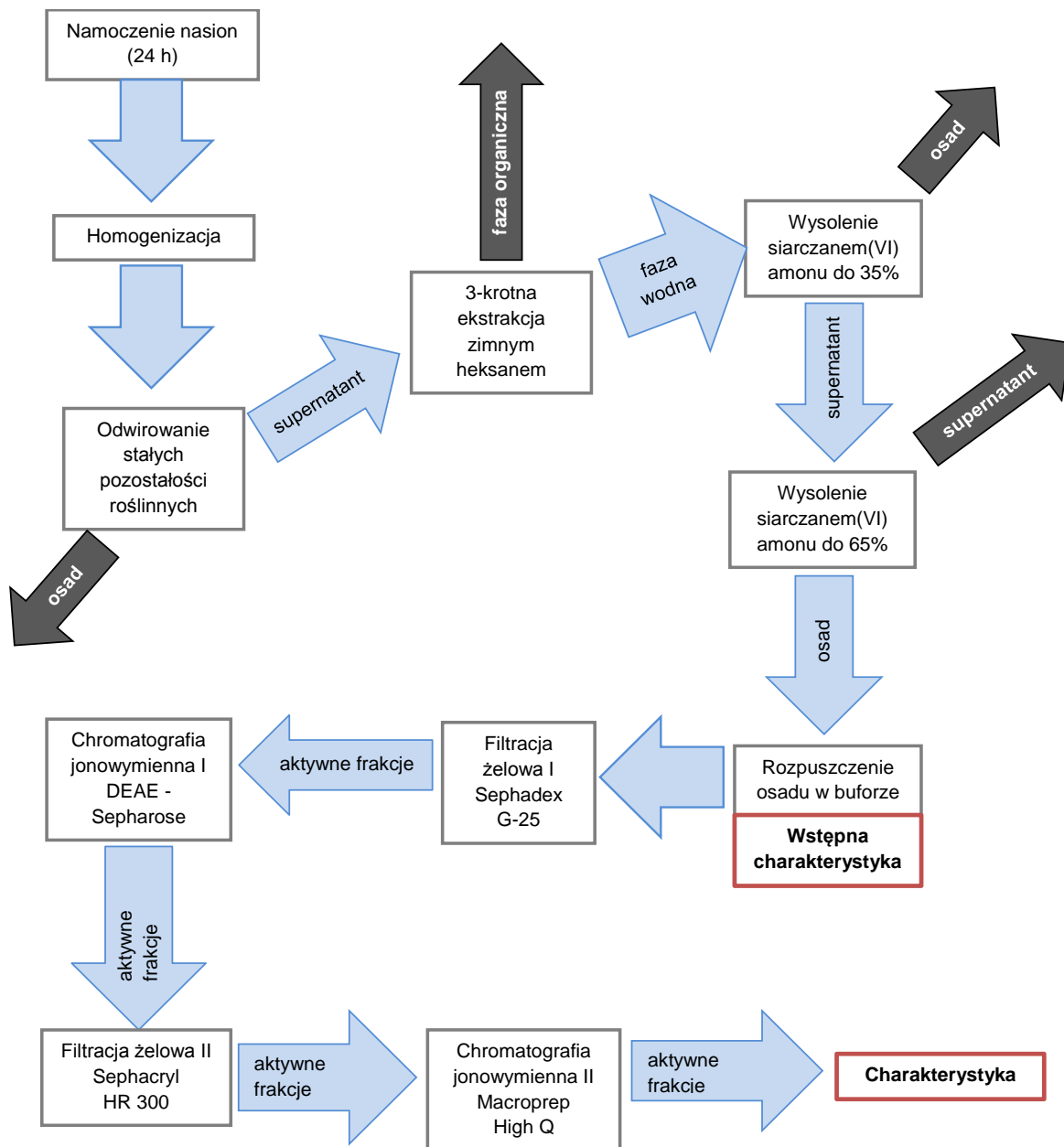
Ze względu na znaczenie rzepaku oraz znikome informacje dotyczące aminopeptydaz w tej roślinie, przeprowadzono badania aktywności tych enzymów zarówno w nasionach jak i w siewkach odmiany ozimej cv Bellevue. Zbadano również wpływ licznych czynników abiotycznych i biotycznych na aminopeptydazy z rzepaku ozimego na różnych etapach wzrostu rośliny.

#### 5.1. Aminopeptydazy z nasion rzepaku ozimego – izolacja i charakterystyka

Dotychczasowe badania nad aminopeptydazami występującymi w nasionach, obejmują szereg gatunków roślin istotnych ekonomicznie, między innymi zbóż takich jak jęczmień, w którym scharakteryzowano aminopeptydazę leucynową<sup>36</sup>. Opiszana jest również aminopeptydaza cysteinowa wyizolowana z nasion znajdujących się we wnętrzu pestek moreli japońskiej<sup>165</sup>. Natomiast w przypadku roślin oleistych opisano aminopeptydazę z nasion słonecznika<sup>73</sup>. Dotychczas nie scharakteryzowano aminopeptydaz występujących w suchych nasionach rzepaku. Znana jest natomiast aminopeptydaza z kiełkujących nasion tej rośliny, którą scharakteryzowano w latach 70' ubiegłego wieku. Wyizolowano wówczas aminopeptydazę, katalizującą preferencyjnie hydrolizę substratu z *N*-końcową alaniną, o masie 79 kDa i optimum pH w zakresie 8,0-8,5<sup>166,167</sup>.

### *5.1.1. Izolacja i oczyszczanie aminopeptydaz z nasion rzepaku*

Pierwszy etap badań obejmował izolację aminopeptydaz z suchych nasion rzepaku. Obiektem badań był rzepak ozimy odmiany Bellevue, firmy Bayer CropScience. Jest to odmiana liniowa, zarejestrowana w Polsce w 2008 roku. Charakteryzuje się ona dobrą zimotrwałością i dobrym plonowaniem, nawet na słabych glebach<sup>168</sup>. Procedura izolacji składała się z kilku etapów, które przedstawiono w postaci schematu blokowego na rysunku 7. Izolacja obejmowała homogenizację, przemywanie heksanem, dwukrotne wysolenie siarczanem(VI) amonu, filtrację żelową na dwóch różnych złożach oraz dwukrotną chromatografię jonowymienną na różnych złożach. W procesie izolacji zastosowano procedury i złoża często stosowane w oczyszczaniu aminopeptydaz pochodzenia roślinnego<sup>36,39,55,169</sup>.



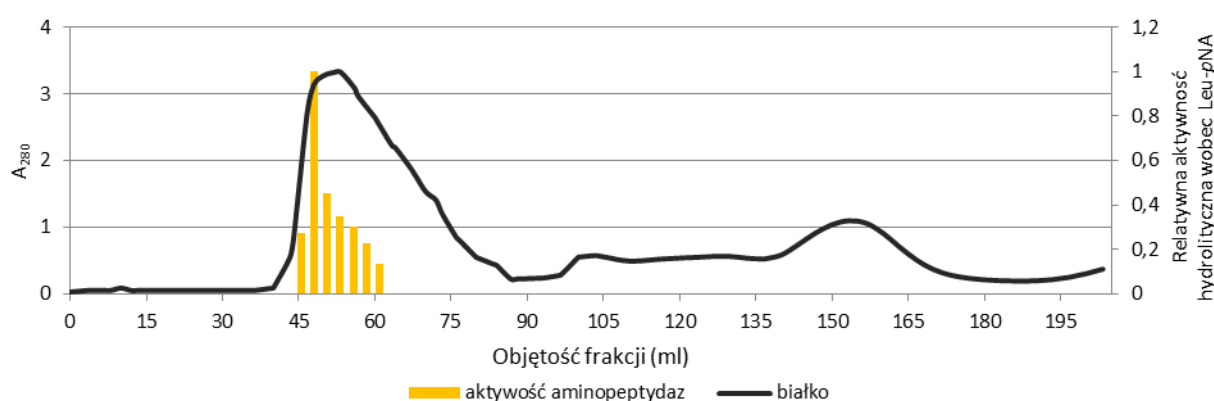
Rys.7. Etapy oczyszczania aminopeptydaz z nasion rzepaku ozimego cv Bellevue

Na każdym etapie izolacji, próbki analizowano pod kątem aktywności aminopeptydazowej, stosując metodę spektrofotometryczną (substrat Leu-*p*NA; temperatura 37°C) opisaną wcześniej w literaturze<sup>158</sup>. W podobny sposób analizowano aktywność aminopeptydaz wyizolowanych między innymi z jęczmienia<sup>36</sup>, ziemniaka<sup>170</sup> czy siewek pszenżyta<sup>45</sup>.

W procesie oczyszczania enzymu najpierw usunięto występujący naturalnie w nasionach rzepaku olej, poprzez kilkukrotną ekstrakcję zimnym heksanem<sup>171</sup>. Nie stwierdzono dezaktywacji aminopeptydaz pod wpływem heksanu (porównanie aktywności enzymatycznej w surowym ekstrakcie oraz w fazie wodnej po ekstrakcji zimnym heksanem). Kolejnym etapem było wysolenie fazy wodnej siarczanem(VI) amoni do odpowiednich stężeń (35 i 65%). Po tym etapie dokonano wstępnej

charakterystyki aminopeptydaz występujących w nasionach rzepaku. Wyniki opisano w rozdziale 5.1.2.

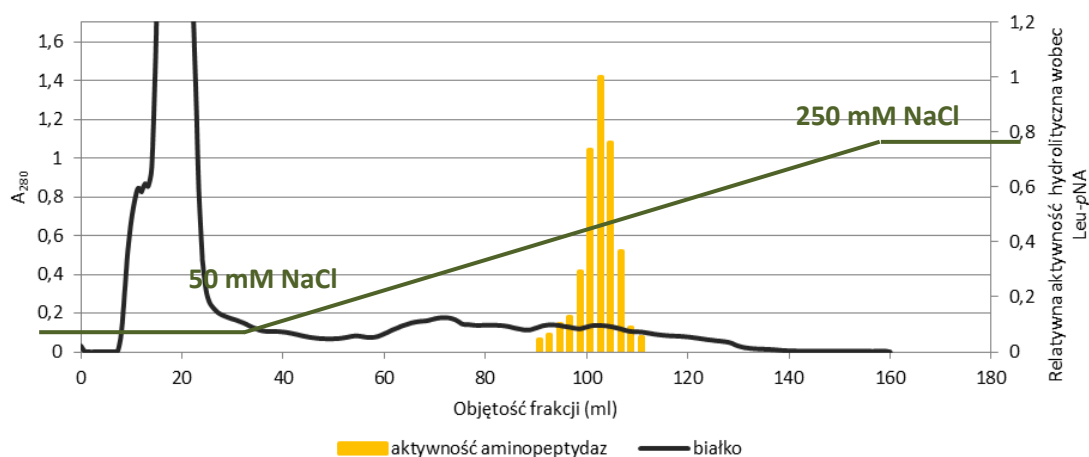
Dalsze etapy oczyszczania wykonano z użyciem aparatury do średniociśnieniowej, cieczonej chromatografii białek (FPLC). Osad po drugim wysoleniu rozpuszczono w buforze 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), zawierającym 50 mM NaCl i 10 mM BME i poddano filtracji żelowej stosując kolumnę ze złożem Sephadex G-25. Profil elucji białek wraz z zaznaczonymi na żółto frakcjami wykazującymi aktywność hydrolityczną w stosunku do Leu-pNA, przedstawiono na rysunku 8. Aktywność enzymatyczną wykazywały frakcje 15-21 (objętość elucji 45-63 ml). Etap ten pozwolił na pozbycie się małowcząsteczkowych zanieczyszczeń oraz siarczynu(VI) amonu z badanej próbki.



Rys.8. Profil elucji białek obecnych w ekstrakcie z nasion rzepaku podczas filtracji żelowej na złożu Sephadex G-25

*Natężenie przepływu 2 ml/min, eluent: bufor 50 mM Tris-HCl (pH 8,0) zawierający 50 mM NaCl i 10 mM BME, frakcje 3 ml, z zaznaczeniem frakcji wykazujących aktywność hydrolityczną wobec Leu-pNA, wyrażoną jako relatywna aktywność (wartość 1 przypisano frakcji o najwyższej aktywności wobec Leu-pNA).*

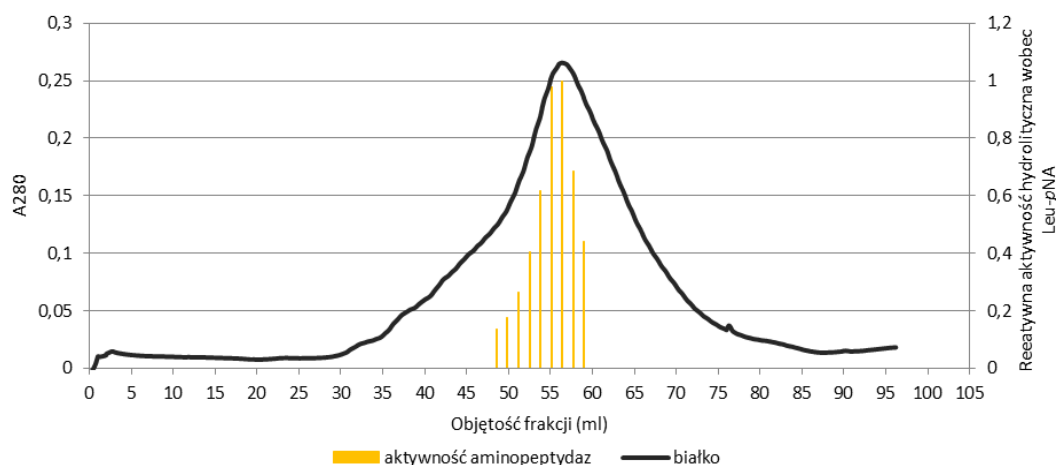
Frakcje wykazujące aktywność wobec Leu-pNA, po filtracji żelowej, poddano chromatografii jonowymiennej na złożu DEAE Sepharose (słabo zasadowy anionit z grupami dietyloaminoetylowymi), stosując gradient stężenia NaCl 50-250 mM. Otrzymany profil elucji białek oraz aktywności aminopeptydaz w zebranych frakcjach przedstawiono na rysunku 9. Znaczna część białek została wymyta z kolumny w pierwszych frakcjach (6-25). Białka te nie wykazywały aktywności hydrolitycznej wobec Leu-pNA. Aktywność taką wykryto w dalszych frakcjach (85-106), przy stężeniu NaCl 125-190 mM.



Rys.9. Profil elucji białek obecnych w ekstrakcie z nasion rzepaku podczas chromatografii jonowymiennej na złożu DEAE Sepharose

Natężenie przepływu 1 ml/min, eluent: bufor Tris-HCl o pH 8,0; gradient NaCl 50 - 250 mM (zielona linia); frakcje 1 ml, z zaznaczeniem frakcji wykazujących aktywności aminopeptydaz wyrażonej jako relatywna aktywność (wartość 1 przypisano frakcji o relatywnie najwyższej aktywności wobec Leu-pNA).

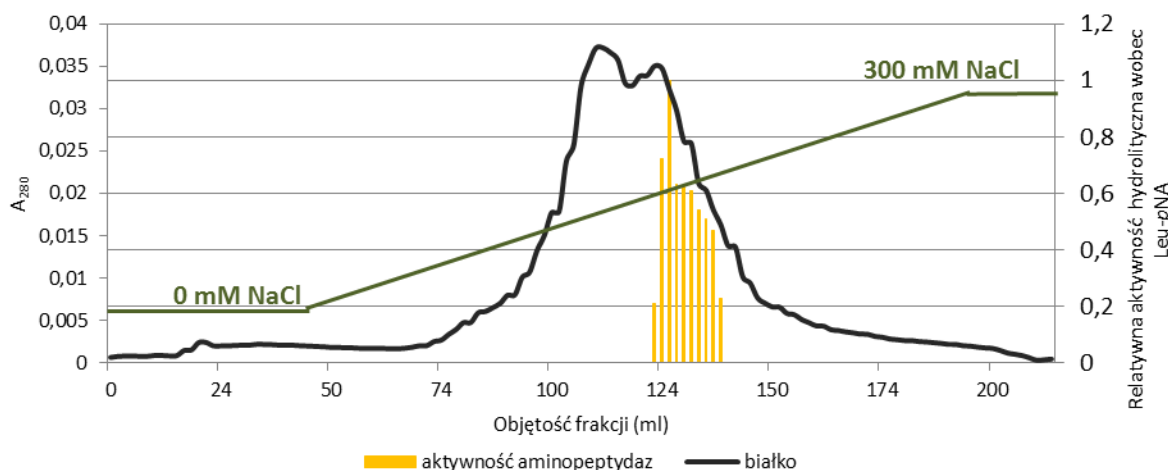
Aktywne frakcje po chromatografii jonowymiennej zatężono i poddano filtracji żelowej na złożu Sephacryl HR300 (rysunek 10). Złoże to pozwala na rozdzielanie białek globularnych w zakresie mas od 10 do 1500 kDa<sup>172</sup>. Zastosowano kolumnę o wymiarach 50 x 1,5 cm i natężenie przepływu eluentu 0,2 ml/min. W tak dobranych warunkach, profil elucji białek miał kształt szerokiego piku (frakcje od 30 do około 75). Aktywność hydrolityczną wobec Leu-pNA wykazywały frakcje 49-58.



Rys.10. Profil elucji białek ekstraktu białkowego z nasion rzepaku podczas filtracji żelowej na złożu Sephacryl HR300

Natężenie przepływu 0,2 ml/min, eluent: bufor 50 mM Tris-HCl (pH 8,0) zawierający 50 mM NaCl i 10 mM BME, frakcje 1 ml, z zaznaczeniem frakcji wykazujących aktywność aminopeptydaz wyrażonej jako relatywna aktywność (wartość 1 przypisano frakcji o relatywnie najwyższej aktywności wobec Leu-pNA).

W celu dalszego oczyszczenia aminopeptydazy z nasion rzepaku ozimego zastosowano chromatografię jonowymienną na złożu Macro Prep High Q (silny anionit, z grupami trimetyloamoniowymi)<sup>173</sup>, gradient NaCl 0-300 mM, natężenie przepływu 1 ml/min. Otrzymany profil elucji białek oraz aktywności aminopeptydaz w zebranych frakcjach przedstawiono na rysunku 11. Białka wykazujące aktywność hydrolityczną wobec Leu-*p*NA eluowały przy stężeniu NaCl 130-165 mM (frakcje 124-140).



Rys.11. Profil elucji białek z ekstraktu białkowego z nasion rzepaku podczas chromatografii jonowymienniej na złożu Macro Prep High Q

*Natężenie przepływu 1 ml/min, eluent: bufor Tris-HCl, pH 8,0; gradient NaCl od 0 - 300 mM (zielona linia), frakcje 1 ml, z zaznaczeniem frakcji wykazujących aktywność hydrolityczną wobec Leu-*p*NA, wyrażoną jako relatywna aktywność (wartość 1 przypisano frakcji o najwyższej aktywności wobec Leu-*p*NA).*

W wyniku stosowanej procedury otrzymano 1,97 mg białka o aktywności właściwej 788 mU/mg wobec Leu-*p*NA jako substratu. Stopień oczyszczenia wynosił 131,17 (tabela 19). Nie udało się oczyścić białka do homogeniczności (co potwierdzono za pomocą elektroforezy SDS-PAGE, rysunek 13 w rozdziale 5.1.2), mimo stosowania procedur powszechnie opisywanych w literaturze<sup>36,39,55,169</sup>. Prawdopodobnie mogło to wynikać z obecności białek o podobnej masie molekularnej oraz podobnym powinowactwie do złoża podczas chromatografii jonowymienniej. Z drugiej strony, na podstawie profilu elucji białek uzyskanego po filtracji żelowej na złożu Sephacryl HR 300 (rysunek 10), można przypuszczać, że długość zastosowanej kolumny była niewystarczająca.



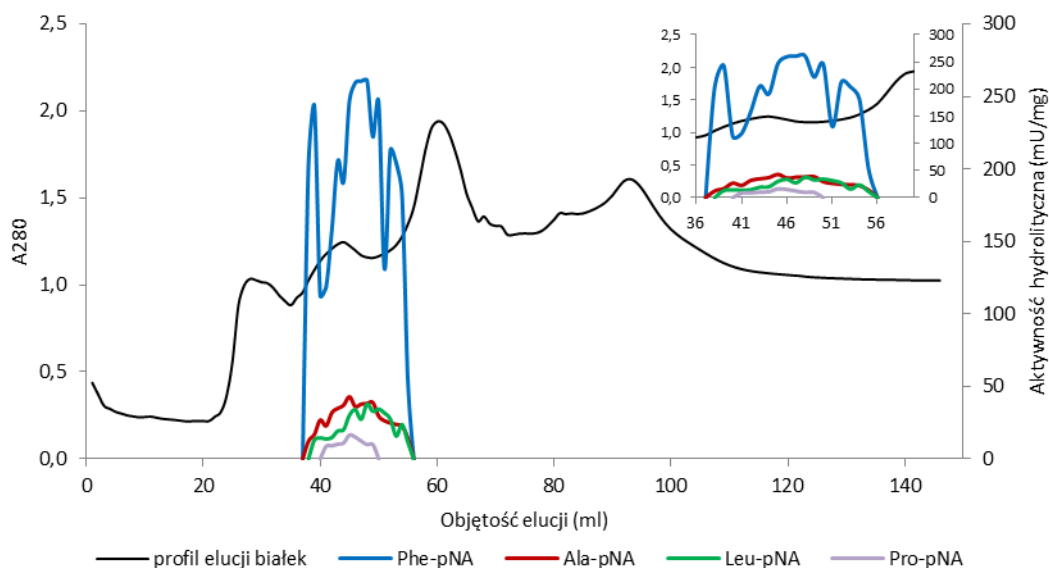
Tab.19. Podsumowanie kolejnych etapów oczyszczania aminopeptydaz z nasion rzepaku

| Etap oczyszczenia                                   | Aktywność całkowita* [U] | Zawartość białka [mg] | Aktywność specyficzna* [U×mg <sup>-1</sup> białek] | Stopień oczyszczenia | Wydajność [%] |
|---|--------------------------|-----------------------|--|----------------------|---------------|
| Surowy ekstrakt                                     | 63,33                    | 10089,0               | 0,006  | 1,0                  | 100,0         |
| 35% (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | 51,46                    | 3976,0                | 0,013  | 2,17                 | 81,3          |
| 65% (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | 25,60                    | 1031,0                | 0,025  | 4,16                 | 40,4          |
| Sephadex G-25                                       | 25,56                    | 955,0                 | 0,027  | 4,50                 | 40,4          |
| DEAE - Sepharose                                    | 12,76                    | 65,6                  | 0,195  | 32,33                | 20,2          |
| Sephacryl HR 300                                    | 5,38                     | 20,1                  | 0,268  | 44,67                | 8,5           |
| MacroPrep High Q                                    | 1,97                     | 2,5                   | 0,788  | 131,17               | 3,1           |

\*Aktywność hydrolityczna aminopeptydaz wobec Leu-pNA jako substratu, w buforze PBS o pH 7,0, w temperaturze 37°C.

### 5.1.2. Wstępna charakterystyka aminopeptydaz z ekstrakcie białkowym z nasion rzepaku

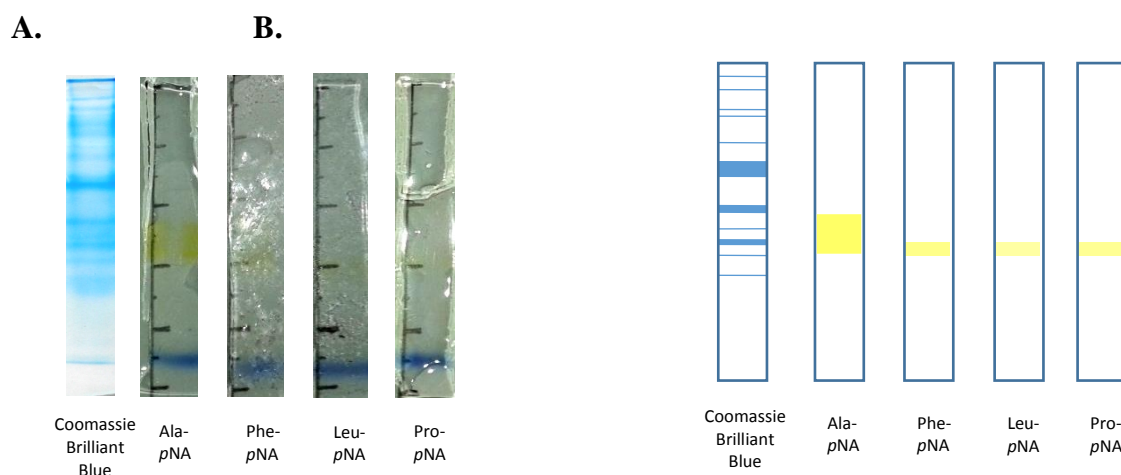
Wstępną charakterystykę aminopeptydaz występujących w ekstrakcie białkowym z nasion rzepaku, wykonano dla próbek otrzymanych po dwukrotnym wysoleniu siarczanem(VI) amonu (rysunek 7). W celu określenia profilu aktywności aminopeptydaz, przeprowadzono filtrację żelową (na złożu Sephacryl HR 300), oznaczając aktywność wszystkich frakcji wobec czterech substratów: Phe-pNA, Ala-pNA, Leu-pNA i Pro-pNA. Na podstawie profilu aktywności aminopeptydaz z ekstraktu białkowego z nasion rzepaku ozimego (rysunek 12) można wysnuć wniosek, że enzymy te są wymywane z kolumny w podobnym czasie (frakcje od 37-56), co odpowiada zakresowi masy molekularnej 25-375 kDa. Najwyższą aktywność enzymatyczną obserwowano w stosunku do Phe-pNA jako substratu. Na podstawie profilu aktywności wobec Phe-pNA wyróżniono trzy piki aktywności, z czego środkowy pik dzielił się na kolejne trzy nakładające się na siebie. Może to świadczyć o obecności więcej niż jednej aminopeptydazy o aktywności wobec *N*-końcowej fenyloalaniny, w ekstrakcie białkowym z nasion rzepaku. W przypadku substratów Leu-pNA i Ala-pNA również można zauważyć około 4-5 nakładających się na siebie sygnałów. Mimo, że aktywność hydrolityczną wobec różnych substratów zaobserwowano w tych samych frakcjach białek (objętość: 36-56 ml, frakcje: 36-56). Stosunkowo niską aktywność wobec Pro-pNA wykryto we frakcjach 40-50. Biorąc pod uwagę otrzymane profile aktywności można przypuszczać, że w nasionach występuje więcej niż jedna aminopeptydaza. Aminopeptydazy o zbliżonej masie molekularnej i specyficzności substratowej zostały do tej pory wyizolowane i opisane dla kilku roślin. Przykładowo, z nasion kukurydzy wyizolowano cztery aminopeptydazy (AMP1, AMP2, AMP3 i AMP4) o masie molekularnej w zakresie 61-92 kDa. Enzymy AMP1 (około 92 kDa) i AMP3 (około 86 kDa) charakteryzowały się bardzo podobną specyficznością substratową (preferowane substraty to *N*-końcowa lizyna i arginina)<sup>174</sup>.



Rys.12. Profil aktywności aminopeptydaz występujących w surowym ekstrakcie białkowym z nasion rzepaku ozimego odmiany Bellevue<sup>81</sup>.

Filtracja żelowa, kolumna: Sephacryl HR 300, 1,5 x 50 cm, natężenie przepływu 0,2 ml/min, objętość frakcji 1 ml. Bufor Tris-HCl 50 mM, pH 8,0. Substraty: Phe-pNA, Ala-pNA, Leu-pNA i Pro-pNA.

Następnie przeprowadzono elektroforezę natywną ekstraktu białkowego z nasion rzepaku ozimego odmiany Bellevue. Po elektroforezie żel poddano barwieniu enzymatycznemu. W tym celu wykorzystano reakcję hydrolizy *p*-nitroanilidu wybranego aminokwasu, katalizowaną przez aminopeptydazy. Jednym z produktów tej reakcji jest *p*-nitroanilina (związek, którego roztwory charakteryzują się intensywnym, żółtym zabarwieniem). Otrzymane wyniki przedstawiono na rysunku 13.



Rys.13. **A.** Elektroforeza natywna surowego ekstraktu z nasion rzepaku ozimego odmiany Bellevue. **B.** Rysunek obrazujący wybarwione prążki aminopeptydaz znajdujących się w surowym ekstrakcie - na podstawie elektroforezy natywnej

*Elektroforeza: żel poliakrylamidowy 7,5%, elektroforezę prowadzono przez 15 min przy napięciu 60 V, a następnie 1 h przy 120 V w temperaturze 4°C. Barwienie enzymatyczne: inkubacja żelu w 5mM roztworze danego substratu rozpuszczonego w buforze 50 mM Tris-HCl (pH 8,0) przez 30 min, temperatura pokojowa.*

Aktywność wobec użytych substratów (największa intensywność dla Ala-*p*NA) kumuluje się w jednym regionie, w którym może się znajdować kilka białek (na żelu wybarwionym Coomassie Brilliant Blue widoczne są 3 prążki). Współczynniki ruchliwości elektroforetycznej wyliczone dla prążków widocznych na żelu z Native-PAGE (barwienie enzymatyczne) są podobne ( $R_f$  0,49-0,63 dla Ala-*p*NA oraz  $R_f$  0,58-0,63 dla Phe-*p*NA, Leu-*p*NA i Pro-*p*NA). Świadczy to o obecności jednego enzymu o szerokiej specyficzności substratowej lub obecności kilku aminopeptydaz o bardzo zbliżonej masie molekularnej. Podobne wyniki otrzymano dla aminopeptydaz z białkowego ekstraktu z nasion świerku pospolitego. Barwienie enzymatyczne z użyciem dwóch substratów (z *N*-końcówką alaniną i leucyną), wykazało obecność dwóch prążków białek wykazujących aktywność wobec tych związków. Enzymy te, poddane filtracji żelowej eluowały w jednym szerokim pikie. Dopiero badania inhibicyjne pozwoliły na jednoznaczne określenie, że enzymy te nie są izoenzymami, a dwoma odmiennymi aminopeptydazami leucynowymi<sup>175</sup>. Warto zwrócić uwagę na fakt, że mogą istnieć różnice pomiędzy ilością i ruchliwością elektroforetyczną izoenzymów aminopeptydaz, w obrębie różnych odmian tego samego gatunku rośliny. Zostało to udowodnione na przykład dla bawełny. W badaniach użyto ekstraktów białkowych z nasion z 29 odmian bawełny, które poddano elektroforezie na żelu skrobiowym, a następnie barwieniu na obecność aminopeptydazy leucynowej. Pomędzy wybranymi odmianami obserwowano różnice zarówno w ruchliwości elektroforetycznej aminopeptydaz, intensywności prążków oraz ich ilości<sup>176</sup>.

Zbadano specyficzność substratową aminopeptydaz w ekstrakcie białkowym z nasion rzepaku ozimego (tabela 20). Do badań użyto sześciu substratów, będących *p*-nitroanilidami aminokwasów,

dwóch dipeptydów i jednego tetrapeptydu. Badania prowadzono w temperaturze 37°C, w buforze PBS o pH 6,5.

Tab. 20. Specyficzność substratowa aminopeptydaz w ekstrakcie białkowym z nasion rzepaku ozimego po dwukrotnym wysoleniu siarczanem(VI) amonu

| Substrat                     | Aktywność właściwa aminopeptydaz [mU/mg] | Relatywna aktywność* [%] |
|------------------------------|--|--------------------------|
| Phe- <i>p</i> NA             | 87,8                                     | 100,0                    |
| Leu- <i>p</i> NA             | 17,9                                     | 20,4                     |
| Ala- <i>p</i> NA             | 10,0                                     | 11,4                     |
| Met- <i>p</i> NA             | 8,5                                      | 9,7                      |
| Pro- <i>p</i> NA             | 4,5                                      | 5,1                      |
| Gly- <i>p</i> NA             | 2,0                                      | 3,6                      |
| Gly-Phe- <i>p</i> NA         | 3,1                                      | 2,3                      |
| Phe-Gly- <i>p</i> NA         | 0,3                                      | 0,4                      |
| Gly-Phe-Gly-Phe- <i>p</i> NA | 0,0                                      | 0                        |

\*Aktywność mierzono w temperaturze 37°C, w buforze PBS o pH 6,5, stosując substraty o stężeniu 1,3 mM. Jako 100% przyjęto aktywność preparatu wobec Phe-*p*NA

Najwyższą aktywność obserwowano dla substratu z *N*-końcówką fenyloalaniną (88 mU/mg), a w dalszej kolejności hydrolizowany był Leu-*p*NA (18 mU/mg). Sugeruje to obecność aminopeptydaz preferujących aminokwasy hydrofobowe jako substraty. Substraty takie jak Ala-*p*NA i Met-*p*NA również były hydrolizowane, jednak z dużą aktywnością właściwą (kolejno 10 i 8,5 mU/mg). Najniższą aktywność właściwą odnotowano dla substratu z *N*-końcówką glicyną. Zdolność do hydrolizy różnych substratów, w tym Met-*p*NA oraz Pro-*p*NA, w połączeniu z wcześniej przedstawionym profilem aktywności, świadczy raczej o szerokiej specyficzności substratowej jednej aminopeptydazy, chociaż nie można wykluczyć obecności kilku form tego enzymu.

Obserwowano niewielką aktywność wobec dipeptydów Gly-Phe-*p*NA i Phe-Gly-*p*NA (odpowiednio 3,1 i 0,3 mU/mg). Nie obserwowano aktywności badanych enzymów wobec tetrapeptydu (Gly-Phe-Gly-Phe-*p*NA). Wynika to z faktu, iż aminopeptydazy katalizują hydrolizę kolejnych aminokwasów z *N*-końca peptydu. W przypadku stosowanego pomiaru spektrofotometrycznego, postęp hydrolizy enzymatycznej obserwuje się dopiero po odszczepieniu wolnej *p*-nitroaniliny. Przepuszczalnie szybkość hydrolizy poszczególnych aminokwasów była zbyt mała lub czas pomiaru był za krótki, by móc zaobserwować aktywność hydrolityczną dla tych związków.

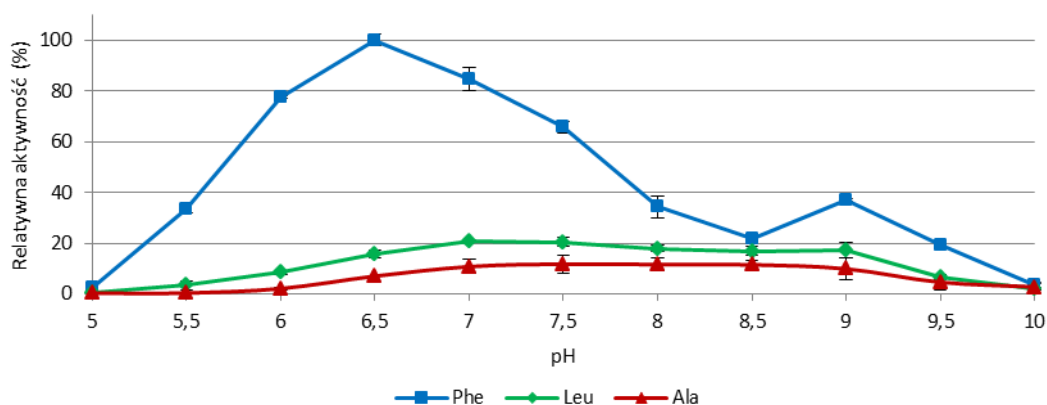
### 5.1.3. Charakterystyka oczyszczonego enzymu z nasion rzepaku ozimego

W wyniku przeprowadzonej procedury oczyszczania ekstraktu białkowego z nasion rzepaku ozimego (opisanej w rozdziale 5.1.1.), otrzymano aminopeptydazę o aktywności właściwej 788 mU/mg (wobec Leu-pNA jako substratu). Dla tego enzymu określono optimum pH, optimum temperaturowe, stabilność temperaturową, specyficzność substratową oraz punkt izoelektryczny.

#### 5.1.3.1. Optimum pH aminopeptydazy z nasion rzepaku

Biorąc pod uwagę aktywność aminopeptydazy w ekstrakcie białkowym z nasion rzepaku wobec różnych substratów, zdecydowano, że optimum pH zostanie wyznaczone dla trzech aminokwasów, dla których badany enzym wykazywał najwyższe powinowactwo: Phe, Leu i Ala.

Badania wykonano w zakresie pH 5,0-10,0 (Rysunek 14). Wartość pH, w której enzym wykazuje maksimum aktywności może się różnić w zależności od użytego substratu. W zależności od pH, łańcuchy boczne aminokwasów mogą ulegać jonizacji, co może wpływać na strukturę przestrzenną białka. Ponadto, wraz ze zmianą pH, jonizacji ulegają łańcuchy boczne aminokwasów w centrum aktywnym enzymu, co może mieć znaczenie w procesie tworzenia kompleksu enzym-substrat. Zmiany pH mogą również wpływać na jonizację samego substratu czy kompleksu enzym-substrat.



Rys.14. Wpływ pH na aktywność oczyszczonej aminopeptydazy z nasion rzepaku wobec Phe-pNA, Ala-pNA i Leu-pNA jako substratów.

*Stosowane bufony: octanowo sodowy (pH 5,0 i 5,5), PBS (pH 6,0, 6,5 i 7,0), Tris-HCl (pH 7,5, 8,0 i 8,5) oraz węglanowy ( $\text{Na}_2\text{CO}_3\text{-NaHCO}_3$ ) (pH 9,0, 9,5 i 10,0), aktywność oznaczano w temperaturze 37 °C, słupki błędów reprezentują odchylenia standardowe średniej z trzech powtórzeń; jako 100% przyjęto najwyższą aktywność wyznaczoną dla substratu Phe-pNA.*

W przypadku zastosowania Phe-pNA jako substratu, maksymalną aktywność obserwowano w pH 6,5. Zaobserwowano również mniejszy pik przy pH 9,0. Może to być efektem korzystnej, dla przebiegu katalizy enzymatycznej, jonizacji aminokwasów w centrum aktywnym enzymu zachodzącej

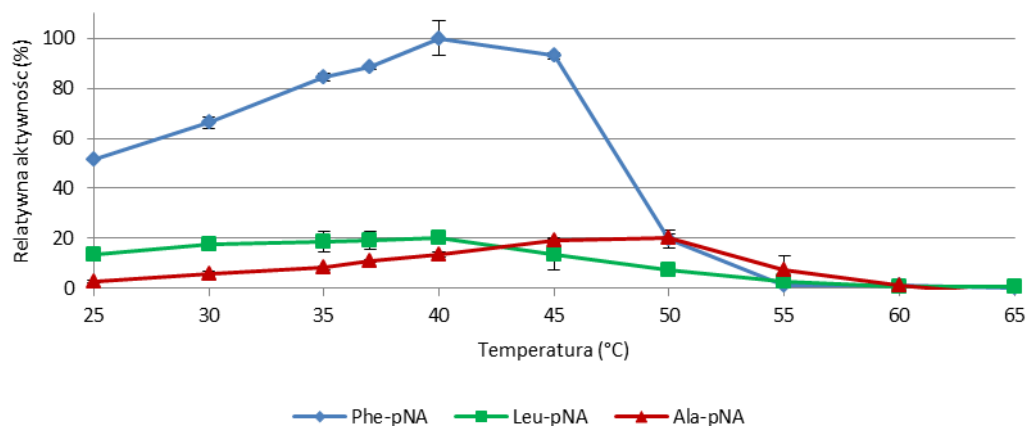
w tym pH, bądź też jonizacji kompleksu enzym-substrat. Dla pozostałych substratów (Leu-*p*NA i Ala-*p*NA) aktywność utrzymywała się na podobnym poziomie w szerokim zakresie pH (6,5-9,0), przy czym można zaobserwować maksimum dla Leu w pH 7,0-7,5 oraz dla Ala w pH 7,5-8,5.

W literaturze dotyczącej charakterystyki aminopeptydaz roślinnych, optimum pH jest najczęściej wyznaczane wobec substratu, dla którego enzym wykazuje najwyższą aktywność. W przypadku enzymów o stosunkowo szerokiej specyficzności substratowej, często wyznacza się optimum pH dla więcej niż jednego substratu. W przypadku aminopeptydazy oczyszczonej z nasion jęczmienia optimum pH wobec Phe- $\beta$ NA i Leu- $\beta$ NA wynosiło 7,2, a dla dipeptydów i tripeptydu (Phe-Ala, Leu-Tyr, Ala-Gly i Leu-Gly-Gly) oscyloowało pomiędzy 5,8-6,5<sup>177</sup>. Innym przykładem mogą być aminopeptydazy z kukurydzy. Dla aminopeptydazy oznaczonej jako AMP1, zaobserwowano różne optimum pH, w zależności od użytego substratu (7,0 wobec Leu-*p*NA i 8,0 wobec Arg-*p*NA). Natomiast aminopeptydaza AMP2, z tej samej rośliny najefektywniej hydrolizowała substraty: Leu-*p*NA, Arg-*p*NA i Ala-*p*NA w tym samym pH 8,0<sup>174</sup>.

Najczęściej aminopeptydazy wyizolowane z nasion roślin, wykazywały optimum pH pomiędzy 6,5 a 7,5. Jako przykłady można podać aminopeptydazy z nasion grochu zwyczajnego (optimum pH dla enzymu oznaczonego jako AP1, o aktywności wobec substratu z *N*-końcową leucyną oraz enzymu AP2, o aktywności wobec *N*-końcowej Ala było jednakowe i wynosiło 7,0)<sup>178</sup>. Aminopeptydaza z nasion konopi siewnej wykazywała również optimum pH 7,0 (substrat Leu-*p*NA)<sup>63</sup>, podobnie jak aminopeptydaza cysteinowa z nasion moreli japońskiej o optimum pH 6,5-7,0 (substrat Leu- $\beta$ NA)<sup>165</sup> i aminopeptydaza z nasion gryki zwyczajnej (7,2 wobec Leu-*p*NA)<sup>179</sup>. Także aminopeptydaza leucynowa z nasion fasoli zwyczajnej wykazywała maksimum aktywności w pH 7,0, dla substratów z *N*-końcową leucyną, arginina, alanina i metionina<sup>180</sup>.

#### 5.1.3.2. Optimum temperaturowe i stabilność termiczna aminopeptydazy z nasion rzepaku

Pierwszym etapem badań było wyznaczenie temperatury, w której enzym wykazuje najwyższą aktywność. Badania przeprowadzono w zakresie temperatur 25-65°C. Wyniki przedstawiono na rysunku 15.

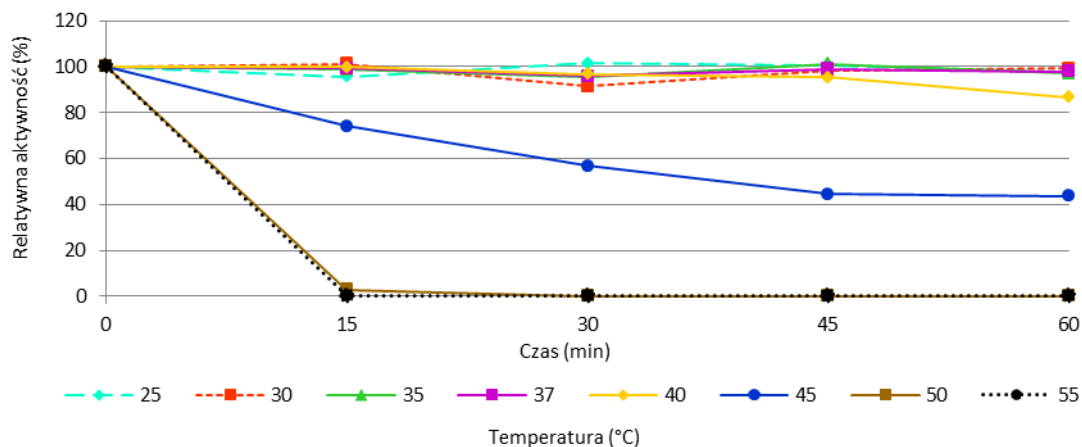


Rys.15. Zależność aktywności aminopeptydazy z nasion rzepaku ozimego od temperatury, wyznaczona dla substratów Phe-*p*NA, Ala-*p*NA i Leu-*p*NA

Czas inkubacji 10 minut, pH 7,0, za 100% przyjęto najwyższą aktywność wobec Phe-*p*NA, słupki błędów reprezentują odchylenia standardowe średniej z trzech powtórzeń

Największą aktywność, wobec substratu Phe-*p*NA, enzym wykazywał w temperaturze 40°C. W temperaturze 25°C, obserwowano znacznie niższą aktywność hydrolityczną, wynoszącą około 50% aktywności maksymalnej. W 30°C aktywność ta wynosiła już 70%, a w zakresie temperatur 35-45°C enzym wykazywał ponad 80% swojej maksymalnej aktywności. Powyżej 45°C, wraz z dalszym wzrostem temperatury zaobserwowano drastyczny spadek aktywności. W 50°C aktywność enzymatyczna spadła do 20%. Natomiast w temperaturze 55°C i wyższej nie obserwowano aktywności hydrolitycznej badanej aminopeptydazy. W przypadku pochodnej leucynowej profil zależności aktywności aminopeptydazy od temperatury był podobny, a maksimum aktywności obserwowano w 40°C. Dla tego substratu, nawet w 25°C aminopeptydaza wykazywała 67% aktywności maksymalnej. W temperaturach wyższych niż 40°C, spadek aktywności był stopniowy, a całkowita dezaktywacja enzymu nastąpiła dopiero w 60°C. Podobną wrażliwość na temperatury wyższe niż 50°C miała aminopeptydaza wyizolowana z nasion słonecznika (substrat Leu-*p*NA)<sup>73</sup>. Natomiast dla Ala-*p*NA, profil aktywności różnił się od tych uzyskanych dla pozostałych substratów. Maksimum aktywności zaobserwowano w 50°C. W niższych temperaturach (25-37°C) aktywność enzymatyczna była niska (od 2,7- 10,9%). Natomiast w temperaturze 55°C i wyższej następował gwałtowny spadek aktywności aminopeptydazy. Różnice pomiędzy optimum temperaturowym danego enzymu wobec różnych substratów jest zjawiskiem rzadko opisywanym w literaturze i wciąż oczekującym na pełne wyjaśnienie. Różnice w aktywności aminopeptydazy leucynowej I z *Aspergillus oryzae* w różnych temperaturach zaobserwowano dla dwóch substratów Leu-βNA i Leu-Gly-Gly. Aktywność wobec Leu-βNA (w pH 8,0) była od 10 do 30% wyższa niż w stosunku do stosowanego tripeptydu<sup>181</sup>.

Stabilność termiczną badanego enzymu wyznaczono w zakresie temperatur 25-55°C, inkubując go w danej temperaturze przez 15, 30, 45 lub 60 minut, (rysunek 16). W zakresie temperatur od 25 do 40°C, enzym zachowywały niemal 100% swojej początkowej aktywności, przez co najmniej godzinę. Po godzinnej inkubacji w temperaturze 45°C aktywność enzymatyczna obniżyła się o niemal 60%. W temperaturze 50°C i wyższej, już po 15 minutach zaobserwowano niemal całkowitą dezaktywację.



Rys.16. Stabilność termiczna aminopeptydazy z nasion rzepaku ozimego

Substrat: Phe-pNA, pH 7,0; jako 100% przyjęto aktywność mierzoną bezpośrednio po dodaniu substratu do mieszaniny reakcyjnej.

### 5.1.3.3. Specyficzność substratowa aminopeptydazy z nasion rzepaku

Określono specyficzność substratową oczyszczonej aminopeptydazy z nasion rzepaku ozimego (tabela 21). Badania przeprowadzono w identyczny sposób jak przy określaniu specyficzności substratowej w ekstrakcie białkowym (rozdział 5.1.2).

Tab.21. Specyficzność substratowa oczyszczonej aminopeptydazy z nasion rzepaku ozimego

| Substrat            | Aktywność właściwa [mU/mg] | Relatywna aktywność* [%] |
|---------------------|----------------------------|--------------------------|
| Phe-pNA             | 2570,6                     | 100,0                    |
| Leu-pNA             | 409,7                      | 15,9                     |
| Pro-pNA             | 232,4                      | 9,0                      |
| Met-pNA             | 214,0                      | 8,3                      |
| Ala-pNA             | 171,2                      | 6,7                      |
| Gly-pNA             | 68,5                       | 2,7                      |
| Gly-Phe-pNA         | 4,9                        | 0,2                      |
| Phe-Gly-pNA         | 0,0                        | 0,0                      |
| Gly-Phe-Gly-Phe-pNA | 0,0                        | 0,0                      |

\*Aktywność mierzono w 37°C w buforze PBS o pH 6,5, substraty o stężeniu 1,3 mM. Jako 100% przyjęto aktywność oczyszczonego preparatu wobec Phe-pNA,



Podobnie jak w ekstrakcie białkowym, najwyższą aktywność hydrolityczną zaobserwowano dla Phe-*p*NA (2570,6 mU/mg). Drugim preferowanym substratem był Leu-*p*NA (409,7 mU/mg). Niższe wartości aktywności właściwej otrzymano dla Pro-*p*NA, Met-*p*NA i Ala-*p*NA (odpowiednio 232,4, 214,0 i 171,2 mU/mg). Substrat z *N*-końcową glicyną był hydrolizowany w stosunkowo niewielkim stopniu 68 mU/mg. W stosunku do Gly-Phe-*p*NA aktywność aminopeptydazy wynosiła 4,9 mU/mg. Nie zaobserwowano aktywności badanego enzymu wobec Phe-Gly-*p*NA i tetrapeptydu (Gly-Phe-Gly-Phe-*p*NA). Ze względu na to, że brak w literaturze informacji o aminopeptydazach z nasion rzepaku, można jedynie stwierdzić, że otrzymane wyniki różnią się od danych literaturowych dla kiełkujących nasion rzepaku. Aminopeptydaza opisana przez Barth'a i Hermann'a wykazywała najwyższą aktywność wobec substratu z *N*-końcowa alaniną<sup>166</sup>.

Za pomocą programu Hyper32 wyznaczono  $K_m$  i  $V_{max}$  dla Leu-*p*NA oraz Phe-*p*NA. Wykresy zależności szybkości reakcji od stężenia substratu oraz wartości  $K_m$  i  $V_{max}$  dla dwóch substratów zebrano w tabelach 22 i 23. Wartości te wyznaczono różnymi metodami: metodą Lineweavera-Burka, metodą Eadie-Hofstee, metodą Hanesa-Woolfa oraz metodą krzywej hiperbolicznej.

Tab.22. Parametry kinetyczne oczyszczonej aminopeptydazy oraz wykresy zależności szybkości reakcji od stężenia substratu dla Leu-pNA

| Metody wyznaczania parametrów kinetycznych   | $K_m$<br>( $\mu\text{M}$ ) | $V_{\max}$<br>( $\mu\text{M/s}$ ) |
|--|----------------------------|-----------------------------------|
| Wykres zależności szybkości reakcji (V) od stężenia substratu (S) (krzywa hiperboliczna) |                            |                                   |
|  | 274,2±23                   | 68,4±3                            |
| Metoda Lineweavera-Burka   |                            |                                   |
|  | 334,3±1                    | 76,8±0,2                          |
| Metoda Eadie-Hofstee   |                            |                                   |
|  | 264,1±11                   | 67,6±3                            |
| Metoda Hanesa-Woolfa   |                            |                                   |
|  | 241,6±1                    | 65,3±0,2                          |

Tab.23. Parametry kinetyczne oczyszczonej aminopeptydazy oraz wykresy zależności szybkości reakcji od stężenia substratu dla Phe-pNA

| Metody wyznaczania parametrów kinetycznych   | $K_m$ ( $\mu\text{M}$ ) | $V_{\max}$ ( $\mu\text{M/s}$ ) |
|--|-------------------------|--------------------------------|
| Wykres zależności szybkości reakcji (V) od stężenia substratu (S) (krzywa hiperboliczna) |                         |                                |
|  | 247,8±42                | 401,8±45                       |
| Metoda Lineweavera-Burka   |                         |                                |
|  | 247,8±4                 | 403,1±7                        |
| Metoda Eadie-Hofstee   |                         |                                |
|  | 219,6±32                | 380,1±55                       |
| Metoda Hanesa-Woolfa   |                         |                                |
|  | 222,6±6                 | 382,2±10                       |

W przypadku substratu Leu-*p*NA, wartości  $K_m$  i  $V_{max}$ , wyliczone na podstawie krzywej zależności szybkości reakcji ( $V$ ) od stężenia substratu ( $S$ ), wynosiły odpowiednio  $274,2 \pm 23 \mu M$  i  $68,4 \pm 3 \mu M/s$ . Zbliżone wartości otrzymano stosując metodę Eadie-Hofstee i Hanesa-Woolfa. Dla substratu z *N*-końcówką fenyloalaniną,  $K_m$  wynosiło  $247,8 \pm 42 \mu M$ , a  $V_{max}$   $401,8 \pm 45 \mu M/s$  (na podstawie wykresu zależności  $V$  od  $[S]$ ). Zbliżone wartości otrzymano stosując metodę Lineweavera-Burka. Otrzymane wartości stałej Michaelisa-Menten ( $K_m$ ) dla użytych substratów, świadczą o większym powinowactwie enzymu do fenyloalaniny niż do leucyny. Należy jednak zaznaczyć, że wyliczona wartość  $V_{max}$  dla Phe-*p*NA, jest prawie sześciokrotnie wyższa niż dla Leu-*p*NA. Co oznacza, że wysycenie enzymu substratem Phe-*p*NA następuje przy niemal sześciokrotnie wyższym stężeniu substratu niż w przypadku Leu-*p*NA. Dla porównania wartości  $K_m$ , dla aminopeptydazy z nasion innej rośliny oleistej (słonecznika), w stosunku do substratów z *N*-końcówką leucyną i fenyloalaniną również były zbliżone (odpowiednio 257 i 333  $\mu M$ ), jednocześnie enzym wykazywał najwyższą specyficzność w stosunku do Phe-*p*NA<sup>73</sup>.

#### 5.1.3.4. Wpływ inhibitorów oraz jonów metali na aktywność aminopeptydazy z nasion rzepaku

Ze względu na mechanizm hydrolizy, peptydazy mogą być podzielone na cztery klasy: metaloproteazy, proteazy serynowe, proteazy aspartylowe i proteazy cysteinowe. Związki użyte w niniejszych badaniach, są inhibitorami charakterystycznymi dla poszczególnych grup peptydaz. Zastosowano m.in. trzy czynniki chelatujące, będące inhibitorami metaloproteaz: EDTA, EGTA oraz 1,10-fenantrolinę. Związki te różnią się powinowactwem do wybranych metali. EDTA na przykład, wykazuje silne powinowactwo do jonów magnezu, wapnia i żelaza. EGTA, to związek o mniejszym powinowactwie do magnezu, a wysokim do jonów wapnia<sup>182</sup>. Natomiast 1,10-fenantrolina charakteryzuje się silnym powinowactwem do jonów cynku, a niskim do jonów wapnia. Dlatego też, na podstawie badań inhibicyjnych z tymi związkami, można pośrednio określić, czy i jakie metale znajdują się w centrum aktywnym badanego enzymu, lub są kluczowe dla jego aktywności. W badaniach użyto również znanego inhibitora proteaz serynowych - fluorku fenylometrylosulfonylu (PMSF). Zastosowano także E-54 (*trans*-epoksylsukcynylo-L-leucyloamino-(4-guanidyno)butan), który jest inhibitorem proteaz cysteinowych. Bestatyna z kolei, to związek będący inhibitorem typowym dla aminopeptydaz.

W badaniach jako substratu użyto Phe-*p*NA, z uwagi na wysoką aktywność, jaką enzym wykazywał w stosunku do tego związku. Enzym był inkubowany z danym inhibitorem przez 30 minut. W tabeli 24 zebrano wyniki aktywności oczyszczonej aminopeptydazy z nasion rzepaku ozimego, poddanej działaniu poszczególnych inhibitorów. Stężenia inhibitorów dobrano eksperymentalnie oraz na podstawie danych literaturowych<sup>36,160</sup>.

Tab.24. Wpływ wybranych inhibitorów proteaz na aktywność oczyszczonej aminopeptydazy z nasion rzepaku ozimego

| Inhibitor         | Stężenie [mM] | Relatywna aktywność aminopeptydazy* [%] |
|-------------------|---------------|---|
| Brak              | 0             | 100±1                                   |
| EDTA              | 33            | 50±4                                    |
|                   | 10            | 73±2                                    |
|                   | 1             | 84±1                                    |
| EGTA              | 10            | 99±2                                    |
| 1,10-fenantrolina | 10            | 105±1                                   |
| PMSF              | 4             | 46±9                                    |
|                   | 2             | 64±3                                    |
| Bestatyna         | 0,1           | 94±4                                    |
|                   | 0,025         | 100±4                                   |
| E-64              | 0,1           | 96±9                                    |

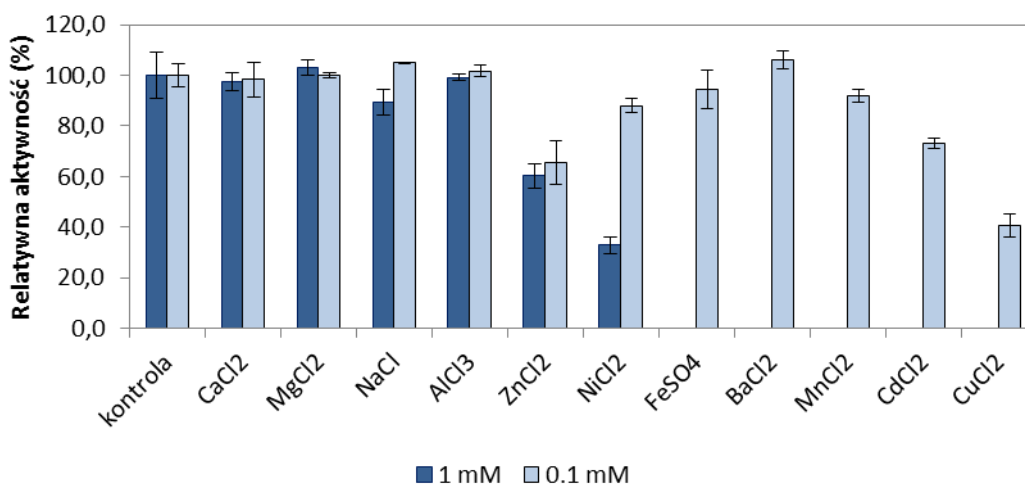
\*Aktywność wyznaczono w 50 mM buforze PBS o pH 7,0, inkubując enzym z danym inhibitorem przez 30 minut, a następnie dodając substratu (Phe-pNA).

Wraz ze wzrostem stężenia EDTA aktywność badanego enzymu obniżała się, osiągając ostatecznie 50% aktywności przy stężeniu 33 mM. Inne badane związki o właściwościach chelatujących nie miały większego wpływu na aktywności aminopeptydazy. Ponadto, 1,10-fenantrolina działała w niewielkim stopniu aktywująco. Fluorek fenylometrylosulfonylu (PMSF) również wykazywał właściwości inhibujące. W obecności tego związku, obserwowano obniżenie aktywności aminopeptydazy o 54% przy stężeniu inhibitora 4 mM. Bestatyna wykazywała bardzo znikomy efekt inhibicyjny. Badania powtórzono stosując dłuższy czas inkubacji (60 min i 24 h), jednak uzyskane wyniki nie odbiegały znacząco od wartości uzyskanych we wcześniejszym eksperymencie. Otrzymane wyniki sugerują, że seryna odgrywa ważną rolę w aktywności badanej aminopeptydazy. Ponadto, do osiągnięcia pełnej aktywności enzymu wymagana jest obecności jonów metali. Najprawdopodobniej, jony metali niezbędne do uzyskania pełnej aktywności, są związane z centrum aktywnym enzymu.

PMSF, który najsilniej hamował aktywność aminopeptydazy z nasion rzepaku, został również opisany jako inhibitor aminopeptydazy prolinowej z nasion orzeczy podziemnej (orzecz ziemny). Enzym ten był również inhibowany przez związki o dużym powinowactwie do grup sulfhydrylowych (spadek aktywności o ponad 60%)<sup>183</sup>. Podobnie aminopeptydaza z fasoli zwyczajnej ulegała ponad 90% inhibicji pod wpływem *p*-(hydroksyrtęciowego)benzoesu sodu (*p*OHMB) (związek o dużym powinowactwie do grup sulfhydrylowych) stosując stężenie 0,08 mM. Na ten sam enzym inhibujący wpływ miały związki chelatujące (EDTA o stężeniu 0,03 mM i 1,10-fenantrolina o stężeniu 0,7 mM) - stwierdzono spadek aktywności enzymu o około 44%<sup>180</sup>. EDTA i 1,10-fenantrolina hamowały również

aktywność aminopeptydaz dwóch aminopeptydaz (oznaczonych jako AMP1 i AMP3) z kukurydzy<sup>174</sup>. Nie zaobserwowano natomiast wpływu EDTA na aminopeptydazy z grochu zwyczajnego, chociaż jedna z nich w 100% była inhibowana przez 1,10-fenantrolinę. Oba enzymy były natomiast inhibowane przez kwas *p*-chlorortęciowobenzoesowy (0,1 mM, 98% inhibicji), który jest inhibitorem proteaz cysteinowych<sup>178</sup>.

Kolejnym ważnym aspektem w charakterystyce enzymu, jest określenie wpływu jonów metali na jego aktywność. W przypadku aminopeptydazy z nasion rzepaku, zbadano wpływ jonów wapnia, magnezu, sodu, glinu, cynku, niklu, żelaza, baru manganu, kadmu i miedzi. Do badań zastosowano roztwory soli tych metali. Enzym inkubowano przez 2 h, w temperaturze 4°C, stosując roztwory o stężeniu 0,1 i 1 mM, a następnie oznaczano aktywność enzymatyczną wobec Phe-*p*NA. Wyniki przedstawiono na rysunku nr 17.



Rys.17. Wpływ jonów metali na oczyszczone aminopeptydazy z nasion rzepaku ozimego  
Inkubacja 2 h, 4°C, substrat Phe-*p*NA, słupki błędów reprezentują odchylenia standardowe średniej z trzech powtórzeń.

Spośród badanych związków o stężeniu 0,1 mM, sole baru i sodu wykazywały umiarkowanie aktywujący wpływ na badany enzym. Jony metali takie jak: Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> i Al<sup>3+</sup> nie wpływały na aktywność enzymatyczną. Niewielki efekt inhibycyjny zaobserwowano w przypadku użycia Mn<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup> i Cd<sup>2+</sup>. Znaczącą inhibicję enzymu spowodowała inkubacja z chlorkiem miedzi(II) (aktywność spadła o ok 60%). W przypadku chlorku cynku(II), obserwowano spadek aktywności o prawie 35%.

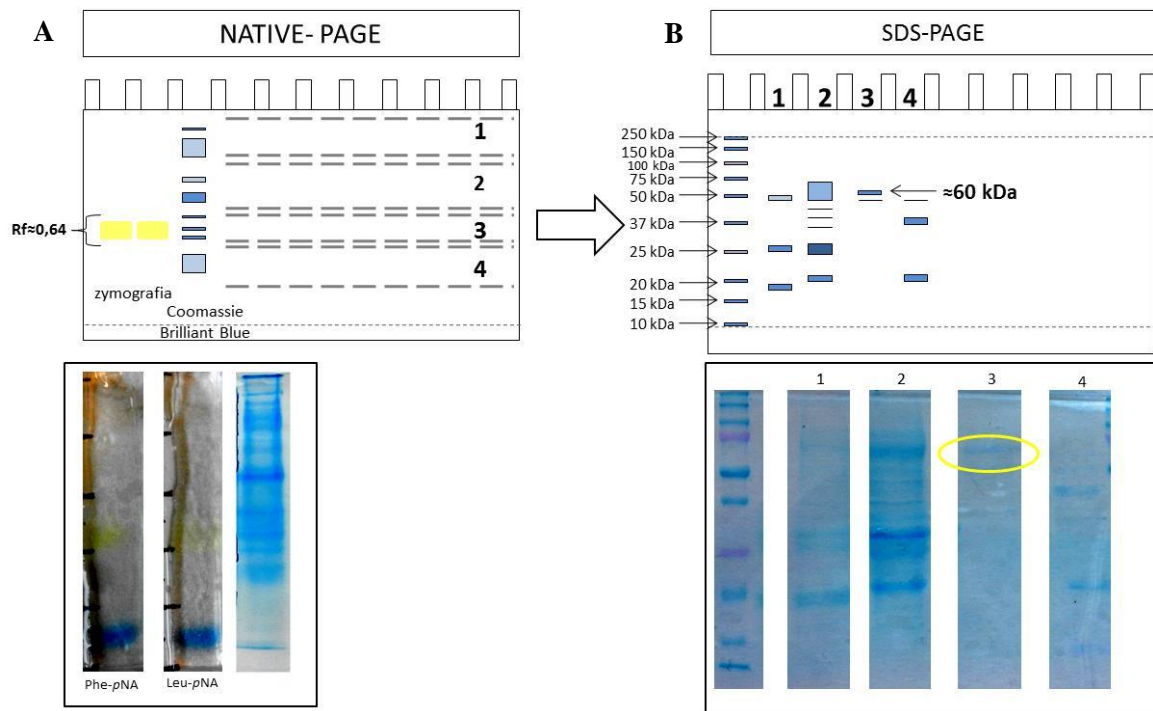
W przypadku roztworów soli o stężeniu 1 mM, zaobserwowano, że jony Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> i Al<sup>3+</sup> w dalszym ciągu nie wpływały na aktywność aminopeptydazy, podczas gdy Ni<sup>2+</sup> powodował obniżenie aktywności o prawie 70%. Zwiększenie stężenia soli cynku nie wpłynęło znacząco na spadek aktywności badanego enzymu (dla 1 mM ZnCl<sub>2</sub> wynosiło 60% aktywności maksymalnej, podczas gdy dla 0,1 mM 65%). Siarczan żelaza(II), o stężeniu 1 mM, powodował całkowitą inhibicję badanego enzymu. W przypadku zastosowania 1 mM roztworów soli baru, manganu, kadmu i miedzi,

podczas oznaczenia wytrącał się osad, który uniemożliwiał wykonanie pomiaru. Prawdopodobnie powstały osad był wynikiem denaturacji białka, spowodowanej zbyt wysokim stężeniem soli tych metali.

W literaturze opisane są aminopeptydazy aktywowane różnymi jonami metali. Przykładowo, jony  $Mg^{2+}$  i  $Mn^{2+}$ , (o stężeniu 1 mM) powodowały wzrost aktywności aminopeptydazy z nasion jęczmienia o 2-5%<sup>36</sup>. Jony sodu, manganu(II) i kobaltu(II) działały aktywnie na aminopeptydazę leucynową z nasion fasoli zwyczajnej, podczas gdy jony cynku działały silnie inhibująco<sup>180</sup>. W przypadku jonów rtęci i miedzi, zaobserwowano niemal 100% inhibicję aminopeptydazy z nasion gryki zwyczajnej<sup>179</sup>. Cynk w znacznym stopniu inhibował także aktywność czterech aminopeptydaz z nasion kukurydzy (nazwanych AMP1, AMP2, AMP3 i AMP4),<sup>174</sup> jak również aminopeptydazę leucynową z konopi siewnej<sup>63</sup>. W wielu przypadkach, mimo iż pewne stężenie jonów danego metalu było niezbędne dla aktywności enzymu (np. jony cynku w centrum aktywnym metaloproteaz), to nadmiar może działać dezaktywująco<sup>184</sup>.

#### 5.1.3.5. Masa molekularna oraz punkt izoelektryczny aminopeptydazy z nasion rzepaku

Oznaczono masę cząsteczkową oczyszczonego enzymu, stosując kombinację elektroforezy Native-PAGE i barwienia enzymatycznego, wraz z elektroforezą SDS-PAGE. Po wybarwieniu żelu po elektroforezie natywnej barwnikiem Coomassie Brilliant Blue, otrzymano osiem prążków o różnej intensywności (rysunek 18, żel A). Wyliczone współczynniki ruchliwości elektroforetycznej dwóch prążków, wykazywały takie same  $R_f$  jak otrzymane dla prążków uzyskanych w wyniku barwienia enzymatycznego. Wykonano elektroforezę SDS-PAGE wyekstrahowanych z żelu białek, wykazujących aktywność hydrolityczną wobec Phe-*p*NA i Leu-*p*NA (na podstawie barwienia enzymatycznego: ścieżka 3, żel B, rysunek 18). W wyniku przeprowadzonej elektroforezy otrzymano jeden intensywny i jeden słabo widoczny prążek. Na podstawie przeprowadzonych badań ustalono, że masa molekularna aminopeptydazy z nasion rzepaku ozimego, o aktywności wobec substratów z *N*-końcówką leucyną i fenyloalaniną, wynosiła około 60 kDa (intensywny prążek). Dla słabo widocznego prążka wyliczono masę molekularną 55 kDa. Oznacza to, że w otrzymanym preparacie znajdowały się co najmniej dwa białka o aktywności aminopeptydaz. Enzym o wyznaczonej masie 60 kDa występował najprawdopodobniej w wyższym stężeniu. Wyznaczone masy molekularne były niższe niż w przypadku opisanej w literaturze aminopeptydazy z kielkującego rzepaku (79 kDa)<sup>166</sup>. Badany enzym posiadał jednak masę molekularną zbliżoną do aminopeptydaz z innych roślin, np. jęczmienia (58 kDa)<sup>36</sup> czy liścieni orzeszka ziemnego (55-60 kDa)<sup>185</sup>.



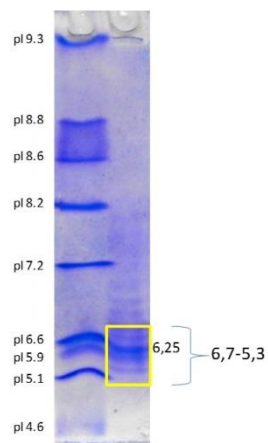
Rys.18. Masa molekularna aminopeptydazy z nasion rzepaku ozimego wyznaczona metodą elektroforezy natywnej i SDS-PAGE; **A**-elektorforeza natywna z barwieniem Coomassie Brilliant Blue i barwieniem enzymatycznym; **B**-SDS-PAGE z wzorcami mas molekularnych (barwienie Coomassie Brilliant Blue); żółtym okręgiem zaznaczono prążek odpowiadający oczyszczonej aminopeptydazie

*Warunki elektroforezy natywnej: 60 V przez pierwsze 15 minut (wnikanie białek do żelu zatężającego), 120 V przez 1 h (migracja białek w żelu rozdzielającym), temp. 5°C*

*Warunki elektroforezy SDS-PAGE: 60 V przez pierwsze 15 minut (wnikanie białek do żelu zatężającego), 130 V przez 1,5 h (migracja białek w żelu rozdzielającym)*

Dla badanego enzymu po elektroforezie Native-PAGE, wyznaczono punkt izoelektryczny metodą ogniskowania izoelektrycznego. W oznaczanej próbce zauważono kilka prążków, położonych blisko siebie, o pI w zakresie 6,7-5,3. Punkt izoelektryczny badanego enzymu (główny prążek, najbardziej intensywny) wynosił 6,25 (rysunek 19). Większość aminopeptydaz pochodzenia roślinnego charakteryzuje się punktem izoelektrycznym o wartości poniżej 7. Na przykład, dla aminopeptydaz z nasion sosny zwyczajnej, pI mieści się w zakresie 4,2 - 4,4<sup>175</sup>. Aminopeptydaza z nasion moreli japońskiej charakteryzowała się pI na poziomie 4,9<sup>165</sup>, a pI dla aminopeptydazy z grochu zwyczajnego, o specyficzności wobec kwasu glutaminowego i asparaginowego (oznaczona jako AP3) wynosił 5,2 - 5,4<sup>186</sup>. Punkt izoelektryczny aminopeptydazy z bulwy ziemniaka wynosił 5,45<sup>170</sup>. Wyższe wartości punktu izoelektrycznego otrzymano dla aminopeptydaz z pomidora (pI 6,2-6,4 dla 60 kDa LAP-A oraz pI 5,6-5,8 dla innej aminopeptydazy o masie 55 kDa)<sup>8</sup>.





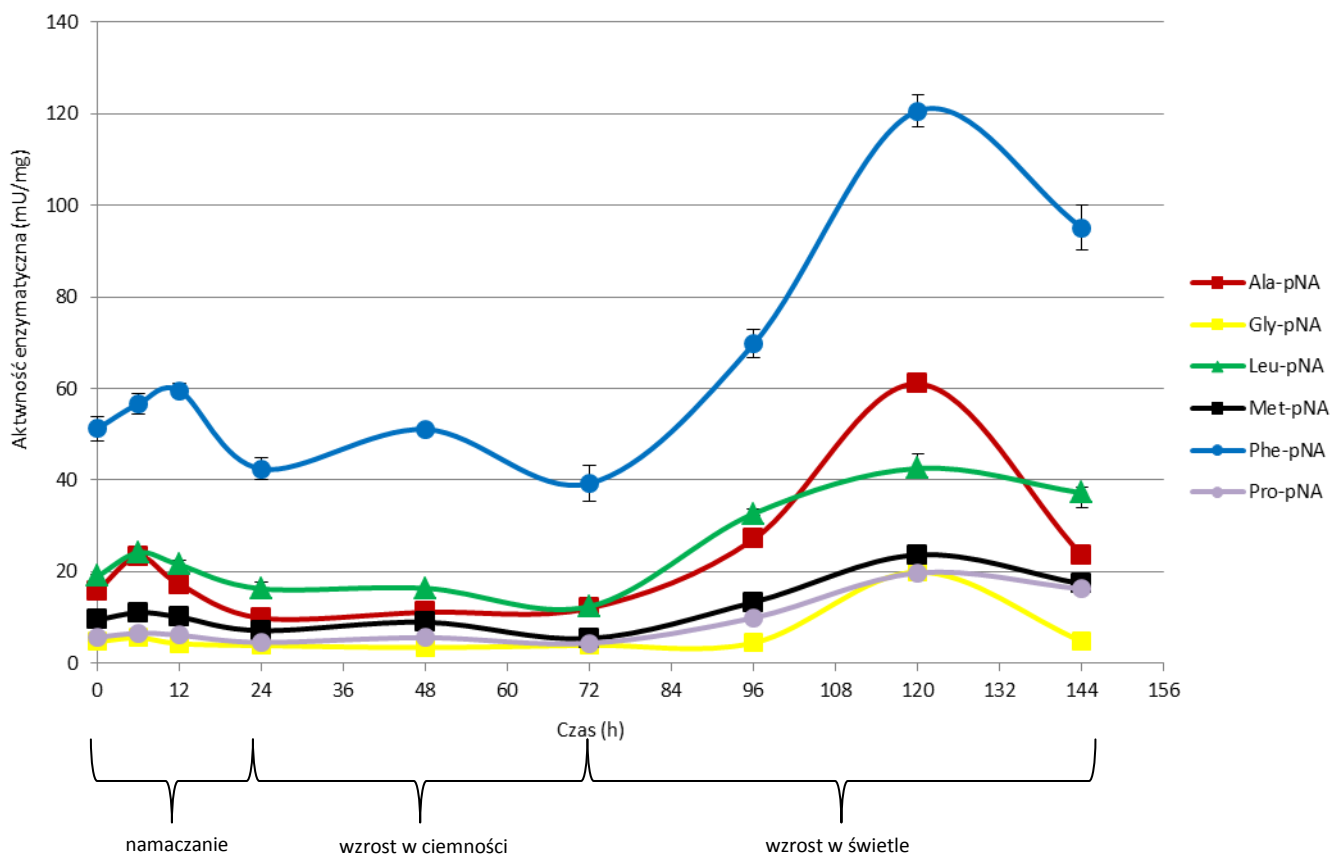
Rys. 19. Żel po ogniskowaniu izoelektrycznym – wyznaczenie punktu izoelektrycznego aminopeptydazy z nasion rzepaku ozimego

Warunki elektroforezy: 100 V przez 1 h, 250 V przez 1 h, 500 V przez 30 min. Bufor katodowy: 50 mM roztwór NaOH,

bufor anodowy: 7 mM roztwór  $H_3PO_4$ .

## 5.2. Profil zmian aktywności aminopeptydaz w pierwszych godzinach rozwoju siewek rzepaku

Kielkowanie roślin jest ważnym i skomplikowanym procesem, w który zaangażowanych jest wiele enzymów. Do enzymów tych można zaliczyć peptydazy, których rolą jest między innymi dostarczanie wolnych aminokwasów, w wyniku degradacji białek zapasowych (proces mobilizacji białek zapasowych). Proces ten związany jest z kolei z ekspresją genów aktywujących proces syntezy hydrolaz, w tym peptydaz<sup>187</sup>. W skutek działania peptydaz na białka zapasowe, uwalnianie są krótkie peptydy i aminokwasy, które następnie transportowane są do zarodka. W zarodku wolne aminokwasy i krótkie peptydy są wykorzystywane do rozwoju i wzrostu młodej rośliny<sup>187-189</sup>. W literaturze można znaleźć informację na temat roli endopeptydaz i karboksypeptydaz w procesie kiełkowania zbóż<sup>187,190,191</sup>. Niewiele jest natomiast informacji na temat zmian aktywności hydrolaz, a szczególnie aminopeptydaz w rzepaku. Z uwagi na ogromne znaczenie tych enzymów we wzroście i rozwoju roślin, ważne jest wyznaczenie profilu zmian ich aktywności w pierwszych godzinach kiełkowania i wzrostu siewek rzepaku. Badania prowadzono dla rzepaku ozimego odmiany Bellevue, a aktywność aminopeptydaz monitorowano przez 144 h kiełkowania, począwszy od 24 h imbibicji, czyli namaczania nasion. Następnie nasiona zostały wysiane na płytce Petriego wyłożone ligniną i przez kolejne 48 h przebywały w ciemności. Przez następne 72 h siewki rozwijały się w specjalnych, kontrolowanych warunkach (temperatura 26°C, wilgotność 65%, tryb 16 h światła i 8 h ciemności). Aktywność aminopeptydaz analizowano z użyciem sześciu substratów (Ala-pNA, Gly-pNA, Leu-pNA, Met-pNA, Phe-pNA i Pro-pNA), a wyniki przedstawiono na rysunku 20. Punkt 0 oznacza aktywność aminopeptydaz w ekstrakcie z suchych nasion rzepaku.

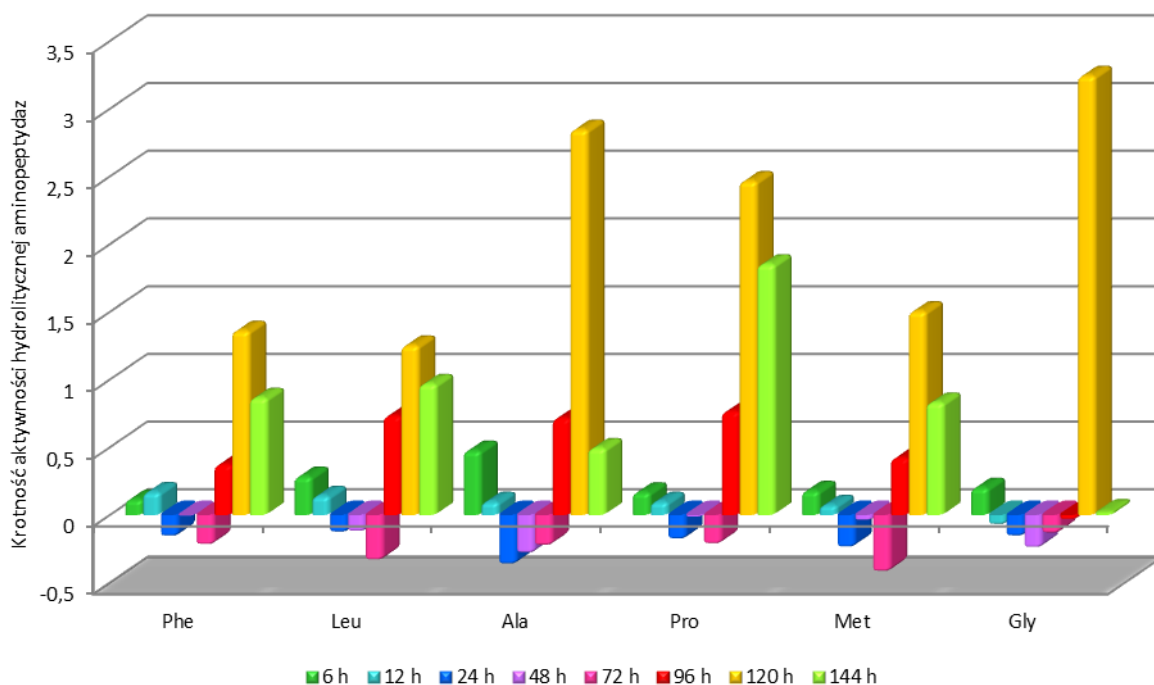


Rys.20. Profil zmian aktywności aminopeptydaz podczas pierwszych 144 h kiełkowania nasion rzepaku ozimego cv Bellevue,

Warunki: substrat 3 mM; bufor PBS pH 7,0, temperatura 37°C, słupki błędów reprezentują odchylenia standardowe średniej z trzech powtórzeń.

W przypadku kiełkującego rzepaku najwyższą aktywność zaobserwowano w stosunku do substratu z *N*-końcową fenyloalaniną, podobnie jak w nasionach. Maksimum aktywności przypadało na 120 godzinę kiełkowania i wynosiło 120 mU/mg. W dalszej kolejności hydrolyzowane były substraty z *N*-końcową leucyną i alaniną. Podczas wzrostu siewek rzepaku aktywność wobec Ala-*p*NA oraz Leu-*p*NA była zbliżona, przez większość czasu to Leu-*p*NA był efektywniej hydrolyzowany. Jednak w 120 h kiełkowania sytuacja ta uległa zmianie. Aktywność wobec Ala-*p*NA wzrosła i była wyższa o 20 mU/mg od wartości otrzymanej dla substratu z *N*-końcową leucyną. Zaskakująca zmiana w stosunku aktywności wobec tych dwóch substratów powtarzała się wielokrotnie podczas badań nad wpływem czynników stresowych na aktywność aminopeptydaz w siewkach rzepaku na tym etapie wzrostu (rozdział 5.4). W 144 godzinie, zależność ta znów się odwróciła (Ala-*p*NA - 23,6 mU/mg, Leu-*p*NA - 37,2 mU/mg). Najniższą aktywność podczas całego badanego procesu kiełkowania zaobserwowano dla Gly-*p*NA, aktywność wobec tego substratu utrzymywała się na poziomie ok. 4,5 mU/mg, aż od 120 h kiełkowania, kiedy to wzrosła prawie pięciokrotnie. Podobne zależności obserwowano dla substratów Met-*p*NA oraz Pro-*p*NA, najwyższa

aktywność wobec tych substratów obserwowana była w 120 h uprawy i wynosiła około 20 mU/mg. Dla lepszego zobrazowania zmian w aktywności aminopeptydaz w stosunku do poszczególnych substratów podczas kiełkowania, sporządzono wykres krotności zmian aktywności (rysunek 21).



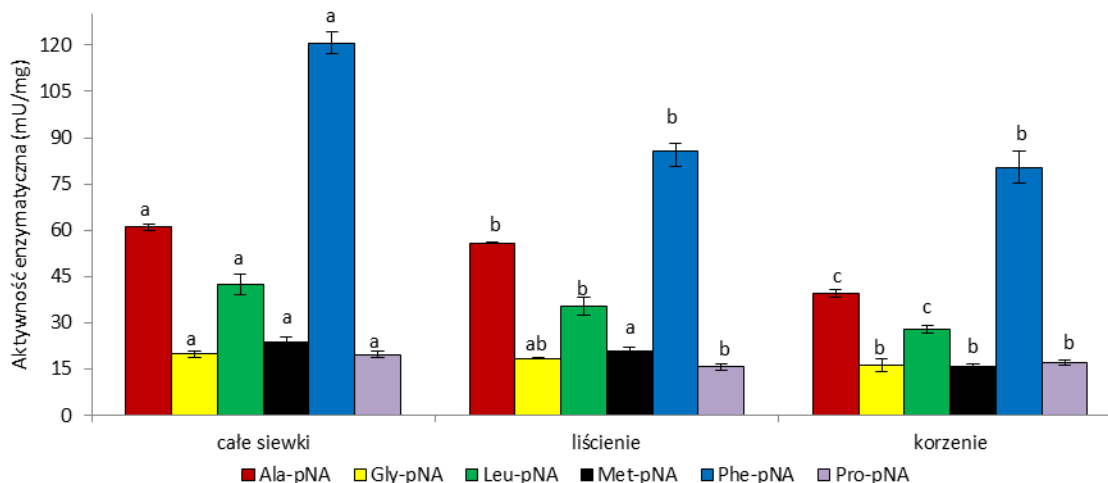
Rys.21. Zmiany w aktywności aminopeptydaz w siewkach rzepaku ozimego w porównaniu do aktywności w suchych ziarnach (0 h).

Na podstawie rysunku 21 zauważyć można pewne tendencje w zmianach aktywności aminopeptydaz w stosunku do użytych substratów. W porównaniu do aktywności oznaczonej w suchych ziarnach w 6 h wzrostu obserwuje się ogólnie umiarkowany wzrost. W późniejszym etapie (12-72 h) aktywność oscyluje wokół wartości początkowej lub jest mniejsza. Począwszy od 96 h (oprócz aktywności wobec substratu z *N*-końcową glicyną) obserwuje się wzrost aktywności, aż do maksimum w 120 h. Największy wzrost aktywności stwierdzono dla substratu z *N*-końcową glicyną (ponad trzykrotny wzrost aktywności) i alaniną (ponad 2,5-krotny wzrost aktywności). W dalszej kolejności największy wzrost w 120 h kiełkowania obserwuje się wobec substratu Pro-*p*NA. Najmniejsze zmiany w aktywności obserwuje się w stosunku do substratów z *N*-końcową leucyną i fenyloalaniną. Różnice w zmianach aktywności wobec poszczególnych substratów, mogą świadczyć o obecności więcej niż jednej aminopeptydazy lub kilku izoform enzymu w ekstraktach z siewek rzepaku ozimego. Szczególnie należy podkreślić wzrost ekspresji aminopeptydaz odpowiedzialnych za hydrolizę *N*-końcowych aminokwasów o małym łańcuchu bocznym (glicyna i alanina) oraz aminopeptydaz odpowiedzialnych za hydrolizę *N*-końcowej proliny i metioniny. Każdy z tych aminokwasów pełni istotne funkcje w metabolizmie rośliny. Glicyna jest źródłem azotu w procesie oksydacyjnej dekarboksylacji, bierze udział w procesie biosyntezy nukleotydów purynowych

i akumuluje się w roślinie narażonej na wysokie zasolenie i suszę<sup>4,192</sup>. Alanina bierze udział w ochronie rośliny przed stresem osmotycznym i stresem związanym z zasoleniem. Ponadto, pod wpływem aminotransferazy alaninowej jest bezpośrednio przekształcana w pirogronian<sup>4,192</sup>. Prolina z kolei, pełni rolę osmoprotektanta, krioprotektanta, antyoksydanta i substancji kompatybilnej w stresie solnym, a także wpływa na ekspresję licznych genów, wzrost i rozwój roślin<sup>4,192-194</sup>. Natomiast metionina jest aminokwasem inicjującym syntezę białka, a ponadto przekształcana jest w *S*-adenozylometioninę, która dalej służy jako donor metylowy w reakcjach transmetylacji i jest prekursorem syntezy etylenu, biotyny i poliamin<sup>4,192</sup>. Wzrost zawartości wybranych wolnych aminokwasów zauważono podczas kiełkowania wielu gatunków roślin np. orzachy podziemnej (metionina i prolina)<sup>195</sup>, soi i fasoli złotej (między innymi glicyna, alanina, prolina, kwas asparaginowy)<sup>196</sup>.

W każdej fazie wzrostu rzepaku (imbibicja - namaczanie, wzrost w ciemności, wzrost w świetle) obserwowano osiągnięcie pewnego maksimum aktywności, po którym następował jej spadek. Na zmiany w profilu aktywności aminopeptydaz w tym procesie mogą mieć wpływ procesy fizjologiczne zachodzące podczas kiełkowania i wzrostu roślin. Aktywność aminopeptydaz często rośnie podczas kiełkowania i rozwoju siewek, co związane może być z mobilizacją substancji zapasowych<sup>6,84,197</sup>. Ponadto dostępność wody, a w dalszej kolejności odpowiednia temperatura i światło są najważniejszymi czynnikami abiotycznymi warunkującymi kiełkowanie. Na początku wzrostu, podczas imbibicji, w roślinach zachodzi gwałtowna intensyfikacja oddychania i pobierania wody. Najpierw przeważa oddychanie beztlenowe, skutkujące gromadzeniem się etanolu, następnie wraz z rozwojem mitochondriów zaczyna dominować oddychanie tlenowe. W fazie katabolicznej następuje hydroliza substancji zapasowych nasienia, co wymaga aktywności określonych enzymów. W przebiegu kiełkowania i wzrostu biorą również udział regulatory wzrostu roślin, mające zdolność modulacji aktywności enzymów (na przykład auksyny i gibereliny)<sup>4</sup>. W zależności od badanego gatunku rośliny obserwuje się różne profile aktywności aminopeptydaz podczas kiełkowania. Przykładem mogą być opisane w literaturze aminopeptydazy z siewek jęczmienia. Nasiona jęczmienia po sterylizacji moczone przez 24 h w wodzie destylowanej, a następnie pozwolono na 48 h wzrost w ciemności. Podczas wzrostu badano aktywność aminopeptydaz w stosunku do ośmiu substratów. W przypadku siewek jęczmienia wykryto, że podczas pierwszych 24 h wzrostu, aktywność enzymów wobec badanych substratów stopniowo rosła, a następnie w 72 h spadła nawet o ok 50% dla Ala-, Gly-, Leu- i Phe-*p*NA. Natomiast aktywność wobec Arg- i Pro-*p*NA stopniowo rosła do 72 h. Aminopeptydazy jęczmienia wykazywały największą aktywność w stosunku do substratu fenyloalaninowego, a najniższą w stosunku do Gly-, His- i Pro-*p*NA. Dalsze badania wykazały istnienie co najmniej 6 aminopeptydaz w ekstraktach z siewek jęczmienia<sup>161</sup>. Natomiast dla aminopeptydazy z siewek nikili indyjskiej aktywność wobec substratu z *N*-końcówką leucyną nie zmieniała się znacząco przez analizowane pierwsze 72 h kiełkowania<sup>130</sup>.

Ekspresja i aktywność enzymów może się różnić w zależności od badanej części rośliny<sup>198</sup>. Dlatego też postanowiono zbadać poziom aktywności aminopeptydaz w korzeniach siewek, liściach oraz całych roślinach (również z łodyżkami) na etapie 120 h wzrostu. Otrzymane wyniki przedstawiono na rysunku nr 22.



Rys.22. Aktywność aminopeptydaz w korzeniach i liściach oraz w całych siewkach po 120 godzinach wzrostu.

Słupki błędów reprezentują odchylenia standardowe średniej z trzech powtórzeń, różne litery na słupkami oznaczają istotne różnice pomiędzy aktywnością wobec danego substratu, obliczone na podstawie testu Tukey'a HSD ( $\alpha=0,5$ ).

Niezależnie od rozpatrywanej części rośliny najwyższą aktywność obserwowano dla Phe-pNA jako substratu (nawet 120 mU/mg dla całych siewek), w dalszej kolejności hydrolyzowane były Ala-pNA i Leu-pNA. Aktywność wobec pozostałych substratów była na zbliżonym poziomie i najczęściej nie przekraczała 20 mU/mg. Nie stwierdzono różnic w aktywności wobec Phe-pNA w liściach i korzeniach (około 85 mU/mg). Dla Ala-pNA i Leu-pNA aktywność enzymatyczna malała w szeregu: całe siewki>liście>korzenie. Stosunek pomiędzy aktywnością wobec Phe-pNA a Gly-pNA (czyli substratem najwydajniej hydrolyzowanym i tym wobec którego oznaczono najmniejszą aktywność) wynosił dla całych siewek 6,0, natomiast dla liści i korzeni odpowiednio 4,7 i 4,9. Różnice te nie są jednak na tyle duże, by móc upatrywać przyczyny w odmiennych procesach zachodzących w poszczególnych częściach siewek rzepaku. Można zatem przypuszczać, że ekspresja genów kodujących aminopeptydazy w liściach i korzeniach siewek jest zbliżona na tym etapie wzrostu. Jednakową ekspresję aminopeptydazy leucynowej stwierdzono także w bulwach, kwiatach, korzeniach, pąkach i liściach ziemniaka<sup>74</sup>. Natomiast w siewkach pszenicy ozimej zaobserwowano różnice w aktywności aminopeptydaz w korzeniach i liściach (w stosunku do substratów z N-końcówką Gly, Leu, Lys i Met). W korzeniach rośliny obserwowano nawet 2-3-krotnie wyższą aktywność aminopeptydaz dla substratów z N-końcówką Leu, Lys i Met. W stosunku do Gly-pNA aktywność w liściach była niemal dwukrotnie wyższa niż w korzeniach.

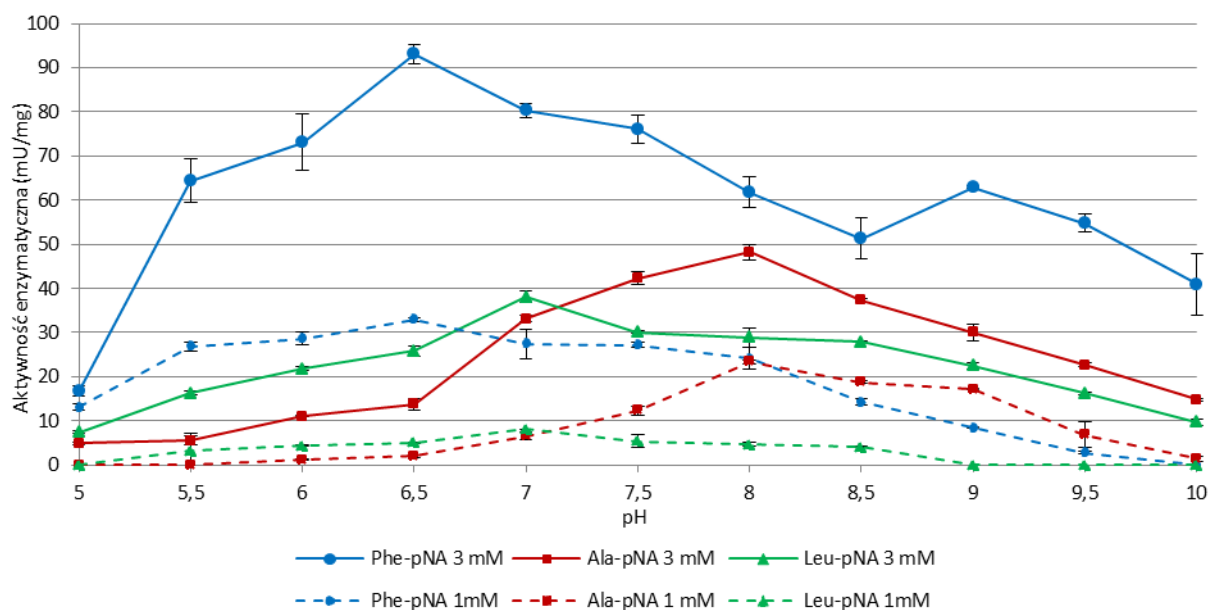
Co ciekawe, pewne różnice w aktywności aminopeptydaz występowały też między różnymi odmianami tej samej rośliny (różnice do około 10%)<sup>101</sup>.

### 5.3. Charakterystyka aminopeptydaz z ekstraktów z 120 h siewek rzepaku ozimego

Z uwagi na znaczący wzrost aktywności aminopeptydaz w 120 h uprawy siewek rzepaku, postanowiono scharakteryzować aminopeptydazy znajdujące się w ekstrakcie z roślin, na tym właśnie etapie wzrostu.

#### 5.3.1. Wpływ pH na aktywność aminopeptydaz w siewkach rzepaku

Różnice we wpływie pH na aktywność aminopeptydaz w zależności od stosowanego substratu są znane dla aminopeptydaz z kukurydzy i jęczmienia<sup>174,177</sup>. Badanie wpływu pH na aktywność aminopeptydaz z siewek rzepaku, przeprowadzono wobec trzech substratów (stosując dwa stężenia każdego substratu). Otrzymany wykres zależności aktywności aminopeptydaz z 120 h siewek rzepaku ozimego przedstawiono na rysunku nr 23.



Rys.23. Zależność aktywności aminopeptydaz w ekstrakcie ze 120 h siewek rzepaku ozimego od pH.

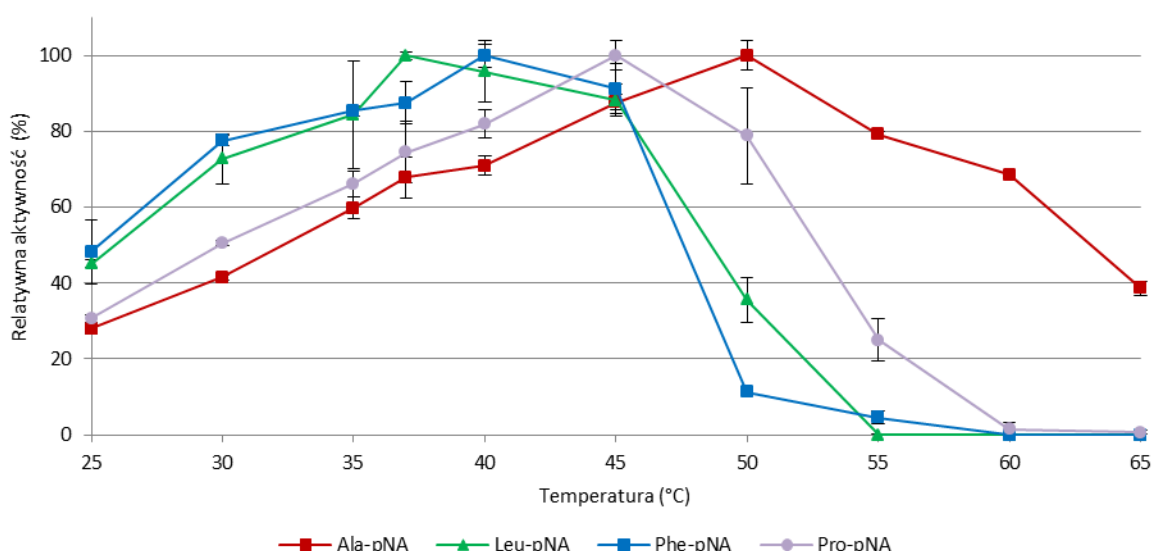
Oznaczenia wykonano dla trzech różnych substratów (Ala-pNA, Leu-pNA i Phe-pNA) stosując dwa stężenia (3 i 1 mM), w 50 mM buforach: octanowo sodowym (pH 5,0-5,5), PBS (pH 6,0-7,0), Tris-HCl (pH 7,5-8,5) i sodowo-węglanowym (pH 9,0-10,0), aktywność mierzono w temp. 37°C, przez 10 minut; słupki błędów reprezentują odchylenia standardowe średniej z trzech powtórzeń

W zależności od stosowanego substratu maksimum aktywności obserwowano przy innej wartości pH. Dla Phe-pNA (3 mM) najwyższą aktywność zanotowano przy pH 6,5. W zakresie pH 5,5 – 8,0 enzymy zachowywały ponad 60% swojej maksymalnej aktywności. Analizując profil aktywności zauważono również drugi pik przy pH 9,0, co może sugerować obecność więcej niż jednej aminopeptydazy). Najniższą aktywność w badanym zakresie pH obserwowano przy 5,0 Podobną

zależność obserwowano dla aminopeptydazy z kiełkujących nasion sosny zwyczajnej, gdzie najwyższą aktywność wobec substratu z *N*-końcową fenyloalaniną odnotowano również w pH 6,5<sup>199</sup>. Dla substratu Ala-*p*NA, maksymalną aktywność hydrolityczną obserwowano w pH 8,0. Pokrywa się to z aktywnością oznaczoną dla plastydowej aminopeptydazy alanylowej z kiełkującego buraka cukrowego (optimum pH powyżej 8,0 substrat z *N*-końcową alaniną)<sup>200</sup>. W przypadku Leu-*p*NA jako substratu, najwyższą aktywność obserwowano w pH 7,0. Wśród aminopeptydaz wyizolowanych z siewek, rozróżnić można kilka enzymów o optimum pH oscylującym wokół 7,0 wobec substratu Leu-*p*NA. Przykładem może być aminopeptydaza leucynowa z *simondsii* kalifornijskiej (*jojoba*), w której maksimum aktywności przypadało na pH 6,9<sup>201</sup>, czy aminopeptydaza leucynowa z bobu o najwyższej aktywności przy pH 7,5<sup>82</sup>. Przy stosowaniu niższego stężenia substratu (1 mM) profile aktywności aminopeptydaz były niemal identyczne (odpowiednio niższe wartości aktywności właściwej). Przy oznaczaniu profilu aktywności aminopeptydaz obecnych w ekstrakcie z siewek rzepaku, w zależności od pH, należy brać pod uwagę możliwość występowania więcej niż jednej aminopeptydazy, ale także więcej niż jednej izoformy danego enzymu<sup>81,161</sup>.

### 5.3.2. Wpływ temperatury na aktywność aminopeptydaz w siewkach rzepaku

Określono wpływ temperatury na aktywność aminopeptydaz z 120 h siewek rzepaku ozimego. Oznaczenia wykonano dla czterech substratów, w zakresie temperatur 25-65°C. Otrzymane wyniki przedstawiono na rysunku 24..



Rys.24. Wpływ temperatury na aktywność aminopeptydaz z 120 h siewek rzepaku ozimego

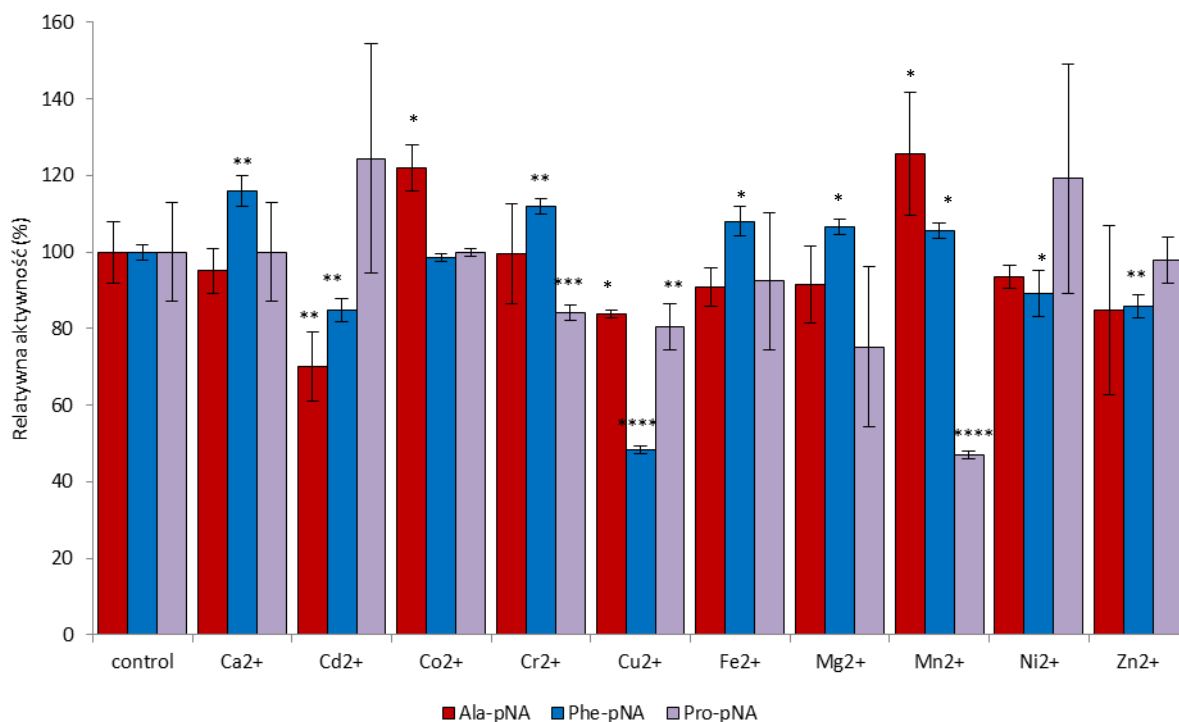
Substraty (Ala-*p*NA, Leu-*p*NA, Phe-*p*NA oraz Pro-*p*NA), zakres temperatur: 25-65°C, pomiary prowadzono w 50 mM buforze PBS o pH 7,0 relatywna aktywność (%) – jako 100% przyjęto najwyższą aktywność dla danego substratu; słupki błędów reprezentują odchylenia standardowe średniej z trzech powtórzeń

Jak można zauważyć, temperatura, w której enzymy osiągały maksimum aktywności była różna, w zależności od stosowanego substratu. Dla substratów Leu-*p*NA, Phe-*p*NA, Pro-*p*NA i Ala-*p*NA maksimum aktywności przypadało odpowiednio na 37, 40, 45 i 50°C. W przypadku Pro-*p*NA, w temperaturze powyżej 45°C, aktywność enzymatyczna gwałtownie spadała. Podobna sytuacja miała miejsce przy stosowaniu pochodnej leucyny jako substratu. Dla Ala-*p*NA, powyżej temperatury 50°C, następował stosunkowo łagodny spadek aktywności, a w temperaturze 65°C enzym zachował prawie 40% maksymalnej aktywności. Otrzymane wyniki dla substratu z *N*-końcową fenyloalaniną i alaniną były niemal identyczne jak uzyskane dla optimum temperatury dla oczyszczonej aminopeptydazy z nasion rzepaku ozimego. Wyjątek stanowiła stosunkowo wysoka aktywność aminopeptydaz wobec Ala-*p*NA, w temperaturze 65°C. Można wnioskować, że enzym odpowiedzialny za hydrolizę tego substratu jest bardziej stabilny w wyższych temperaturach, niż enzymy hydrolizujące pozostałe substraty. Alanina to ważny aminokwas, którego poziom rośnie w odpowiedzi na stres osmotyczny, alanina chroni również strukturę białek przed skutkami zbyt wysokiego zasolenia<sup>4</sup>. Można zatem przypuszczać, że aktywność aminopeptydazy alaninowej w tak szerokim spektrum temperatur jest związane z udziałem tego enzymu w odpowiedzi na stres temperaturowy. Otrzymane wyniki były zbliżone do danych literaturowych. Przykładowo, optimum temperaturowe dla siewek z pszenżyta (substrat Pro-βNA) i liścieni rzodkwi japońskiej (substrat z *N*-końcową fenyloalaniną) przypadało na 37°C<sup>42,45</sup>. U innych gatunków roślin, najwyższą aktywność obserwowano w wyższych temperaturach (na przykład aminopeptydaza z liści z nikli indyjskiej – optimum w temperaturze 40-50°C dla Leu-*p*NA)<sup>67</sup>.

### 5.3.3. Wpływ soli metali na aktywność aminopeptydaz w siewkach rzepaku

W ramach niniejszej pracy przeprowadzono również badania wpływu dwuwartościowych jonów metali na aktywność aminopeptydaz w siewkach rzepaku, zebranych w 120 h uprawy. Zastosowano trzy substraty (Ala-*p*NA, Phe-*p*NA i Pro-*p*NA). Ekstrakty białkowe z siewek inkubowano z roztworami soli metali o stężeniu 0,1 mM przez 1 h, w temperaturze 4°C. Do badań zastosowano następujące związki: CaCl<sub>2</sub>, CdCl<sub>2</sub>, CoCl<sub>2</sub>, CrCl<sub>2</sub>, CuCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, FeSO<sub>4</sub>, MgCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub>·14H<sub>2</sub>O, NiCl<sub>2</sub> i ZnCl<sub>2</sub>. Wyniki przedstawiono na rysunku 25.





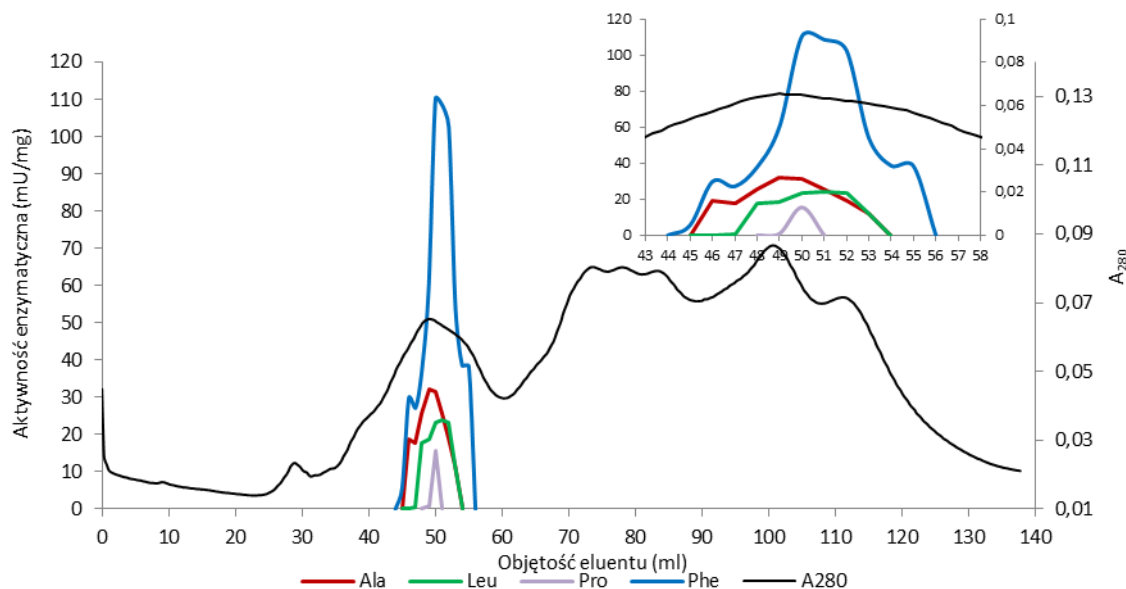
Rys.25. Wpływ soli wybranych metali dwuwartościowych na aktywność aminopeptydaz z 120 h siewek rzepaku  
 Substraty: Ala-pNA, Phe-pNA, Pro-pNA (1 mM), sole metali (0,1 mM roztwory wodne); słupki błędów reprezentują odchylenia standardowe  
 średniej z trzech powtórzeń, gwiazdki nad słupkami oznaczają poziom istotności (p) obliczony z wykorzystaniem  
 testu t-Studenta (n=3), (\*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001, i \*\*\*\*p < 0,0001).

W zależności od użytego substratu zaobserwowano różną aktywność aminopeptydaz w obecności soli metali. W przypadku Ala-pNA nie stwierdzono znaczących różnic w aktywności po zastosowaniu soli wapnia, chromu, żelaza, magnezu, niklu czy cynku. Wzrost aktywności zaobserwowano po inkubacji z Co<sup>2+</sup> i Mn<sup>2+</sup>, spadek zaś po zastosowaniu soli kadmu (spadek o 30%) i miedzi (spadek o około 15%). Dla substratu z N-końcową fenyloalaniną działanie aktywujące wykazywały jony Ca<sup>2+</sup> i Cr<sup>2+</sup> (wzrost aktywności o około 15%). Jony Fe<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> i Mn<sup>2+</sup> miały umiarkowany, aktywujący wpływ na badane enzymy (6-8%). Natomiast przy stosowaniu związku kobaltu nie zaobserwowano zmian w aktywności badanych enzymów. Spadek aktywności wobec Phe-pNA odnotowano po inkubacji z roztworami soli miedzi (ponad 50% utraty aktywności), kadmu, cynku i niklu. W przypadku ostatniego z rozpatrywanych substratów (Pro-pNA) jony Cr<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup> i Mn<sup>2+</sup> obniżyły aktywność aminopeptydaz, pozostałe sole nie wpływały znacząco na aktywność badanych aminopeptydaz. Obserwuje się podobieństwo wyników otrzymanych dla enzymów w siewkach z otrzymanymi dla oczyszczonej aminopeptydazy z suchych nasion rzepaku (w stosunku do Phe-pNA). W obu przypadkach obserwuje zbliżone działanie soli miedzi i kadmu. W przypadku aminopeptydazy z nasion nie obserwowano znaczącej aktywacji enzymu żadną z badanych soli metalu. Obserwowane różnice, pomiędzy działaniem poszczególnych soli metali w przypadku stosowania różnych substratów, mogą świadczyć o obecności więcej niż jednej aminopeptydazy

w badanym ekstrakcie białkowym. Otrzymane wyniki są zbliżone do badań wpływu jonów metali na aktywność innych aminopeptydaz pochodzenia roślinnego (najczęściej jednak publikowane są badania, w których użyto tylko jednego (preferowanego) substratu). Przykładowo podobny inhibicyjny wpływ dwuwartościowych soli miedzi cynku i kadmu znany jest dla aminopeptydazy prolinowej z siewek pszenżyta<sup>45</sup>. Inhibicyjne działanie jonów miedzi niezależnie od stosowanego substratu jest cechą charakterystyczną dla aminopeptydaz leucynowych<sup>82</sup>. W dostępnej literaturze odnotowuje się zjawisko inhibicji aktywności aminopeptydaz i iminopeptydaz przez sole cynku, miedzi i ołowiu<sup>38,45,74,202</sup>. Według danych literaturowych jony  $Mg^{2+}$  i  $Mn^{+2}$  mają aktywujący wpływ na aminopeptydazy z nikli indyjskiej<sup>67</sup>, nasion jęczmienia<sup>36</sup> oraz ziemniaka<sup>74</sup>.

#### 5.3.4. Oszacowanie masy molekularnej aminopeptydaz z 120 h siewek rzepaku ozimego

Na podstawie wyników badań nad wpływem temperatury i pH oraz wybranych soli metali można wywnioskować, że w ekstraktach białkowych z siewek rzepaku po 120 h wzrostu, znajduje się więcej niż jedna aminopeptydaza. Sposobem na udowodnienie tej hipotezy jest próba rozdzielania tych enzymów za pomocą filtracji żelowej oraz technik elektroforetycznych, a następnie określenie ich masy molekularnej. Pierwszą użytą techniką była filtracja żelowa, na kolumnie wypełnionej żelem Sephacryl HR-300 (rysunek 26).

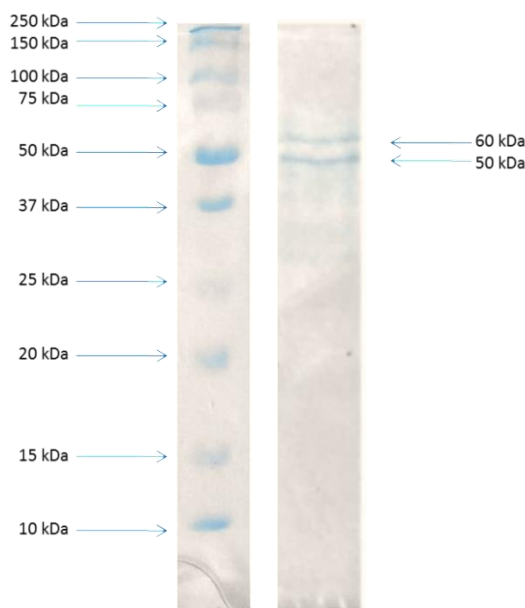


Rys.26. Profil elucji białek obecnych w ekstrakcie z 120 h siewek rzepaku, z zaznaczonymi poziomami aktywności aminopeptydaz wobec czterech substratów (Ala-, Leu-, Phe- i Pro-pNA); na rysunku powiększono fragment odpowiadający frakcjom 43 - 58

Parametry chromatografii żelowej: eluent: 50 mM bufor PBS (pH 7,0) z dodatkiem 0,1 M NaCl, natężenie przepływu: 12 ml/min, objętość frakcji: 1 ml, złoże Sephacryl HR-300 (1x50 cm)

W wyniku przeprowadzonego eksperymentu otrzymano, nierozdzielone 3-4 piki aktywności względem Phe-*p*NA, (frakcje 46, 50, 52 i 55). Najwyższą aktywność oznaczono we frakcji 50, co odpowiada masie molekularnej około 59,5 kDa. Frakcje analizowano również pod kątem aktywności wobec substratów Ala-*p*NA, Leu-*p*NA i Pro-*p*NA. Maksimum aktywności wobec substratu z *N*-końcową alaniną przypadało na frakcję 49, co odpowiadało masie 68,5 kDa. Maksimum aktywności wobec substratu z *N*-końcową proliną wykryto we frakcji 50 (co odpowiada masie molekularnej 59,5 kDa). Aktywność wobec Leu-*p*NA była najwyższa w 52 frakcji (45 kDa). Profile aktywności wobec poszczególnych substratów nakładają się na siebie. Stosunki aktywności wobec poszczególnych substratów są w zgodzie z wynikami otrzymanymi przy określaniu specyficzności substratowej aminopeptydaz z siewek rzepaku. Otrzymany profil elucji i aktywności jest również bardzo zbliżony do otrzymanego z białkowego ekstraktu z nasion rzepaku ozimego (rysunek 12, rozdział 5.1.2). Świadczy to najprawdopodobniej o obecności dwóch lub więcej aminopeptydaz o stosunkowo zbliżonej masie.

Następnie przeprowadzono elektroforezę SDS-PAGE. Na żel elektroforetyczny nałożono tylko białko z aktywnych frakcji zebranych po filtracji żelowej. Po elektroforezie, wybarwieniu uległy dwa prążki białkowe (rysunek 27).



Rys. 27. Wyniki elektroforezy SDS-PAGE frakcji aktywnych po filtracji żelowej ekstraktu białkowego z siewek rzepaku ozimego; po lewej: SDS PAGE standardów białkowych; po prawej: fragment żelu po elektroforezie z dwoma wybarwionymi prążkami białkowymi o masach ok. 50 i 60 kDa

Warunki elektroforezy: 60 V przez pierwsze 15 minut (wnikanie białek do żelu zatężającego), a następnie przy 130 V przez 1,5 h (migracja białek w żelu rozdzielającym)

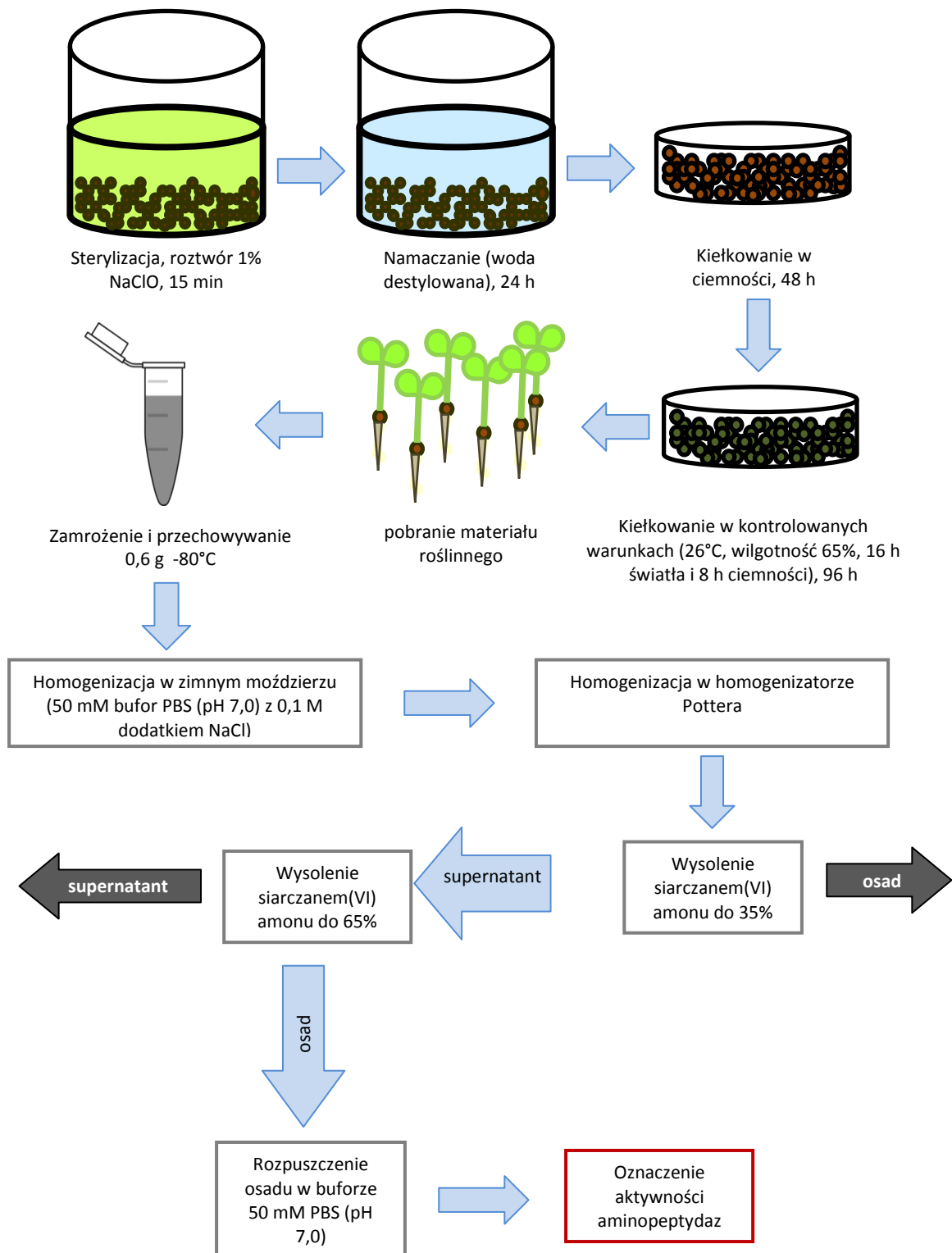
Dla jednego z wybarwionych białek, na podstawie standardów białkowych, określono masę molekularną na poziomie około 50 kDa, co wydaje się korespondować z białkiem o masie 45 kDa (maksimum aktywności wobec Leu-*p*NA), oznaczonym za pomocą filtracji żelowej. Dla drugiego wybarwionego białka określono masę molekularną na poziomie około 60 kDa, co jest bardzo zbliżone dla wartości 59,5 kDa (masa molekularna białka o maksimum aktywności wobec Phe- i Pro-*p*NA). Na żelu nie zaobserwowano pasma pochodzącego od białka o masie 68,5 kDa, odpowiadającego maksimum aktywności wobec Ala-*p*NA. Otrzymane wyniki są w zgodzie z otrzymanymi w poprzednich badaniach nad aminopeptydazami z nasion rzepaku (rysunek 18, rozdział 5.1.3.5). W przypadku oczyszczonego preparatu otrzymano jednak tylko jeden prążek o wyliczonej masie molekularnej 60 kDa<sup>81</sup>. Uzyskane badania są również zgodne z wynikami badań otrzymanymi dla innych roślin oleistych np. aminopeptydaz z liścieni orzeszka ziemnego (55–60 kDa)<sup>185</sup>. Także w niektórych zbożach (np. jęczmień, 58 kDa) masa molekularna oscyluje wokół podobnych wartości<sup>36</sup>.

#### **5.4. Wpływ wybranych czynników abiotycznych i hormonów roślinnych na aktywność aminopeptydaz w siewkach rzepaku ozimego**

Wzrost roślin determinowany jest przez wiele czynników, które można podzielić na abiotyczne i biotyczne. Wśród czynników abiotycznych rozróżnić można czynniki fizyczne (drgania mechaniczne, promieniowanie, warunki klimatyczne, w tym ciśnienie, temperatura i inne) i chemiczne (skład chemiczny gleb i wód, zasolenie i trucizny środowiskowe np. związki siarki, WWA, metale ciężkie czy pestycydy). W badaniach nad wpływem wybranych czynników abiotycznych na aktywność aminopeptydaz w rzepaku ozimym zastosowano: niską temperaturę i ograniczenie dostępu do światła (czynniki fizyczne). Jako czynniki abiotyczne chemiczne zastosowano sole siarki, fosforu, potasu, wapnia, magnezu i azotu (przedstawiciele makroelementów), sole miedzi, żelaza, manganu, boru, cynku, molibdenu i niklu (mikroelementy) oraz sole dwóch metali ciężkich: ołowiu i rtęci. Ponadto, zbadano wpływ dwóch fitohormonów (kwasu abscysynowego i jasmonianu metylu).

(Zmiany w ekspresji genów kodujących aminopeptydazy przekładają się na zmiany w aktywności tych enzymów. Wszelkie opisane różnice w aktywności aminopeptydaz związane są ze zmianą w ekspresji genów kodujących te enzymy (zwiększeniem ilości enzymu w komórce) i nie mają nic wspólnego ze zmianą funkcjonowania samego enzymu. Stosowanie skrótu myślowego „zmiana/wzrost/spadek aktywności aminopeptydaz” ma na celu ułatwienie odbioru tekstu.)

Badania nad wpływem czynników abiotycznych na aktywność aminopeptydaz przeprowadzono w czasie procesu kiełkowania. Etapy kiełkowania oraz proces pobierania materiału roślinnego przedstawiono schematycznie na rysunku 28.

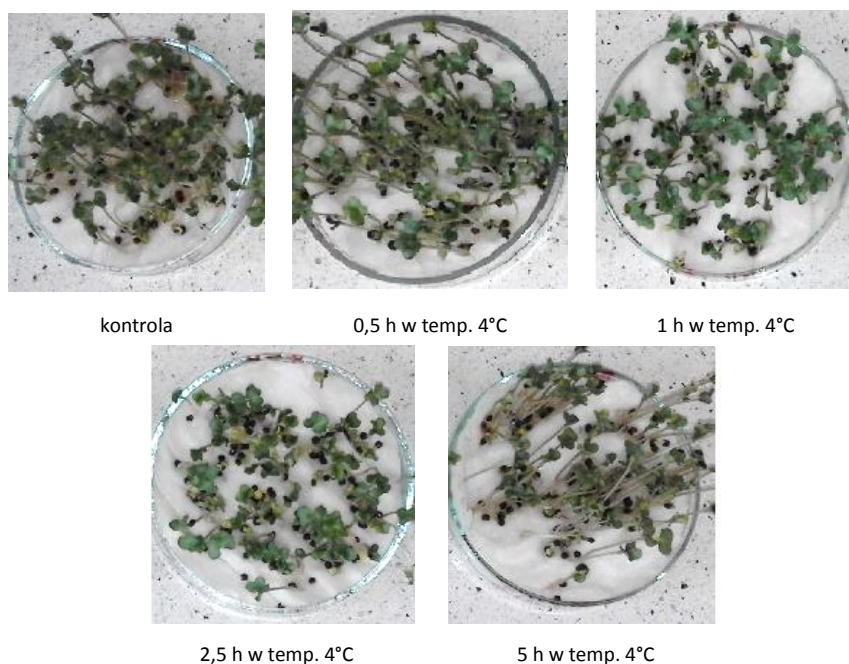


Rys.28. Standardowe warunki i tryb uprawy siewek rzepaku ozimego

Procedurę uprawy rzepaku oraz pobierania próbek opracowano na podstawie literatury<sup>45,161,203</sup> i zaadaptowano do szybkości kiełkowania badanej odmiany rzepaku. W momencie zbioru, siewki w próbie kontrolnej znajdowały się na etapie 10 w skali BBCH (liścienie całkowicie rozwinięte)<sup>2</sup>. Pozwoliło to na ocenę różnic we wzroście roślin w zależności od stosowanego czynnika. Ponadto, stosunkowo krótki czas uprawy ograniczał możliwość zakażenia uprawy np.; grzybami chorobotwórczymi.

#### 5.4.1. Wpływ niskiej temperatury

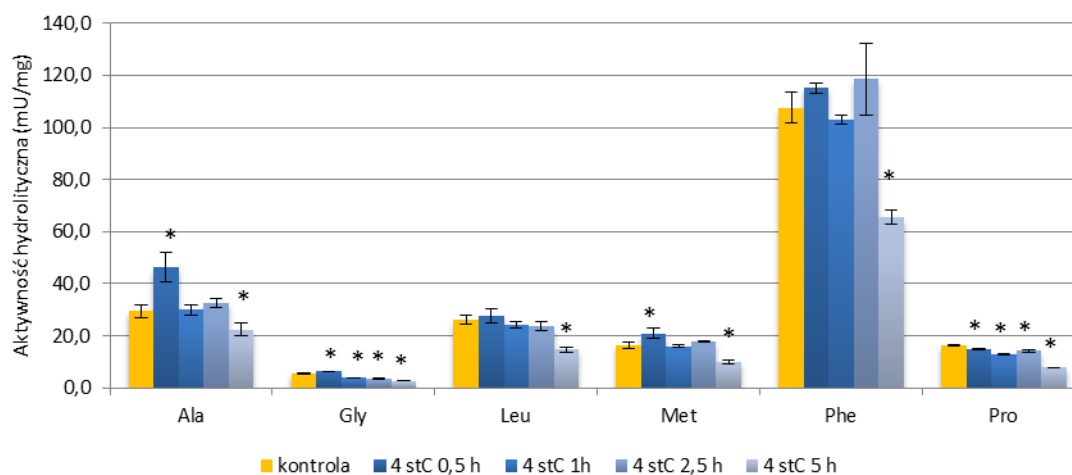
Niska temperatura stanowi jeden z najważniejszych czynników, mogących działać negatywnie na wzrost i rozwój roślin<sup>4</sup>. Wpływ niskiej temperatury na siewki rzepaku badano inkubując je w temperaturze 4°C przez 0,5, 1, 2,5 i 5 h, w 5 i 6 dobie wzrostu. Z uwagi na wysoką mrozoodporność badanej odmiany rzepaku nie spodziewano się istotnych różnic w aktywności aminopeptydaz. W wyniku działania tego czynnika nie zauważono istotnych różnic pomiędzy wzrostem i rozwojem siewek rzepaku, szczególnie przy inkubacji przez okres 0,5-2,5 h (rysunek 29). Widać natomiast różnice w jakości siewek, w przypadku pięciogodzinnego narażenia siewek na niską temperaturę (siewki były mniej zielone i o dłuższych łodyżkach niż rośliny kontroli).



Rys.29. Wpływ niskiej temperatury na wzrost siewek rzepaku ozimego

*Uprawa w trybie: 24 h imbibicji + 48 h kiełkowania w ciemności + 96 h kiełkowania w świetle w kontrolowanych warunkach (26°C, wilgotność 65%, 16 h światła i 8 h ciemności). Czynniki: niska temperatura (4°C) w 5 i 6 dobie wzrostu przez odpowiednio 0,5, 1, 2,5 lub 5 h.*

W badaniach aktywności aminopeptydaz zawartych w ekstraktach z 144 godzinnych siewek zaobserwowano umiarkowany wzrost aktywności hydrolitycznej, szczególnie w przypadku roślin inkubowanych przez 0,5 h, w temperaturze 4°C (dla substratów z *N*-końcową alaniną, glicyną oraz metioniną) (rysunek 30).



Rys.30. Wpływ niskiej temperatury na aktywność aminopeptydaz w ekstraktach białkowych

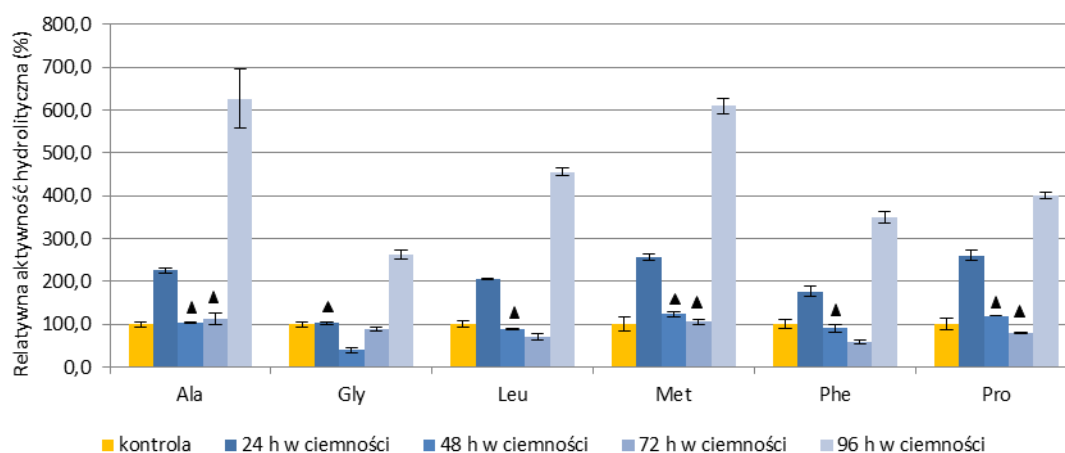
50 mM bufor PBS o pH 7,0; stężeniu substratu w próbce: 1 mM; 100% przypisano aktywności wobec danego substratu uzyskanej dla próby kontrolnej; słupki błędów reprezentują odchylenia standardowe średniej z trzech powtórzeń; gwiazdki nad słupkami oznaczają, że dany wynik jest istotny statystycznie; poziom istotności ( $p < 0,05$ ) obliczony z wykorzystaniem testu *t*-Studenta ( $n=3$ ).

Dla pozostałych prób, obserwowano albo spadek aktywności, albo brak różnic w porównaniu z kontrolą. Największy spadek aktywności w stosunku do wszystkich substratów (o około 50%) zaobserwowano dla ekstraktów z roślin przebywających najdłużej w niskiej temperaturze (5 h). Doniesienia literaturowe dotyczące wpływu niskiej temperatury na aktywność aminopeptydaz nie są jednoznaczne. Znany jest zarówno wpływ aktywujący jak i inhibujący tego czynnika na aktywność aminopeptydaz metioninowych pochodzenia roślinnego<sup>68,100</sup>. Brak jest doniesień dotyczących roślinnych aminopeptydaz leucynowych, prolinowych czy innych. Z uwagi na znaczenie proliny jako krioprotektanta<sup>194</sup> spodziewano się raczej wzrostu aktywności hydrolitycznej w stosunku do substratu z *N*-końcową prolina. Być może, spadek aktywności aminopeptydaz w siewkach najdłużej przebywających w niskiej temperaturze wynika ze spowolnienia metabolizmu. Należy również pamiętać, że poszczególne gatunki roślin, a nawet odmiany różnią się od siebie tolerancją na niską temperaturę. Rzepak ozimy jest rośliną o stosunkowo dobrej mrozoodporności. Jest ona jednak w dużej mierze uwarunkowana stopniem przedzimowego zahartowania roślin<sup>2</sup>. O takim zjawisku nie może być mowy w warunkach przeprowadzonych eksperymentów i dla tak młodych roślin, jak badane siewki rzepaku. Możliwe, że zastosowane warunki były zbyt łagodne by móc zaobserwować większe różnice w aktywności aminopeptydaz.

#### 5.4.2. Wpływ ograniczenia dostępu do światła

Ograniczenie dostępu do światła wpływa znacząco na wzrost i rozwój roślin. W zależności od długości okresu ograniczenia dostępu do światła, odpowiedź rośliny może przybrać formę od fotosyntetycznej aklimatyzacji do wędnięcia roślin. Zależne jest to zarówno od gatunku rośliny, jak i jej wieku, a nawet od tego, czy w cieniu znajduje się cała roślina czy tylko jej fragmenty<sup>204</sup>.

Wpływ ograniczenia dostępu do światła na aktywność aminopeptydaz rzepaku, zbadano stosując metodykę uprawy przedstawioną na rysunku 28, do etapu kiełkowania w ciemności (48 h). Po tym etapie rośliny przeniesiono do pomieszczenia o kontrolowanych warunkach temperatury, wilgotności i naświetlenia. Poza próbą kontrolną, rośliny zostały zakryte nieprzepuszczającym światła naczyniem na 24, 48, 72 i 96 h. Po tym czasie naczynie usunięto. Wszystkie rośliny zebrano w tym samym czasie (144 h uprawy). Wzrost i wygląd siewek poszczególnych prób nie różnił się od próby kontrolnej. Wpływ zastosowanych warunków na aktywność aminopeptydaz w ekstraktach białkowych z siewek rzepaku przedstawiono na rysunku 31. Dla lepszego zobrazowania różnic w ekspresji aminopeptydaz w siewkach rzepaku ozimego, w zależności od zastosowanych warunków, wyniki przedstawiono jako relatywną aktywność. Jako 100% przyjęto aktywność aminopeptydaz w ekstrakcie białkowym z siewek próby kontrolnej, wyznaczoną dla każdego z substratów. Szereg aktywności wobec poszczególnych substratów przedstawiał się tak samo jak w próbie kontrolnej: Phe-*p*NA>Ala-*p*NA>Leu-*p*NA>Met-*p*NA>Pro-*p*NA>Gly-*p*NA.



Rys.31. Wpływ ograniczenia dostępu do światła na aktywność aminopeptydaz w ekstraktach białkowych rzepaku ozimego

50 mM bufor PBS o pH 7,0; stężenie substratu w próbce: 1 mM; 100% przypisano aktywności wobec danego substratu uzyskanej dla próby kontrolnej; słupki błędów reprezentują odchylenia standardowe średniej z trzech powtórzeń; trójkąty nad słupkami oznaczają, że dana wartość nie różni się statystycznie od kontroli (poziom istotności ( $p < 0,05$ ) obliczony z wykorzystaniem testu *t*-Studenta ( $n=3$ )).

Zaobserwowano zwiększenie aktywności aminopeptydaz w ekstraktach białkowych z siewek rzepaku po 24 h wzrostu w ciemności (wzrost o 70-170% dla wszystkich substratów z wyjątkiem Gly-*p*NA). Natomiast w przypadku siewek przebywających w ciemności przez 48 i 72 h, aktywność



aminopeptydaz różniła się niewiele od kontroli. Jedynie dla substratu z *N*-końcową glicyną zanotowano spadek o ponad 60%, przy ograniczeniu dostępu do światła przez 48 h. Największe zmiany w aktywności aminopeptydaz zaobserwowano w roślinach hodowanych przez cały czas w ciemności (tzn. najpierw kiełkowanie w ciemności, a potem 96 h wzrostu w ciemności). W tym przypadku uzyskano ponad 5-krotny wzrost wobec Ala-*p*NA i Met-*p*NA jako substratów. Dla Leu-*p*NA aktywność wzrosła o ponad 356%, a dla substratu z *N*-końcową proliną o 300%. Zwiększenie aktywności o 250% zaobserwowano dla Phe-*p*NA, a o 163% dla Gly-*p*NA.

Ze względu na brak literatury na temat wpływu ograniczenia dostępu światła na ekspresję genów kodujących aminopeptydazy w roślinach, można jedynie sugerować, że obserwowany wzrost aktywności tych enzymów wynikał z intensyfikacji procesu mobilizacji substancji zapasowych. Proces ten miał zapewnić roślinie konieczne do wzrostu związki, które w normalnych warunkach są syntetyzowane z wykorzystaniem światła, w procesie fotosyntezy. Jak wiadomo, enzymy hydrolityczne, w tym aminopeptydazy, katalizują reakcje degradacji substancji zapasowych<sup>84</sup>. Niewielki wzrost aktywności aminopeptydaz na początku hodowli w ciemności, mógł wynikać z odpowiedzi rośliny na czynnik stresowy (siewki podczas przeniesienia do pomieszczenia o kontrolowanych warunkach temperatury i wilgotności były narażone na światło (około 1 minuty)). Po tym czasie roślina prawdopodobnie dostosowywała się do „nowych” warunków, a uruchomienie alternatywnego sposobu (ścieżki metabolicznej) zapewnienia odpowiednich związków, siły redukcyjnej, a także energii wymagało dłuższego czasu. Takie wyniki potwierdziły znaczący udział aminopeptydaz, w procesach mających na celu zapewnienie roślinie koniecznych do wzrostu składników, szczególnie w warunkach stresowych.

#### 5.4.3. Wpływ wybranych makroelementów

Do makroelementów niezbędnych każdej roślinie zaliczyć można następujące pierwiastki: azot, fosfor, potas, siarkę, wapń, magnez i chlor. Bardzo często w literaturze opisywane są skutki niedoboru poszczególnych pierwiastków niezbędnych<sup>4</sup>.

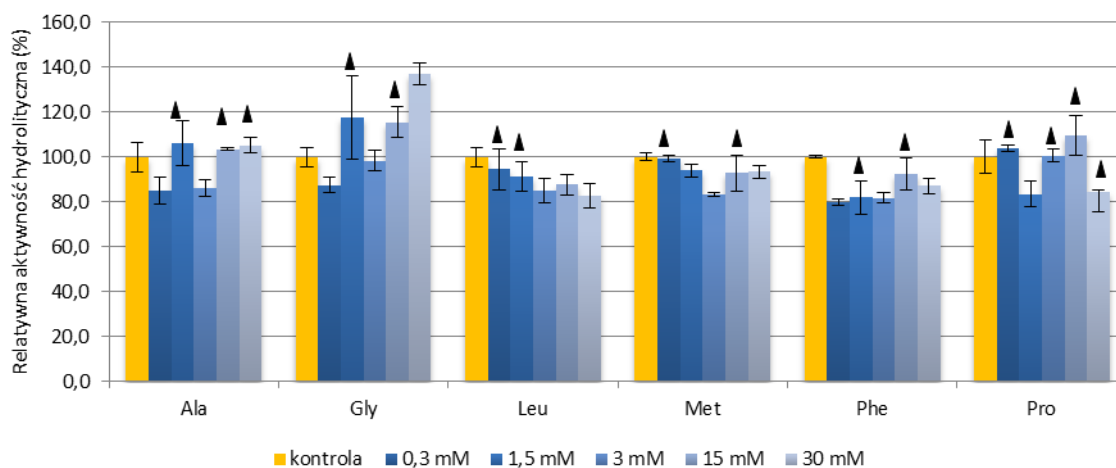
Zbadano wpływ wybranych makroelementów (siarki, fosforu, potasu, wapnia, magnezu i azotu), w postaci roztworów soli do podlewania, o stężeniach: 0,3, 1,5, 3, 15 i 30 mM. Użyto następujących związków: (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, KCl, MgCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub> i NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>. Podane substancje często stanowią składniki środków do nawożenia upraw<sup>4,205,206</sup>. Poniżej przedstawiono zdjęcia roślin tylko dla tych eksperymentów, w których zastosowane roztwory soli widocznie wpływały na wzrost i rozwój siewek. W przypadku KCl, CaCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub> i NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> nie stwierdzono różnic w wyglądzie siewek poddanych działaniu tych soli.

#### 5.4.3.1. Wpływ azotu

Azot jest najważniejszym z makroelementów. Wchodzi w skład kwasów nukleinowych, białek, chlorofilu i cytokin. Roślinne tkanki mogą zawierać do 6% azotu w suchej masie. Jego niedobór jest czynnikiem silnie ograniczającym wzrost roślin<sup>4</sup>. Nawożenie azotem, gdy to możliwe, powinno być przeprowadzane często, w mniejszych dawkach (szczególnie w okresie intensywnego wzrostu). W warunkach uprawy polowej jest to jednak trudne do wykonania i mało opłacalne<sup>2</sup>. Sumarycznie dawka azotu w nawozach dla upraw rzepaku powinna wynosić od 100-200 kg N/ha<sup>207</sup>. Azot pobierany jest przez rośliny w postaci jonów  $\text{NO}_3^-$  i  $\text{NH}_4^+$  (z czego jon  $\text{NO}_3^-$  jest najważniejszym źródłem azotu)<sup>4</sup>. Dlatego też w eksperymencie użyto  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (roztwory 0,3, 1,5, 3,0, 15 i 30 mM). Stosowanie roztworów o podanych stężeniach odpowiada sumarycznie dawkom azotu od 1,3 kg N/ha (dla stężenia 0,3 mM) do 132,1 kg N/ha (stężenie 30 mM).

Użyte dawki są mniejsze lub mieszczą się w zakresie ilości stosowanych w uprawie polowej. Ze względu na młody wiek roślin oraz, fakt, że nie są uprawiane w glebie, a na sztucznym podłożu, zastosowane stężenia nie powinny być bezpośrednio porównywane z dawkami polowymi. Uwaga ta dotyczy wszystkich eksperymentów z makroelementami. Przypuszczać można, że w przypadku braku istotnych różnic w wyglądzie siewek, nie doszło do przekroczenia optymalnych dawek dla danego makroelementu.

Siewki w momencie zbioru nie różniły się od próby kontrolnej podlewanej wodą destylowaną. Najprawdopodobniej stosowane stężenia azotanu(V) amonu nie przekraczały zalecanej dawki. Zmiany w aktywności aminopeptydaz przedstawiono na rysunku 32.



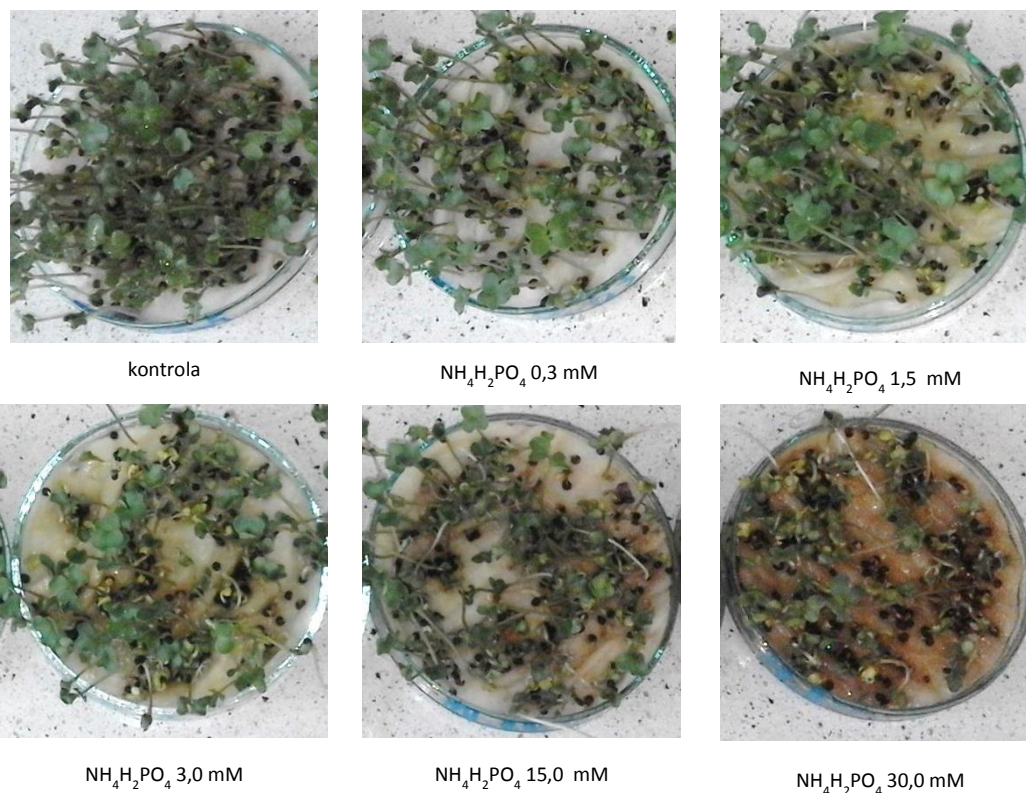
Rys.32. Wpływ podlewania roztworami  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  na aktywność aminopeptydaz w siewkach rzepaku po 144 h uprawy

*Pomiary prowadzono w 50 mM buforze PBS o pH 7,0; stężenie substratu w próbce: 1mM; 100% przypisano aktywności wobec danego substratu uzyskanej dla próby kontrolnej; słupki błędów reprezentują odchylenia standardowe średniej z trzech powtórzeń; trójkąty nad słupkami oznaczają, że dana wartość nie różni się statystycznie od kontroli (poziom istotności ( $p < 0,05$ ) obliczony z wykorzystaniem testu t-Studenta ( $n=3$ )).*

Nie zaobserwowano znaczących zmian w aktywności aminopeptydaz w ekstraktach białkowych z siewek podlewanych roztworami  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ . Dla większości prób aktywność aminopeptydaz nie różniła się statystycznie lub była niższa od aktywności w kontroli. Jednocześnie dla żadnego z substratów nie zanotowano spadku aktywności enzymatycznej większego niż 18%. Natomiast dla substratu z *N*-końcową glicyną zaobserwowano najwyższy wzrost aktywności (o 37,1%), dla siewek podlewanych roztworem soli o najwyższym stężeniu. Brak jest doniesień na temat bezpośredniego wpływu nawożenia azotem na aktywność aminopeptydaz roślinnych. Jedyna dostępna informacja dotyczy enzymów zewnątrzkomórkowych, pochodzących od mikroorganizmów bytujących w glebie lasów liściastych. Nawożenie azotem nie wpływało znacząco na aktywność tych enzymów<sup>208</sup>. Najprawdopodobniej obecność jonów  $\text{NO}_3^-$  i  $\text{NH}_4^+$  nie wpływa na ekspresję aminopeptydaz siewek rzepaku ozimego.

#### 5.4.3.2. Wpływ fosforu

Fosfor stanowi składnik wielu kluczowych związków (kwasy nukleinowe, fosfolipidy, konenzymy), bierze też udział w reakcjach przenoszenia i akumulacji energii w komórce<sup>4</sup>. Rośliny wykształciły różne mechanizmy mające zapobiec niedoborom tego pierwiastka. W momencie wystąpienia deficytu fosforu, wzrost korzeni jest stymulowany, a u niektórych gatunków roślin wyrasta nawet specjalny typ korzeni (proteoidy), charakteryzujący się dużą ilością włośników. Inne rośliny wydzielają przez korzenie kwasy organiczne mające rozpuścić nieorganiczne fosforany znajdujące się w glebie<sup>4</sup>. Najczęściej stosowanym związkiem w nawożeniu roślin jest fosforan amonu. Średnio stosuje się dawki fosforu od 50-100 kg  $\text{P}_2\text{O}_5$  na hektar<sup>206,207</sup>. W eksperymencie stosowano pięć stężeń soli  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  0,3, 1,5, 3,0, 15 i 30 mM, którymi podlewano rzepak od drugiej doby uprawy. Całkowita dawka fosforu wynosiła od 1,46 kg/ha (roztwór 0,3 mM) do 146,2 kg/ha (przy stosowaniu roztworu 30 mM). Wygląd siewek w momencie zbioru, dla eksperymentu z użyciem soli  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  przedstawiono na rysunku 33.

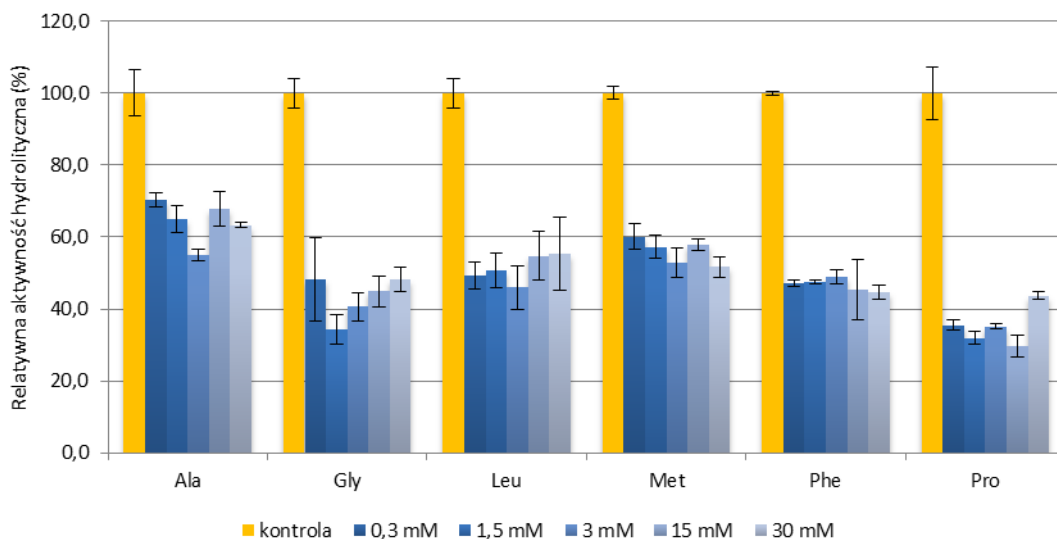


Rys.33. Wpływ podlewania roztworami  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  na wzrost siewek rzepaku ozimego

*Uprawa w trybie: 24 h imbibicji + 48 h kielkowania w ciemności + 96 h kielkowania w świetle w kontrolowanych warunkach (26°C, wilgotność 65%, 16 h światła i 8 h ciemności). Siewki rzepaku podlewano roztworami o stężeniach: 0,3, 1,5, 3, 15 i 30 mM raz dziennie, od drugiej doby uprawy. Rośliny zebrano po 144 h uprawy.*

W przypadku stosowania  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  jako źródła fosforu, wraz ze wzrostem stężenia roztworu, którym podlewano siewki rzepaku ozimego, zaobserwowano spowolnienie wzrostu roślin. Zaobserwowano również, że siewki podlewane roztworami 15 i 30 mM posiadają żółte zabarwienie części liści. Ponadto, wraz ze wzrostem stężenia stosowanego roztworu, samo podłoże przybierało żółty a następnie rdzawy kolor. Obserwowany efekt musiał być związany z metabolizmem siewek, same roztwory  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  nie zmieniały zabarwienia podłoża.

Podlewanie siewek rzepaku ozimego roztworami  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  wpływało inhibująco na aktywność aminopeptydaz w ekstraktach białkowych z tych roślin (rysunek 34).



Rys.34. Wpływ podlewania roztworami  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  na aktywność aminopeptydaz w siewkach rzepaku po 144 h uprawy

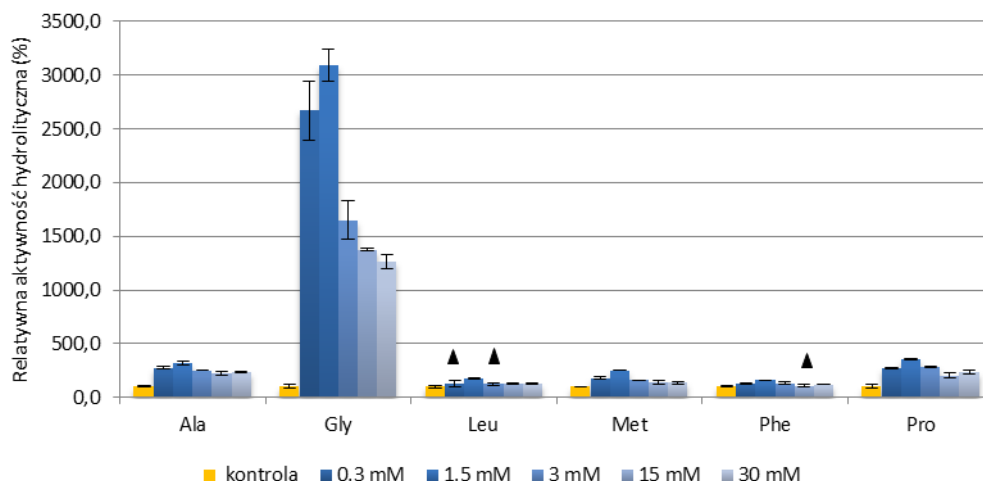
*Pomiary prowadzono w 50 mM buforze PBS o pH 7,0; stężenie substratu w próbce: 1mM; 100% przypisano aktywności wobec danego substratu uzyskanej dla próby kontrolnej; słupki błędów reprezentują odchylenia standardowe średniej z trzech powtórzeń; wszystkie pomiary są istotne statystycznie (poziom istotności ( $p < 0,05$ ) obliczony z wykorzystaniem testu t-Studenta ( $n=3$ )).*

W zależności od stosowanego substratu, zaobserwowano obniżenie aktywności aminopeptydaz o 30-70%. Największy spadek zanotowano dla substratu z *N*-końcową proliną, a najmniejszy dla Ala-*p*NA. Niezależnie od stosowanego stężenia  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ , spadek aktywności oscylował na podobnym poziomie dla danego substratu. Przenawożenie fosforem zwykle skutkuje spowolnieniem przemiany materii w roślinach. Ponadto, nadmiar tego pierwiastka może poprowadzić do redukcji zawartości chlorofilu, co udowodniono na przykładzie alg *Azolla pinnata*<sup>209,210</sup>. Obserwowany spadek aktywności aminopeptydaz może być skutkiem właśnie spowolnienia przemiany materii i metabolizmu siewek rzepaku. Z uwagi na stosowanie soli amonowej w eksperymencie następuje także przenawożenie siewek rzepaku azotem (dla stężeń 15 i 30 mM). Jednak wyniki badań nad wpływem azotu w postaci azotanu amonu, wykluczają radykalny wpływ jonu  $\text{NH}_4^+$  na aktywność badanych enzymów.

#### 5.4.3.3. Wpływ potasu

Główną rolą potasu w roślinach jest przede wszystkim aktywacja ponad 50 różnych enzymów oraz neutralizacja anionów organicznych i nieorganicznych w wakuolach<sup>4</sup>. Potas jest istotnym makroelementem odgrywającym kluczową rolę w odpowiedzi roślin na stres abiotyczny i biotyczny. Zastosowanie nawozów potasowych wpływa na ograniczenie zakażenia upraw grzybami, bakteriami i ogranicza żerowanie insektów. Odpowiednie stężenie  $\text{K}^+$  w korzeniach działa ochronnie przed skutkami suszy oraz zwiększa tolerancję na niską temperaturę<sup>211</sup>. Nawożenie rzepaku potasem, w zależności od zawartości potasu w glebie i prognozowanego, plonu waha się od 60-120 kg  $\text{K}_2\text{O}$

na hektar<sup>207</sup>. Na rysunku 35 przedstawiono wpływ podlewania siewek rzepaku ozimego roztworami chlorku potasu o stężeniach: 0,3, 1,5, 3,0, 15 i 30 mM, na aktywność aminopeptydaz w ekstraktach białkowych z tych roślin. Roztwór 30 mM odpowiada nawożeniu na poziomie 184 kg/ha. Nie obserwowano różnic we wzroście i wyglądzie roślin podlewanych roztworami KCl a kontrolą.



Rys.35. Wpływ podlewania roztworami KCl na aktywność aminopeptydaz w siewkach rzepaku po 144 h uprawy

*Pomiary prowadzono w 50 mM buforze PBS o pH 7,0; stężenie substratu w próbce: 1mM; 100% przypisano aktywności wobec danego substratu uzyskanej dla próby kontrolnej; słupki błędów reprezentują odchylenia standardowe średniej z trzech powtórzeń; trójkąty nad słupkami oznaczają, że dana wartość nie różni się statystycznie od kontroli (poziom istotności ( $p < 0,05$ ) obliczony z wykorzystaniem testu t-Studenta ( $n=3$ )).*

Na podstawie przeprowadzonych badań można zauważyć ścisły związek między aplikacją jonów potasu, a wzrostem ekspresji genów kodujących aminopeptydazy, a co za tym idzie aktywności tych enzymów w roślinie, szczególnie w stosunku do substratu z *N*-końcową glicyną. Największy wzrost aktywności zaobserwowano dla stężeń 0,3 i 1,5 mM, gdzie aktywność wzrosła 27-30-krotnie. W przypadku stężenia 30 mM, obserwowano ponad 12-krotny wzrost. Dla pozostałych substratów również obserwowano wzrost aktywności, jednak zdecydowanie mniejszy niż w przypadku *N*-końcowej glicyny. Należy podkreślić, że dla substratu *N*-końcową proliną aktywność aminopeptydaz wzrosła o 253,8% (roztwór 1,5 mM KCl) i o 103,9% (roztwór 15 mM KCl). Wobec Ala-*p*NA jako substratu, najwyższy wzrost aktywności, w porównaniu do kontroli, zaobserwowano przy stosowaniu roztworu KCl o stężeniu 1,5 mM (wzrost o 217,8%). Najmniejszy wzrost aktywności zanotowano przy stężeniu KCl 15 mM (wzrost o 118,5%). Jony potasu nie wpływały natomiast znacząco na aktywność aminopeptydaz wobec *N*-końcowej fenyloalaniny (wzrost od 9,4 do 58%).

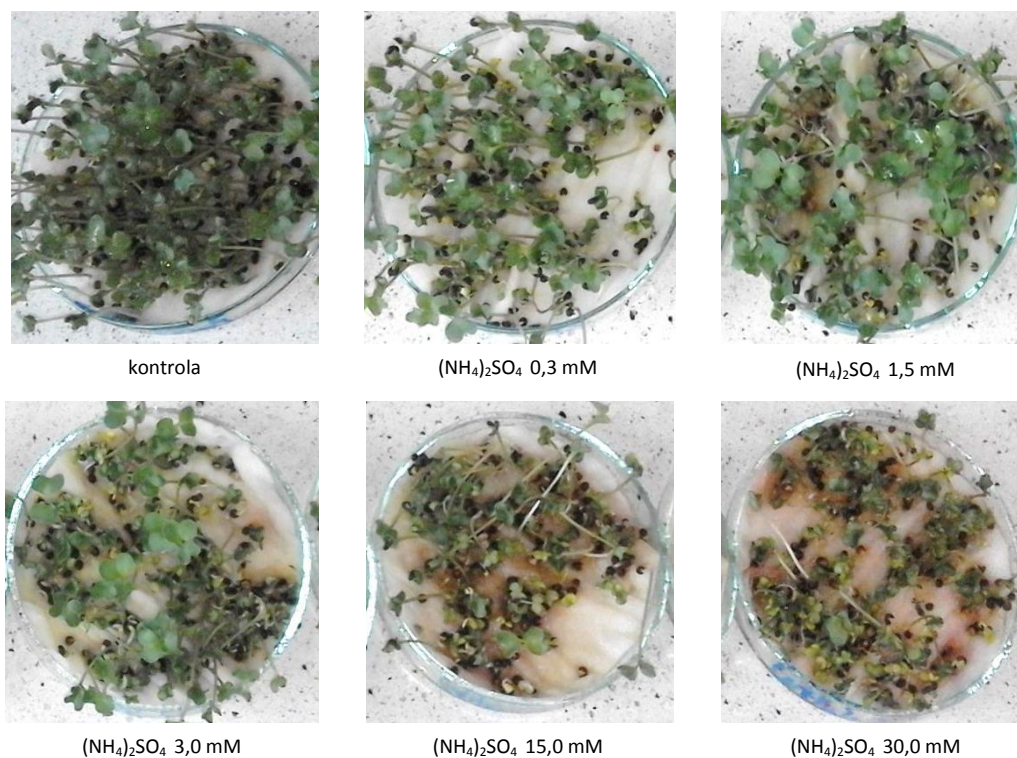
Przedstawione wyniki świadczą o tym, że jedną z możliwych ścieżek działania jonów potasu w procesie ochrony rośliny przed negatywnymi skutkami działania czynników biotycznych i abiotycznych, jest udział w aktywacji genów kodujących aminopeptydazy, co pozwala na wzrost

stężenia tych enzymów w roślinie. Aminopeptydazy z kolei, odszczepiając *N*-końcową glicynę, alaninę oraz prolinę z białek, zapewniają odpowiedni poziom tych aminokwasów. Jak wiadomo, wszystkie te aminokwasy akumulują się w roślinie narażonej na stres (szczególnie zasolenie, niska temperatura, czy deficyt wody), pełniąc rolę osmoprotektantów, a dodatkowo źródła azotu (glicyna) czy substratów dla innych enzymów (np. dla aminotransferazy alaninowej, gdzie alanina przekształcana jest w pirogronian)<sup>4,50</sup>. Tak duży wzrost aktywności wobec *N*-końcowej glicyny, świadczy o uruchomieniu mechanizmów, w których znacznie wzrasta zapotrzebowanie na azot (w postaci azotu organicznego), jak i samą glicynę (np. jako substratu dla kompleksu enzymatycznego dekarboksylazy glicyny, w procesie fotooddychania). W literaturze można znaleźć dane świadczące o różnych reakcjach roślin nawożonych solami potasu, w aspekcie aktywności aminopeptydaz. Często jest to spowodowane analizą aktywności tych enzymów wobec substratów innych niż te z *N*-końcową alaniną, glicyną lub proliną. Przykładowo, nie odnotowano znaczących różnic w aktywności aminopeptydazy leucynowej w liściach ziemniaka uprawianego na glebach nawożonych potasem, w porównaniu do roślin pozbawionych nawozu<sup>114</sup>. Nie można również wykluczyć, że sam chlorek potasu działa jako czynnik stresowy, jednak w takim przypadku należałoby się spodziewać odpowiedzi obronnej roślin w postaci stopniowego wzrostu aktywności aminopeptydaz wraz ze wzrostem stężenia KCl.

#### 5.4.3.4. Wpływ siarki

Siarka jest, obok azotu, jednym z najważniejszych makroelementów. Stanowi często składnik nawozów mineralnych, najczęściej w postaci siarczanu(VI) amonu<sup>207</sup>. Siarka występuje w aminokwasach (cysteina i metionina) i odgrywa ważną rolę w budowie białek (np. mostki disiarczkowe). Zarówno niedobór jak i nadmiar tego pierwiastka może wpływać negatywnie na wielkość i jakość plonów<sup>4,212</sup>. Rzepak należy do roślin o dużym zapotrzebowaniu na ten makroelement (80-90 kg S/ha)<sup>213,214</sup>. Dawka siarki podczas pojedynczego nawożenia nie powinna jednak przekraczać 50 kg S/ha<sup>206</sup>. W eksperymencie użyto do podlewania siewek rzepaku roztworów (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> o stężeniach: 0,3, 1,5, 3,0, 15 i 30 mM, co odpowiada dawce siarki od około 1,5 kg S/ha (roztwór 0,3 mM) do 150 kg S/ha (roztwór 30 mM). Wygląd siewek w momencie zbioru przedstawiono na rysunku 36.





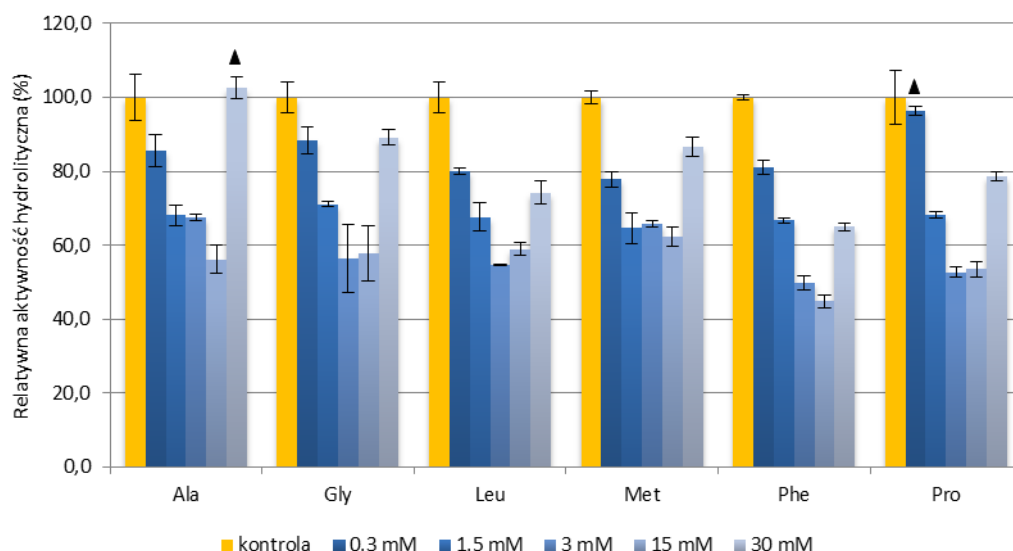
Rys.36. Wpływ podlewania roztworami  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  na wzrost siewek rzepaku ozimego

*Uprawa w trybie: 24 h imbibicji + 48 h kielkowania w ciemności + 96 h kielkowania w świetle w kontrolowanych warunkach (26°C, wilgotność 65%, 16 h światła i 8 h ciemności). Siewki rzepaku podlewano roztworami  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  o stężeniach: 0,3, 1,5, 3, 15 i 30 mM raz dziennie, od drugiej doby uprawy. Rośliny zebrano po 144 h uprawy.*

W przypadku stosowania roztworów  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  obserwacje były bardzo podobne do obserwacji dla siewek podlewanych roztworami  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ .

Podlewanie siewek rzepaku ozimego roztworami siarczanu(VI) amonu skutkowało ogólnie spadkiem aktywności aminopeptydaz w ekstraktach białkowych z siewek (rysunek 37).





Rys. 37. Wpływ podlewania roztworami  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  na aktywność aminopeptydaz w siewkach rzepaku po 144 h uprawy

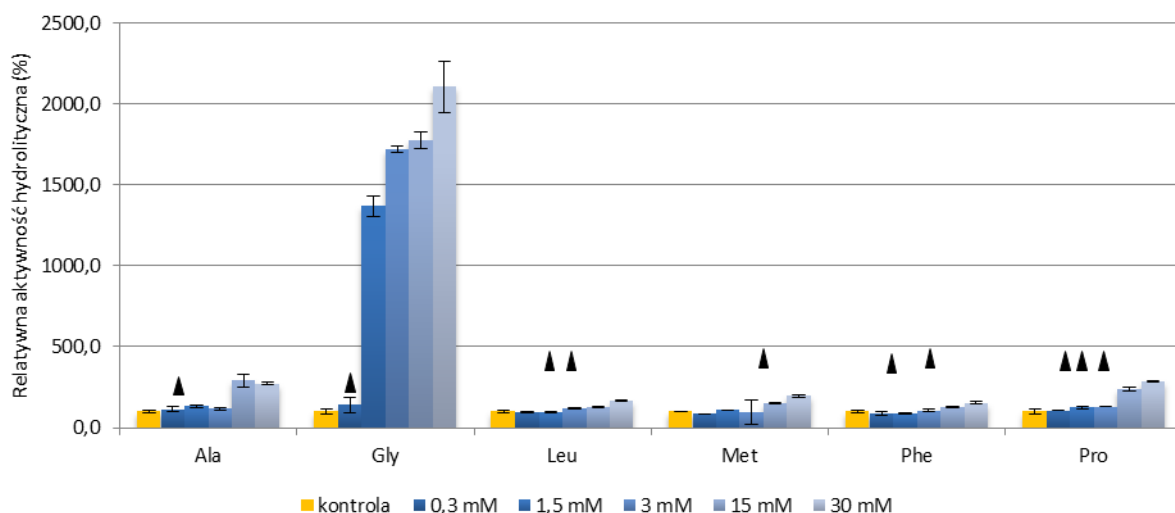
Pomiary prowadzono w 50 mM buforze PBS o pH 7,0; stężenie substratu w próbce: 1mM; 100% przypisano aktywności wobec danego substratu uzyskanej dla próby kontrolnej; słupki błędów reprezentują odchylenia standardowe średniej z trzech powtórzeń; trójkąty nad słupkami oznaczają, że dana wartość nie różni się statystycznie od kontroli (poziom istotności ( $p < 0,05$ ) obliczony z wykorzystaniem testu t-Studenta ( $n=3$ )).

Wraz ze wzrostem stężenia siarczanu(VI) amonu, obserwowano coraz większy spadek aktywności aminopeptydaz, w stosunku do wszystkich substratów. Wyjątkiem był roztwór 30 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , gdzie aktywność aminopeptydaz była porównywalna z kontrolą dla substratu z *N*-końcówką alaniną oraz około 10-20% niższa dla pozostałych substratów.

Znany jest wpływ różnych stężeń siarki (w postaci  $\text{SO}_4^{2-}$ ) na wzrost i plonowanie rzepaku. Zwiększenie zawartości siarki w glebie skutkuje zwiększeniem zawartości suchej masy roślin rzepaku ozimego. Jednocześnie zbyt wysokie stężenie tego pierwiastka wpływa negatywnie na wysokość plonu (powyżej 0,123 g S na 1 kg gleby)<sup>212</sup>. Brak jest jednak doniesień na temat wpływu nawożenia siarką na aktywność aminopeptydaz w roślinach.

#### 5.4.3.5. Wpływ magnezu

Magnez stanowi główny składnik chlorofilu i uczestniczy w regulacji pH w komórkach<sup>4</sup>. Jednorazowa dawka magnezu podczas nawożenia rzepaku powinna wynosić 15-35 kg/ha<sup>207</sup>. W ramach niniejszych badań, rośliny, od drugiej doby uprawy, podlewano następującymi roztworami  $\text{MgCl}_2$  0,3, 1,5, 3,0, 15 i 30 mM. Rośliny podlewane chlorkiem magnezu nie różniły się w momencie zbioru od siewek próby kontrolnej. Zmiany w aktywności aminopeptydaz spowodowane tym czynnikiem przedstawiono na rysunku 38.



Rys.38. Wpływ podlewania roztworami  $MgCl_2$  na aktywność aminopeptydaz w siewkach rzepaku po 144 h uprawy

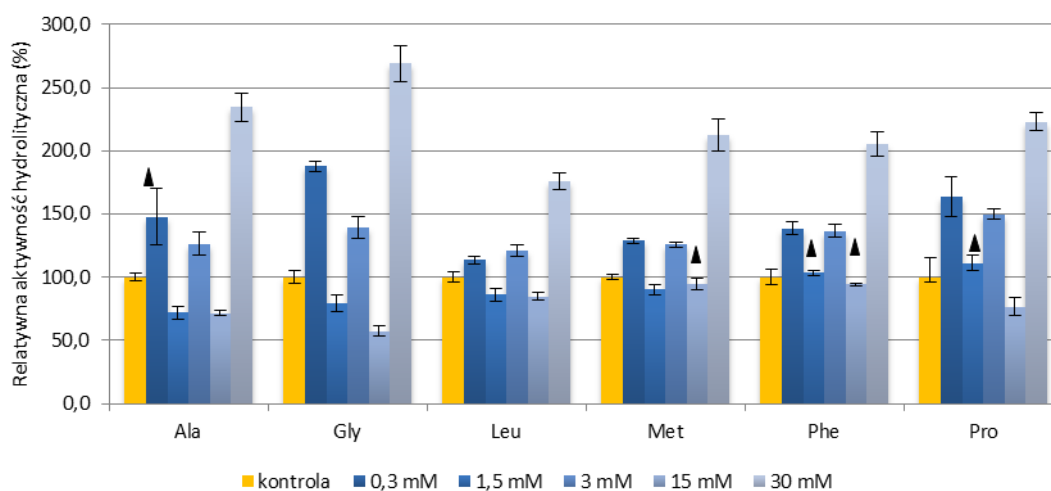
Pomiary prowadzono w 50 mM buforze PBS o pH 7,0; stężenie substratu w próbce: 1mM; 100% przypisano aktywności wobec danego substratu uzyskanej dla próby kontrolnej; słupki błędów reprezentują odchylenia standardowe średniej z trzech powtórzeń; trójkąty nad słupkami oznaczają, że dana wartość nie różni się statystycznie od kontroli (poziom istotności ( $p < 0,05$ ) obliczony z wykorzystaniem testu t-Studenta ( $n=3$ )).

Podobnie jak w eksperymencie z chlorkiem potasu, największy wzrost aktywności zanotowano dla substratu z *N*-końcową glicyną. Aktywność rosła wraz ze stosowanym stężeniem soli, od 1,5 mM  $MgCl_2$  (całkowita dawka 5,73 kg/ha). W siewkach podlewanych roztworem o najwyższym stężeniu  $MgCl_2$ , obserwowano 20-krotny wzrost aktywności aminopeptydaz w stosunku do substratu z *N*-końcową glicyną. Dla pozostałych substratów, wzrost aktywności wynosił od 69,3-187,1% przy stosowaniu chlorku magnezu o stężeniu 30 mM (całkowita dawka 114,6 kg/ha). Tak wysoki wzrost aktywności wobec Gly-*p*NA może być odpowiedzią na wysokie stężenie soli. Wysokie zasolenie wpływa na roślinę podobnie jak deficyt wody. Glicyna jest osmoprotektantem. Jednocześnie wzrost aktywności aminopeptydaz wobec substratu z *N*-końcową proliną (również osmoprotektant) wyniósł jedynie 138,5 i 187,1% odpowiednio dla stężeń  $MgCl_2$  15 i 30 mM. W dostępnej literaturze opisano wpływ nawożenia magnezem na aktywność aminopeptydaz wobec innych substratów niż *N*-końcowa glicyna czy prolina. Znany jest przypadek spadku aktywności aminopeptydazy leucynowej z liści ziemniaka pod wpływem intensywnego nawożenia magnezem (o ponad 50%)<sup>114</sup> Należy wspomnieć, że glicyna i magnez odgrywają ważne role w procesie fotorespiracji w komórkach roślinnych. Proces ten angażuje wiele enzymów wzajemnie od siebie zależnych, w chloroplastach, mitochondriach i peroksosomach. Magnez jest niezbędny do aktywacji karboksylazy/oksygenazy rybulozo-1,5-bifosofranu (RuBisCO) - enzym odpowiedzialny za oddychanie komórkowe w chloroplastach. W wyniku działania RuBisCO powstaje między innymi fosfoglikan, który przenoszony jest do peroksosomów gdzie przekształcany jest do glioksalanu, a następnie w wyniku dwukrotnej

transaminacji powstaje z niego glicyna. Ta natomiast transportowana jest do mitochondriów i przekształcana w serynę wydzieleniem cząsteczki  $\text{CO}_2$ ,  $\text{NH}_3$ , oraz  $\text{NADH}$  przez dekarboksylazę glicyny<sup>215-217</sup>.

#### 5.4.3.6. Wpływ wapnia

Wapń reguluje aktywność wielu enzymów w tym amylaz i fosfolipaz, stanowi również składnik pektyn i ścian komórkowych<sup>4</sup>. Wapń stosuje się nie tyle do nawożenia ziemi, ale do regulacji jej pH. W eksperymencie z udziałem chlorku wapnia stosowano pięć stężeń soli 0,3, 1,5, 3,0, 15 i 30 mM, którymi podlewano rzepak od drugiej doby uprawy. Rośliny podlewane roztworami  $\text{CaCl}_2$  nie różniły się w momencie zbioru od siewek próby kontrolnej. Zmiany w aktywności aminopeptydaz spowodowane tym czynnikiem przedstawiono na rysunku 39.



Rys.39. Wpływ podlewania roztworami  $\text{CaCl}_2$  na aktywność aminopeptydaz w siewkach rzepaku po 144 h uprawy

*Pomiary prowadzono w 50 mM buforze PBS o pH 7,0; stężenie substratu w próbce: 1mM; 100% przypisano aktywności wobec danego substratu uzyskanej dla próby kontrolnej; słupki błędów reprezentują odchylenia standardowe średniej z trzech powtórzeń; trójkąty nad słupkami oznaczają, że dana wartość nie różni się statystycznie od kontroli (poziom istotności ( $p < 0,05$ ) obliczony z wykorzystaniem testu t-Studenta ( $n=3$ )).*

W wyniku podlewania siewek rzepaku ozimego roztworami chlorku wapnia otrzymano niejednoznaczne wyniki. Brak było wyraźnego trendu spadku lub wzrostu aktywności w zależności od stężenia stosowanej soli. Stosowane dawki w przeliczeniu na hektar, wahają się od 1,89 -189 kg/ha. W zakresie stężeń  $\text{CaCl}_2$  0,3-15 mM, zmiany aktywności nie przekraczają 50%, za wyjątkiem Gly-pNA i Pro-pNA. Dla tych substratów zaobserwowano stosunkowo wysoki wzrost aktywności w siewkach podlewanych roztworem  $\text{CaCl}_2$  0,3 mM (o 87,7% dla Gly-pNA i o 63,7% dla Pro-pNA). Natomiast największy wzrost aktywności w stosunku do wszystkich substratów zaobserwowano dla

ekstraktów z siewek rzepaku podlewanych roztworom chlorku wapnia o najwyższym stężeniu (od 75,5% dla Leu-*p*NA do 169,1% dla Gly-*p*NA). Otrzymane wyniki nie były jednoznaczne. Można jednak przypuszczać, że wysoka aktywność wobec substratu z *N*-końcową glicyną i alaniną przy stosowaniu roztworu o najwyższym stężeniu wynika z wysokiego zasolenia i zapotrzebowania na osmoprotektanty. Wpływ wapnia badano dotąd tylko wobec aminopeptydazy leucynowej z ziemniaka. Obserwowano spadek aktywności tego enzymu w liściach ziemniaków nawożonych nawozem zawierającym wapń z jednoczesnym brakiem zmian w zawartości wapnia w suchej masie tych liści<sup>114</sup>.

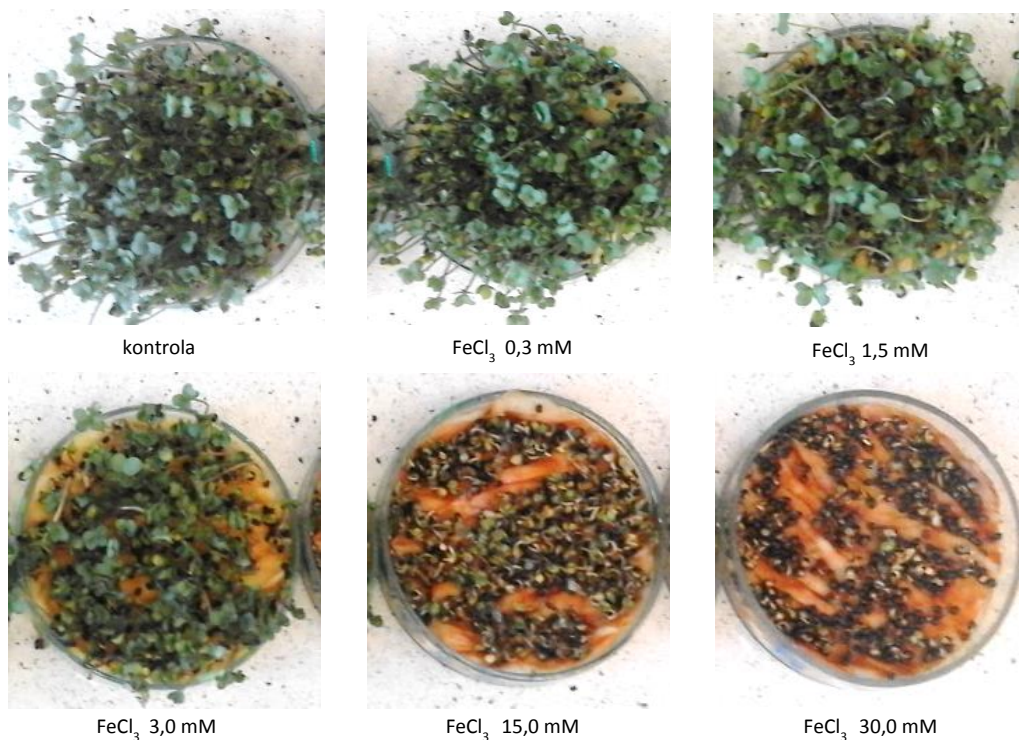
#### 5.4.4. Wpływ wybranych mikroelementów

Do mikroelementów niezbędnych roślinom zaliczyć można: molibden, miedź, cynk, mangan, żelazo, bor, a także nikiel. W przeprowadzonych eksperymentach zbadano wpływ większości mikroelementów na aktywność aminopeptydaz w ekstraktach białkowych z siewek rzepaku ozimego. W tym celu, do podlewania stosowano roztwory wodne następujących związków:  $H_3BO_4$ ,  $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$ ,  $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ ,  $FeCl_3$ ,  $MnCl_2 \cdot 14H_2O$ ,  $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ ,  $NiCl_2 \cdot 6H_2O$ ,  $ZnCl_2$ , o stężeniu 0,3, 1,5, 3,0, 15 i 30 mM. Użyto tych samych stężeń roztworów co w eksperymentach z makroelementami, by określić jak zmieniać się będzie aktywność aminopeptydaz w sytuacji nawet kilkukrotnego przekroczenia optymalnej dawki danego mikroelementu. W przeprowadzonych badaniach często stężenia 15 i 30 mM były toksyczne dla rzepaku, co jest ciekawą obserwacją ze względu na możliwość występowania lokalnych zanieczyszczeń wybranymi pierwiastkami.

##### 5.4.4.1. Wpływ żelaza

Żelazo stanowi istotny mikroelement dla roślin. Pierwiastek ten występuje w wielu enzymach oksydoredukcyjnych, stanowi również aktywator w syntezie chlorofilu i niektórych białek. Rośliny pobierają żelazo w formie jonów  $Fe^{2+}$  i  $Fe^{3+}$  oraz w postaci chelatów<sup>4</sup>. Rzepak w ciągu całego okresu rozwoju pobiera około 2 kg Fe/ha. Zazwyczaj zawartość tego mikroskładnika w glebie jest wystarczająca. W nawozach stosowanych w uprawie rzepaku żelazo stanowi zazwyczaj jeden z wielu składników w ilościach od 0,15 do 7,8%<sup>218</sup>.

W przeprowadzonym eksperymencie rzepak podlewano roztworami  $FeCl_3$  o różnych stężeniach. Wpływ chlorku żelaza(III) na wzrost siewek rzepaku przedstawiono na rysunku 40.

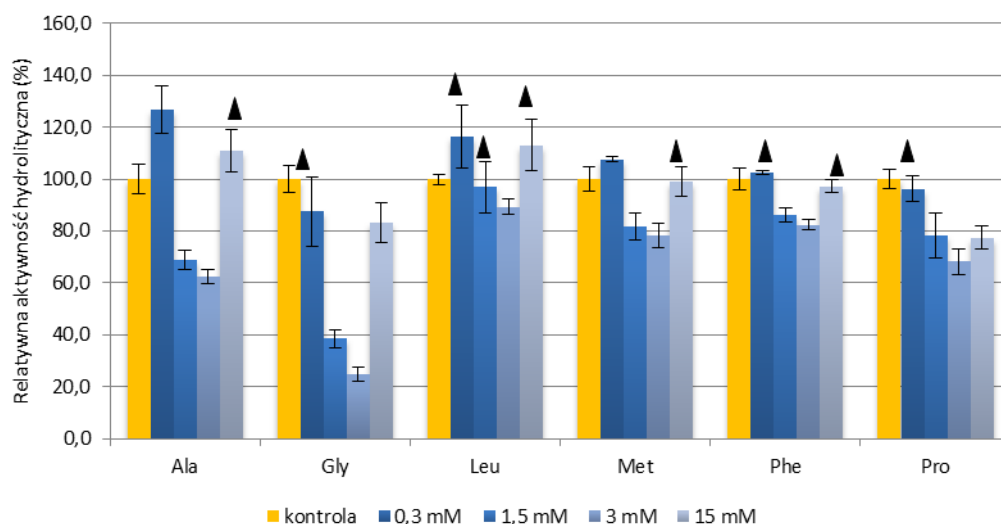


Rys.40. Wpływ podlewania roztworami  $\text{FeCl}_3$  na wzrost siewek rzepaku ozimego

*Uprawa w trybie: 24 h imbibicji + 48 h kielkowania w ciemności + 96 h kielkowania w świetle w kontrolowanych warunkach (26°C, wilgotność 65%, 16 h światła i 8 h ciemności). Siewki rzepaku podlewano roztworami soli o stężeniach: 0,3, 1,5, 3, 15 i 30 mM raz dziennie, od drugiej doby uprawy. Rośliny zebrano po 144 h uprawy.*

Rośliny podlewane roztworami  $\text{FeCl}_3$  o stężeniach 0,3 i 1,5 mM nie różniły się znacząco od kontroli, mimo, że były to już stosunkowo wysokie dawki tego pierwiastka (odpowiednio całkowita dawka wyniosła 2,63 oraz 13,15 kg Fe/ha). Natomiast siewki rzepaku poddane działaniu soli żelaza o stężeniu 3 mM wykazywały ograniczony wzrost i obserwowano chlorozę liścieni. W przypadku roztworu 15 mM wzrost siewek był bardzo ograniczony. Rzepak nadal kielkował, ale jego wzrost zatrzymał się na poziomie 007-008 w skali BBCH (z okrywy nasiennej wyłania się hipokotyl z liścieniami i wzrasta ku górze). Skutkiem podlewania rzepaku 30 mM roztworem  $\text{FeCl}_3$  (całkowita dawka 263 kg Fe/ha) było niemal całkowite zahamowanie wzrostu siewek.

W ekstraktach białkowych z siewek podlewanych roztworami 0,3 mM do 15 mM oznaczono aktywność aminopeptydaz. Wyniki przedstawiono na rysunku 41.



Rys.41. Wpływ podlewania roztworami  $\text{FeCl}_3$  na aktywność aminopeptydaz w siewkach rzepaku po 144 h uprawy

*Pomiary prowadzono w 50 mM buforze PBS o pH 7,0; stężenie substratu w próbce: 1mM; 100% przypisano aktywności wobec danego substratu uzyskanej dla próby kontrolnej; słupki błędów reprezentują odchylenia standardowe średniej z trzech powtórzeń; trójkąty nad słupkami oznaczają, że dana wartość nie różni się statystycznie od kontroli (poziom istotności ( $p < 0,05$ ) obliczony z wykorzystaniem testu t-Studenta ( $n=3$ )).*

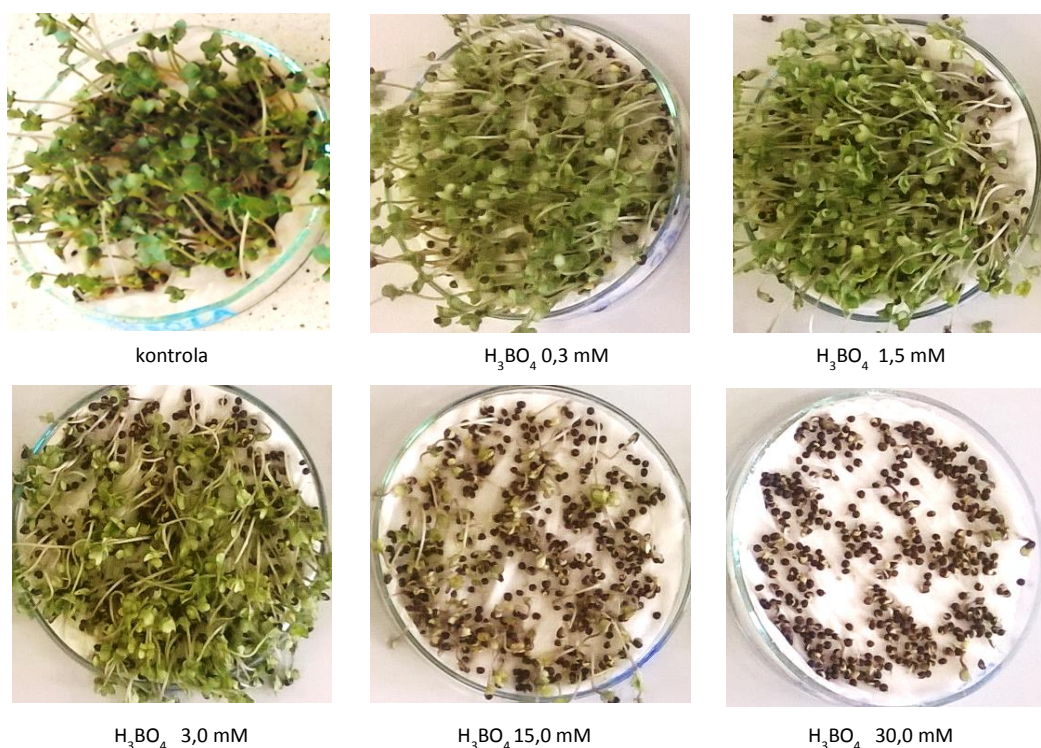
Aktywność aminopeptydaz z siewek rzepaku podlewanych roztworem 0,3 mM  $\text{FeCl}_3$  nie różniła się od kontroli lub obserwowano nieznaczny wzrost aktywności (7% w stosunku do substratu z *N*-końcową metioniną i 27% w stosunku do substratu z *N*-końcową alaniną). W przypadku wyższych stężeń stosowanej soli (1,5 i 3 mM), aktywność badanych enzymów w ekstraktach był niższa niż w kontroli. Największy spadek zaobserwowano w stosunku do substratu z *N*-końcową glicyną (o 68% przy stosowaniu roztworu 1,5 mM i 75% przy stosowaniu roztworu 3 mM). Aktywność aminopeptydaz podlewanych 15 mM  $\text{FeCl}_3$ , dla większości substratów nie różniła się od kontroli. Natomiast dla Pro-*p*NA i Gly-*p*NA była niższa od kontroli o odpowiednio 23 i 17%. Nieznany jest bezpośredni wpływ jonów żelaza na aktywność/ekspresję roślinnych aminopeptydaz. Prawdopodobnie wyższe stężenia tej soli, wpływając negatywnie na wzrost roślin (spowolnienie i upośledzenie wzrostu), wpływają również negatywnie na aktywność aminopeptydaz. Natomiast dla roślin podlewanych roztworem 15 mM działanie tych enzymów jest zbliżone do kontroli, mimo widocznie gorszej kondycji siewek. Może być to efektem zaangażowania aminopeptydaz w mechanizmy obronne mające niwelować skutki zbyt wysokiego stężenia chlorku żelaza(III). Należy również wziąć pod uwagę inny niż w przypadku kontroli stopień rozwoju siewek. Jak udowodniono we wcześniej opisanym eksperymencie (rysunek 17), poziom ekspresji aminopeptydaz rzepaku istotnie się zmienia podczas pierwszych 144 godzin kiełkowania.



#### 5.4.4.2. Wpływ boru

Nie jest znana do końca fizjologiczna rola boru w roślinach. Jego zawartość waha się od 1-150 mg/kg suchej masy. Wiadomo, że mikroelement ten uczestniczy w budowie ścian komórkowych oraz w procesie podziału komórkowego. Bor bierze również udział w metabolizmie węglowodanów<sup>4</sup>. Rzepak należy do roślin o stosunkowo dużym zapotrzebowaniu na ten mikroelement. Jednorazowa dawka nawożenia borem powinna wynosić 1,8-2 kg/ha, w tym celu stosuje się zarówno kwas borowy jaki i boraks. Częściej stosuje się kwas borowy, ze względu na dobrą rozpuszczalność w zimnej wodzie<sup>206</sup>.

Wpływ podlewania roztworami kwasu borowego na wzrost siewek rzepaku przedstawiono na rysunku 42.

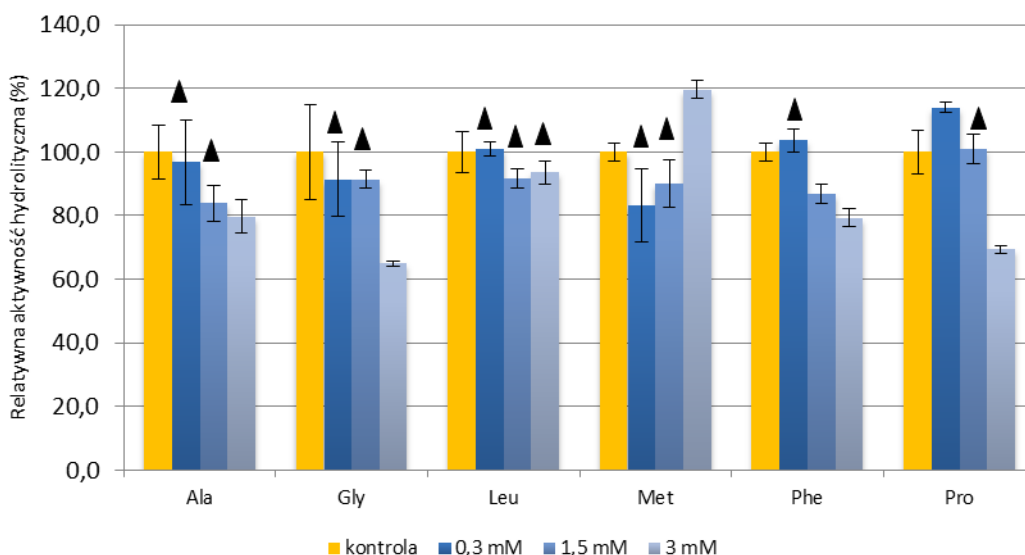


Rys.42. Wpływ podlewania roztworami  $H_3BO_4$  o różnym stężeniu na wzrost siewek rzepaku ozimego  
*Uprawa w trybie: 24 h imbibicji + 48 h kiełkowania w ciemności + 96 h kiełkowania w świetle w kontrolowanych warunkach (26°C, wilgotność 65%, 16 h światła i 8 h ciemności). Siewki rzepaku podlewano roztworami soli o stężeniach: 0,3, 1,5, 3, 15 i 30 mM raz dziennie, od drugiej doby uprawy. Rośliny zebrano po 144 h uprawy.*

W przypadku eksperymentu z borem zauważono, że rośliny podlewane roztworami o małym stężeniu (0,3 i 1,5 mM, co odpowiada całkowitej dawce odpowiednio 0,51 i 2,55 kg B/ha) wykazywały lepszy wzrost i więcej nasion wykiełkowało niż w kontroli. Rośliny podlewane roztworem kwasu borowego o stężeniu 3 mM również wykiełkowały, jednak widoczna była chloroza liści. Wyższe dawki tego mikroelementu były toksyczne dla siewek rzepaku (niemal całkowite zahamowanie kiełkowania nasion). Jest to zgodne z danymi literaturowymi, według których

przenawożenie borem skutkuje chlorozą i nekrozą liści, ograniczeniem podziału komórek korzenia, pękaniem tkanek i obumieraniem<sup>219</sup>.

Do badań aktywności hydrolitycznej zebrano próbki roślin podlewanych roztworami 0,3-3 mM oraz kontroli. Wyniki przedstawiono na rysunku 43.



Rys. 43. Wpływ podlewania roztworami  $H_3BO_4$  na aktywność aminopeptydaz w siewkach rzepaku po 144 h uprawy

Pomiary prowadzono w 50 mM buforze PBS o pH 7,0; stężenie substratu w próbce: 1mM; 100% przypisano aktywności wobec danego substratu uzyskanej dla próby kontrolnej; słupki błędów reprezentują odchylenia standardowe średniej z trzech powtórzeń; trójkąty nad słupkami oznaczają, że dana wartość nie różni się statystycznie od kontroli (poziom istotności ( $p < 0,05$ ) obliczony z wykorzystaniem testu t-Studenta ( $n=3$ )).

Dla większości badanych próbek nie obserwowano różnic w aktywności aminopeptydaz w porównaniu z kontrolą. Jednie w przypadku roślin podlewanych roztworami o najwyższym stężeniu kwasu borowego, widoczny był spadek aktywności wobec większości substratów o 20-35%. Dla substratu z *N*-metioniną obserwowano natomiast 20% wzrost aktywności aminopeptydaz.

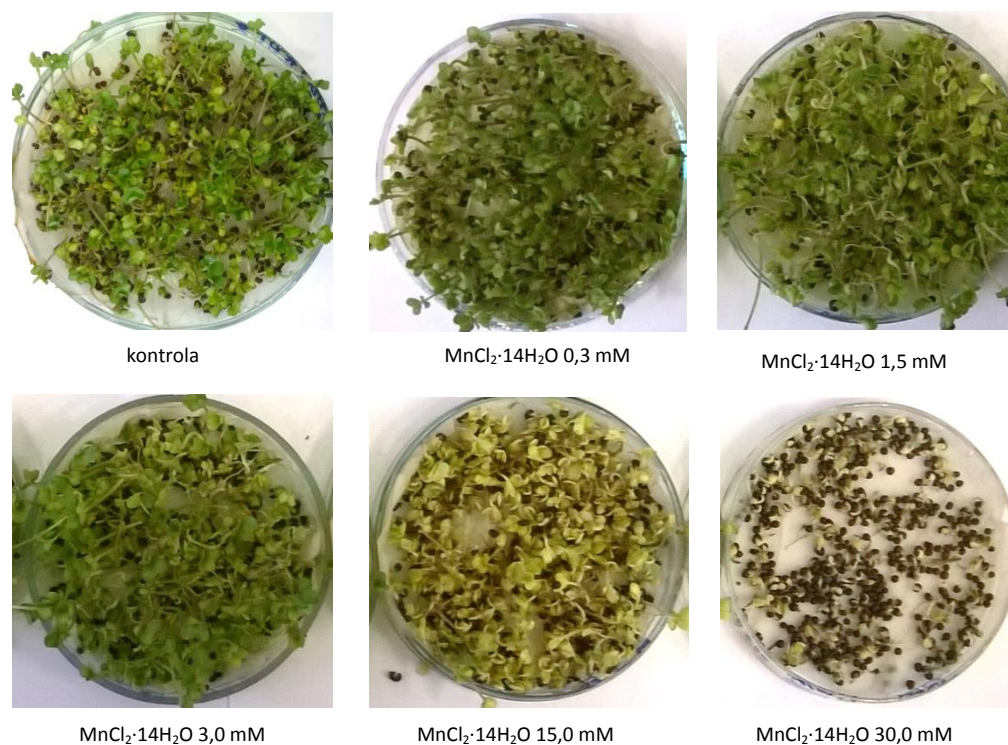
Brak jest doniesień na temat bezpośredniego wpływu boru na aktywność aminopeptydaz. Wiadomo jednak, że wysoki poziom boru powodował u *Arabidopsis thaliana* wzmożoną ekspresję genów białek szoku cieplnego. Postuluje się, że w odpowiedzi na toksyczne stężenia boru w roślinach uruchomiona zostaje odrębna, nie do końca poznana ścieżka odpowiedzi obronnej<sup>219,220</sup>. Być może słaba reakcja ze strony aktywności aminopeptydaz była wynikiem odpowiedzi obronnej, nie angażującej badanych enzymów.



#### 5.4.4.3. Wpływ manganu

Mangan jest pierwiastkiem niezbędnym w fotosyntezie, aktywuje też wiele enzymów (dekarboksylaz, dehydrogenaz)<sup>4</sup>. Rzepak nawozi się manganem w ilościach 100-150 g/ha<sup>221</sup>.

Podlewanie roztworami  $MnCl_2 \cdot 14H_2O$  siewek rzepaku, skutkowało ograniczeniem ich wzrostu, szczególnie w przypadku wysokich stężeń (rysunek 44).

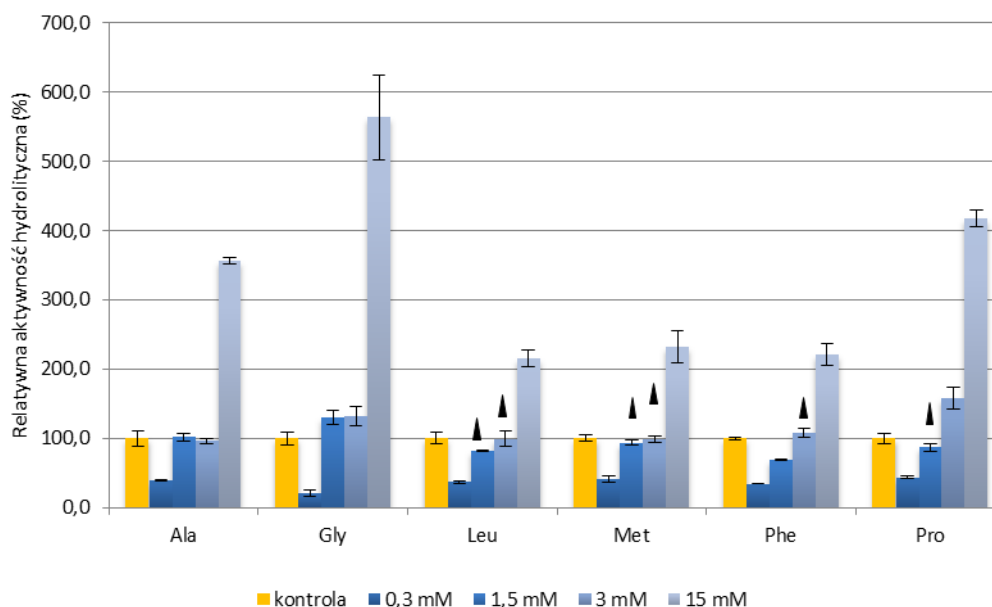


Rys.44. Wpływ podlewania roztworami  $MnCl_2 \cdot 14H_2O$  na wzrost siewek rzepaku ozimego

*Uprawa w trybie: 24 h imbibicji + 48 h kielkowania w ciemności + 96 h kielkowania w świetle w kontrolowanych warunkach (26°C, wilgotność 65%, 16 h światła i 8 h ciemności). Siewki rzepaku podlewano roztworami soli o stężeniach: 0,3, 1,5, 3, 15 i 30 mM raz dziennie, od drugiej doby uprawy. Rośliny zebrano po 144 h uprawy.*

W przypadku 15 mM roztworu  $MnCl_2 \cdot 14H_2O$  (całkowita dawka 130 kg Mn/ha), obserwuje się chlorozę liścieni. Ze względu na duże ograniczenie wzrostu siewek podlewanych roztworem o najwyższym stężeniu soli manganu, nie zebrano próbek do analizy aktywności aminopeptydaz.

Wraz ze wzrostem stężenia stosowanego związku rosła aktywność aminopeptydaz w ekstraktach białkowych z siewek rzepaku ozimego (rysunek 45).



Rys.45. Wpływ podlewania roztworami  $MnCl_2 \cdot 14H_2O$  na aktywność aminopeptydaz w siewkach rzepaku po 144 h uprawy

*Pomiary prowadzono w 50 mM buforze PBS o pH 7,0; stężenie substratu w próbce: 1mM; 100% przypisano aktywności wobec danego substratu uzyskanej dla próby kontrolnej; słupki błędów reprezentują odchylenia standardowe średniej z trzech powtórzeń; trójkąty nad słupkami oznaczają, że dana wartość nie różni się statystycznie od kontroli (poziom istotności ( $p < 0,05$ ) obliczony z wykorzystaniem testu t-Studenta ( $n=3$ )).*

W przypadku stosowania  $MnCl_2 \cdot 14H_2O$ , obserwowano spadek aktywności enzymatycznej przy stosowaniu najniższego stężenia soli. Podlewanie roztworami 1,5 i 3 mM nie wpłynęło znacząco na aktywność aminopeptydaz w stosunku do kontroli. Natomiast w przypadku najwyższego stężenia stosowanej soli (15 mM), obserwowano radykalny wzrost aktywności aminopeptydaz, szczególnie w stosunku do Gly- pNA (5,5-krotny), Pro-pNA (ponad 4-krotny) i Ala-pNA (3,5-krotny). Dla substratów z *N*-końcówką leucyną, metioniną i fenyloalaniną aktywność ta wzrosła o ponad 100%.

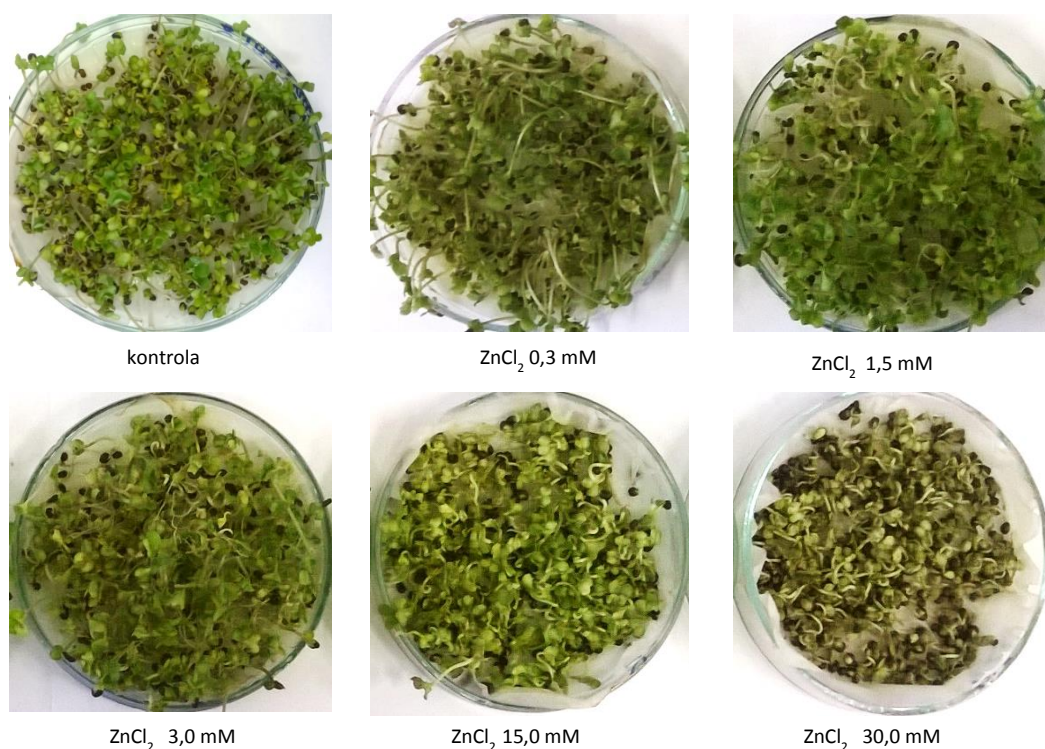
Aktywność aminopeptydaz (gdy są to metaloenzymy) jest zależna od obecności metali takich jak magnez, mangan czy cynk. Dodatek tych metali, w ilościach niezbędnych do aktywacji metaloenzymów, może zatem powodować wzrost ich aktywności, co zaobserwowano w badaniach wpływu soli manganu na aminopeptydazy zawarte w ekstraktach białkowych z siewek rzepaku (rysunek 25). W przypadku badań wpływu soli manganu na wzrost roślin i ekspresję aminopeptydaz tendencje były trochę inne. Radykalny wzrost aktywności aminopeptydaz w siewkach podlewanych roztworem 15 mM, wynikał raczej z reakcji obronnych rzepaku na ten czynnik lub ogólne zasolenie. Zasolenie gleby oznacza wysokie całościowe stężenie soli rozpuszczalnych, a nie tylko jonów sodu czy potasu<sup>4</sup>. Szczególnie wyraźny wzrost aktywności aminopeptydaz w stosunku do substratów z *N*-końcówką glicyną, alaniną i proliną (będący skutkiem wzmożonej ekspresji genów kodujących te enzymy), świadczyć może o uruchomieniu mechanizmów obronnych wobec wysokiego zasolenia. Rośliny bronią się przed tym zjawiskiem w podobny sposób jak przed deficytem wody, wytwarzając

duże ilości osmoprotektantów (między innymi wolna prolina, glicyna i alanina). Ponadto siewki podlewane 15 mM roztworem były na wcześniejszym etapie rozwoju niż rośliny kontroli.

W literaturze opisano wpływ zarówno deficytu jak i przenawożenia manganem na aktywność aminopeptydaz 50-dniowych siewek kukurydzy (badania te jednak prowadzono jedynie z użyciem substratu z *N*-końcową lizyną). Rośliny rosnące zarówno w ziemi ubogiej w ten pierwiastek jak i przenawożone wykazywały około 2-krotnie wyższą aktywność aminopeptydaz zasadowych (pomiar aktywności prowadzono w pH 8,0), w porównaniu do kontroli. Nadmiar manganu działał niekorzystnie na aktywność aminopeptydaz kwaśnych (pH 3,5) i neutralnych (pH 6,0) (spadek o około 20%)<sup>113</sup>.

#### 5.4.4.4. Wpływ cynku

Cynk jest metalem występujących w centrum aktywnym wielu enzymów, na przykład anhidrazy węglanowej, dehydrogenazy alkoholowej, dysmutazy ponadtlenkowej i innych. Pierwiastek ten pobierany jest przez rośliny w postaci  $Zn^{2+}$ , w nawozach najczęściej stosuje się chlorki cynku, jego siarczany lub chelaty<sup>4</sup>. Roślin oleiste nawozi się cynkiem w ilości 4-10 kg/ha<sup>207</sup>. Wpływ podlewania siewek rzepaku roztworami  $ZnCl_2$  przedstawiono na rysunku 46.

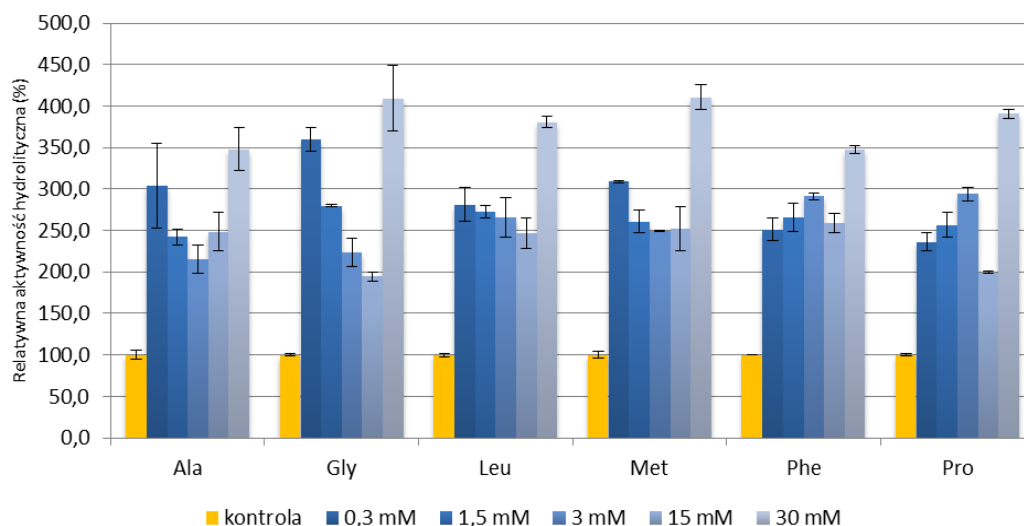


Rys.46. Wpływ podlewania roztworami  $ZnCl_2$  na wzrost siewek rzepaku ozimego

*Uprawa w trybie: 24 h imbibicji + 48 h kielkowania w ciemności + 96 h kielkowania w świetle w kontrolowanych warunkach (26°C, wilgotność 65%, 16 h światła i 8 h ciemności). Siewki rzepaku podlewano roztworami soli o stężeniach: 0,3, 1,5, 3, 15 i 30 mM raz dziennie, od drugiej doby uprawy. Rośliny zebrano po 144 h uprawy.*

Podlewanie roztworami chlorku cynku nie wpływało negatywnie na wzrost roślin w zakresie stosowanych stężeń 0,3-3 mM (co odpowiada całkowitej dawce 3,08 -30,8 kg/ha). Powyżej tego stężenia obserwuje się ograniczenie wzrostu, chlorozę liści i upośledzenie ich rozwoju.

Na rysunku 47 przedstawiono wpływ podlewania roztworami  $ZnCl_2$  na aktywność aminopeptydaz w ekstraktach białkowych z siewek rzepaku.



Rys.47. Wpływ podlewania roztworami  $ZnCl_2$  na aktywność aminopeptydaz w siewkach rzepaku po 144 h uprawy

*Pomiary prowadzono w 50 mM buforze PBS o pH 7,0; stężenie substratu w próbce: 1mM; 100% przypisano aktywności wobec danego substratu uzyskanej dla próby kontrolnej; słupki błędów reprezentują odchylenia standardowe średniej z trzech powtórzeń; wszystkie otrzymane wyniki były istotne statystycznie (poziom istotności ( $p < 0,05$ ) obliczony z wykorzystaniem testu t-Studenta ( $n=3$ )).*

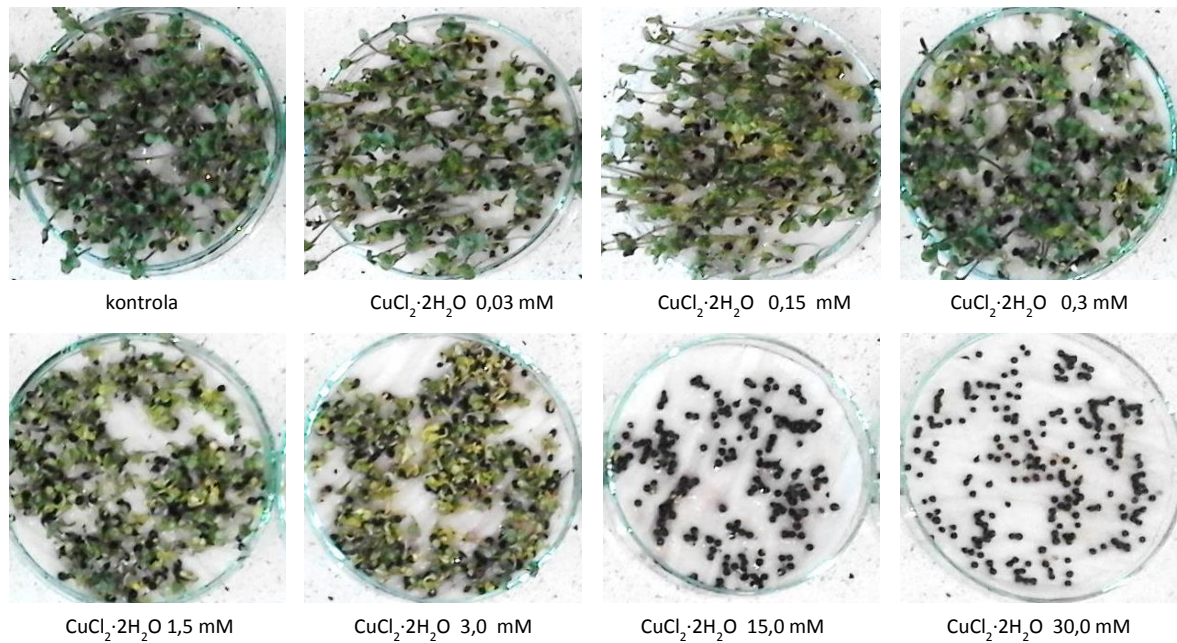
Niezależnie od stosowanej dawki chlorku cynku, obserwowano znaczący wzrost aktywności badanych enzymów. W przypadku stosowania roztworów 0,3-15 mM, wzrost aktywności dla większości substratów znajdował się na podobnym poziomie (około 2,5-3-krotny wzrost). Natomiast dla roślin podlewanych 30 mM roztworem obserwowano nawet 4-krotny wzrost aktywności aminopeptydaz (substrat z *N*-końcowa glicyną i metioniną). Może to wynikać z faktu, że rośliny znajdowały się na innym etapie wzrostu niż kontrola (spowolniony wzrost). Z drugiej strony, wiele ze znanych aminopeptydaz leucynowych to metaloenzymy posiadające dwa atomy cynku w swoim centrum aktywnym<sup>65</sup>. Dlatego też pierwiastek ten jest niezbędny dla ich aktywności. Otrzymane wyniki różniły się znacząco od tych, otrzymanych dla oczyszczonej aminopeptydazy z rzepaku czy dla ekstraktów z 120 h siewek. W obu tych przypadkach inkubacja z solą cynku powodowała spadek aktywności enzymatycznej. Wyniki otrzymane w niniejszych badaniach, były zatem skutkiem aktywującego wpływu jonów cynku na mechanizmy ekspresji genów kodujących aminopeptydazy w roślinie, między innymi w odpowiedzi na czynnik stresowy. W literaturze najczęściej spotyka się negatywny wpływ dodatku cynku na oczyszczone aminopeptydazy<sup>72,202</sup>. Natomiast w sytuacji poddania całej rośliny działaniu soli cynku, ekspresja genów kodujących aminopeptydazy może być

zwiększona, tak jak w przypadku genu kodującego aminopeptydazę prolinową z pszenicy (*TaPAP1*). Autorzy tych badań sugerowali, że stres spowodowany dużym stężeniem cynku w pożywce stymuluje ekspresję genów kodujących aminopeptydazą prolinową, w celu zwiększenia zawartości wolnej proliny w komórkach roślinnych<sup>107</sup>. Wyjaśnienie to może być słuszne również w przedstawionych badaniach. Szczególny wzrost aktywności obserwuje się właśnie w stosunku do substratu z *N*-końcową proliną, a także glicyną i alaniną. Aminokwasy te pełnią m.in. funkcję osmoprotektantów.

#### 5.4.4.5. Wpływ miedzi

Zawartość miedzi w roślinach waha się od 1-30 mg/kg suchej masy. Miedź występuje w wielu enzymach biorących udział w procesach fotosyntezy, oddychania komórkowego czy metabolizmie cukrowców i związków azotowych. Miedź jest pobierana przez rośliny głównie w formie  $\text{Cu}^{2+}$ , a dla roślin oleistych pojedyncza dawka doglebowa tego mikroelementu powinna wynosić 10-20 kg/ha<sup>4,207</sup>. Eksperyment z użyciem roztworów  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  przeprowadzono dwukrotnie. Najpierw stosując standardowe stężenia roztworów (od 0,3 do 30 mM), a następnie eksperyment powtórzono z użyciem roztworów o mniejszym stężeniu (0,03 i 0,15 mM). Wynikało to z faktu, że ekstrakty białkowe uzyskane z siewek podlewanych roztworami powyżej 0,3 mM były zbyt mętne, by możliwy był spektrofotometryczny pomiar aktywności aminopeptydaz oraz stężenia białka. Najprawdopodobniej miedź w dużym stężeniu powodowała denaturację białek lub tworzenie agregatów białkowych, które wytrącały się w stosowanym buforze fosforanowym. Na rysunku 48 przedstawiono wpływ podlewania siewek rzepaku roztworami  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  o stężeniach 0,03-30 mM, co odpowiadało 0,299 - 299 kg Cu/ha.

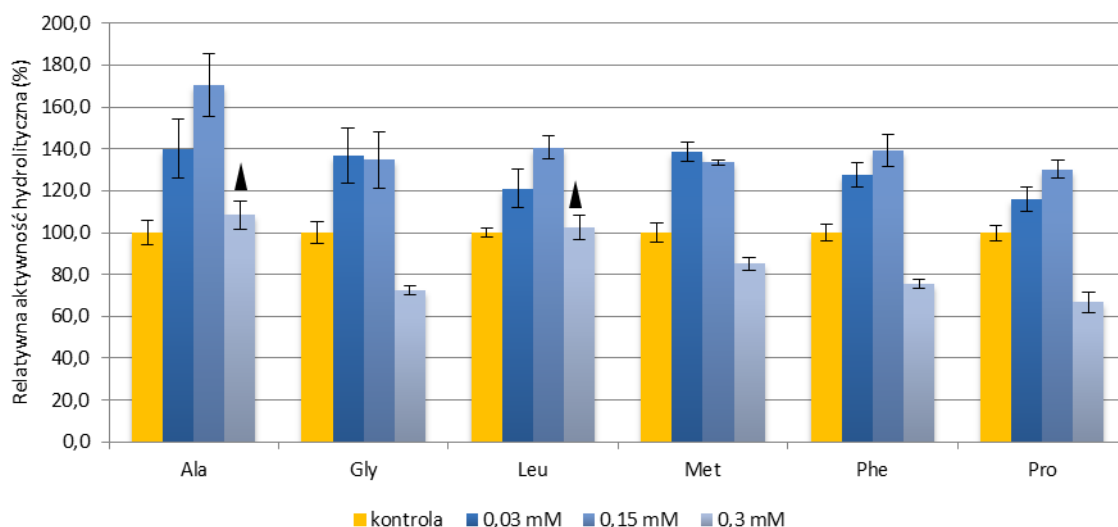




Rys.48. Wpływ podlewania roztworami  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  o różnym stężeniu na wzrost siewek rzepaku ozimego  
*Uprawa w trybie: 24 h imbibicji + 48 h kielkowania w ciemności + 96 h kielkowania w świetle w kontrolowanych warunkach (26°C, wilgotność 65%, 16 h światła i 8 h ciemności). Siewki rzepaku podlewano roztworami soli o stężeniach: 0,03, 0,15, 0,3, 1,5, 3, 15 i 30 mM raz dziennie, od drugiej doby uprawy. Rośliny zebrano po 144 h uprawy.*

Miedź w większych ilościach działa toksycznie na rośliny, między innymi, upośledzając wzrost systemu korzeniowego<sup>4</sup>. W przeprowadzonym eksperymencie toksyczne działanie użytego  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  jest widoczne już w przypadku roślin podlewanych roztworem o stężeniu 1,5 mM (całkowita dawka 14,5 kg Cu/ha). Roztwory 15 i 30 mM były na tyle toksyczne, że rzepak nie wykiełkował.

Oznaczenie aktywności aminopeptydaz było możliwe dla siewek rzepaku podlewanych roztworami  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  o stężeniach 0,03, 0,15 i 0,3 mM. Otrzymane wyniki przedstawiono na rysunku 49.



Rys.49. Wpływ podlewania roztworami  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  na aktywność aminopeptydaz w siewkach rzepaku po 144 h uprawy

Pomiary prowadzono w 50 mM buforze PBS o pH 7,0; stężenie substratu w próbce: 1mM; 100% przypisano aktywności wobec danego substratu uzyskanej dla próby kontrolnej; słupki błędów reprezentują odchylenia standardowe średniej z trzech powtórzeń; trójkąty nad słupkami oznaczają, że dana wartość nie różni się statystycznie od kontroli (poziom istotności ( $p < 0,05$ ) obliczony z wykorzystaniem testu t-Studenta ( $n=3$ )).

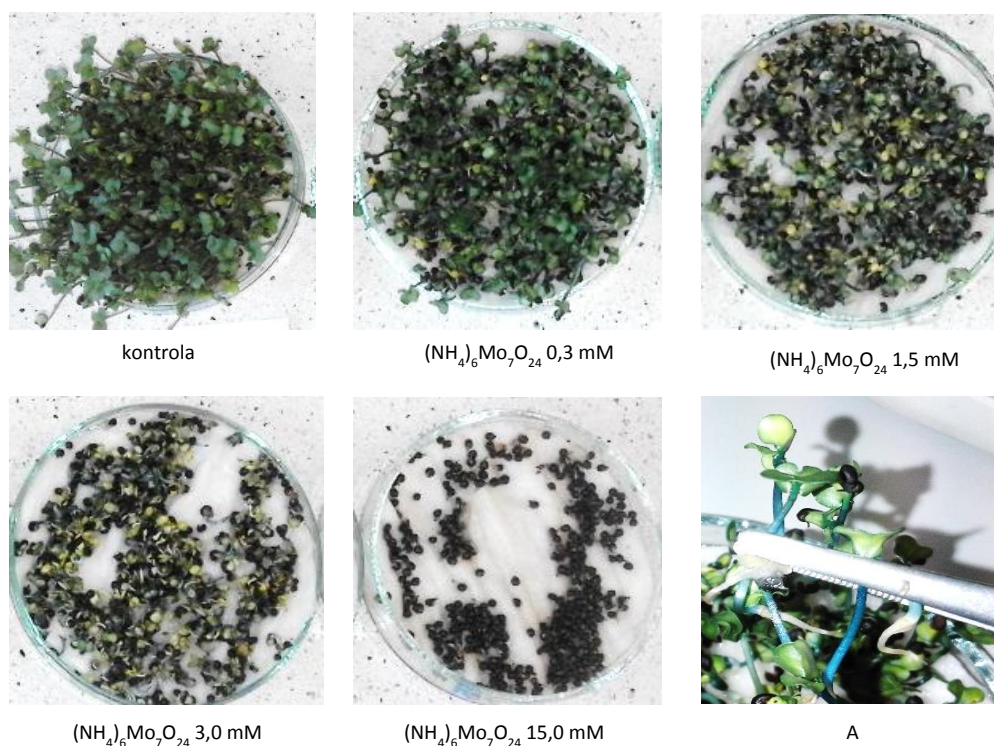
Dla wszystkich substratów aktywność aminopeptydaz była wyższa w przypadku roślin podlewanych roztworami o stężeniach 0,03-0,15 mM. Wzrost aktywności mieścił się w zakresie od 16-70%. W przypadku 0,3 mM roztworu chlorku miedzi(II), aktywność aminopeptydaz nie różniła się od kontroli (substraty z *N*-końcową alaniną i leucyną), lub była niższa o 15-33%. Spadek aktywności obserwowany dla rzepaku podlewanego 0,3 mM roztworem soli miedzi jest w zgodzie z wynikami otrzymanymi dla ekstraktów z 120h siewek rzepaku (rysunek 25, rozdział 5.3.3). W literaturze znany jest bezpośredni wpływ miedzi na oczyszczone enzymy. Przykładowo, inkubacja z 1 mM roztworem soli miedzi prowadziła do 33% spadku aktywności oczyszczonej aminopeptydazy leucynowej z nasion jęczmienia<sup>36</sup>. Nie oznacza to jednak, że miedź w postaci stosowanej do nawożenia roślin będzie działała tak samo. Mikroelement ten działając na całą roślinę może wpływać na ekspresję genów, w tym genów kodujących aminopeptydazy. Takie zjawisko obserwujemy przy podlewaniu siewek roztworami soli miedzi o stężeniu 0,03 i 0,15 mM. Wyjaśnienie takiego zjawiska jest złożone, gdyż może się na niego składać kilka czynników. W odpowiedzi na stres mogło dojść do intensyfikacji ekspresji genów kodujących aminopeptydazy, w celu zapewnienia odpowiedniej ilości wolnych aminokwasów. Natomiast po przekroczeniu pewnego stężenia jonów miedzi doszło do zahamowania tych szlaków. Podobny, negatywny wpływ miedzi obserwowano dla liścieni fasoli (*Phaseolus vulgaris* L.), gdzie następowała inhibicja badanych aminopeptydaz. Skutkowało to zatrzymaniem mobilizacji białek zapasowych i zaburzeniami w dystrybucji azotu na poziomie enzymatycznym. Sugerowano, że jony miedzi powodowały inhibicję

ścieżki metabolicznej związanej z aktywnością aminopeptydaz, nazywaną szlakiem ubikwityna-proteasom<sup>222,223</sup>.

#### 5.4.4.6. Wpływ molibdenu

Molibden występuje w roślinach w bardzo małych ilościach. Jest niezbędny dla prawidłowego działania nitrogenazy i reduktazy azotanowej (enzymy zaangażowane w metabolizm azotu)<sup>4</sup>. W eksperymencie zastosowano  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ , jest to związek będący składnikiem nawozów sztucznych. Dla rzepaku zalecana dawka molibdenu to 60 g/ha<sup>224</sup>. Zatem nawet najniższe zastosowane stężenia  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$  przekraczały kilkukrotnie zalecaną dawkę (przy stężeniu 0,3 mM całkowita dawka Mo wynosiła 3,17 kg/ha).

Wpływ podlewania rzepaku roztworami heptamolibdenianu amonu przedstawiono na rysunku 50.



Rys.50. Wpływ podlewania roztworami  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$  na wzrost siewek rzepaku ozimego; (A) - zdjęcie zabarwionych na niebiesko łodyżek siewki rzepaku

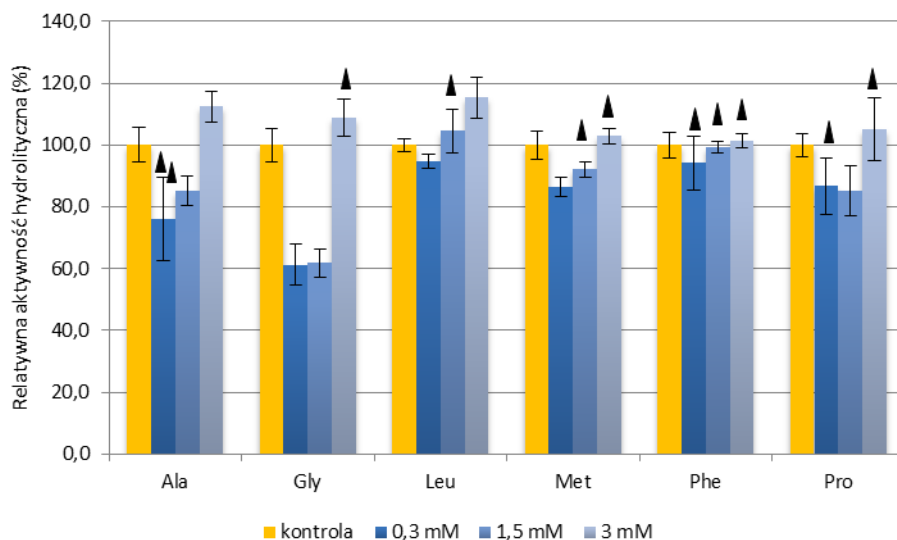
*Uprawa w trybie: 24 h imbibicji + 48 h kielkowania w ciemności + 96 h kielkowania w świetle w kontrolowanych warunkach (26°C, wilgotność 65%, 16 h światła i 8 h ciemności). Siewki rzepaku podlewano roztworami soli o stężeniach: 0,3, 1,5, 3, 15 i 30 mM raz dziennie, od drugiej doby uprawy. Rośliny zebrano po 144 h uprawy.*

Wraz ze wzrostem stężenia stosowanej soli obserwowano ograniczenie wzrostu siewek rzepaku. Stężenia 15 i 30 mM okazały się toksyczne dla roślin, rzepak nie wykiełkował. Stężenie 30 mM odpowiadało dawce Mo na poziomie 317 kg/ha. Ponadto w wyniku stosowania  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$  łodyżki siewek przybrały niebieską barwę (rysunek 50 (A)). Przebarwienie łodyżek jest efektem



wzrostu stężenia antocyjanin, które następuje w wyniku akumulacji molibdenu, z którym tworzą niebieski kompleks<sup>225</sup>.

Aktywność aminopeptydaz oznaczono dla ekstraktów białkowych z siewek podlewanych roztworami molibdenianu o stężeniach 0,3, 1,5 i 3 mM (rysunek 51).



Rys.51. Wpływ podlewania roztworami  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$  na aktywność aminopeptydaz w siewkach rzepaku po 144 h uprawy

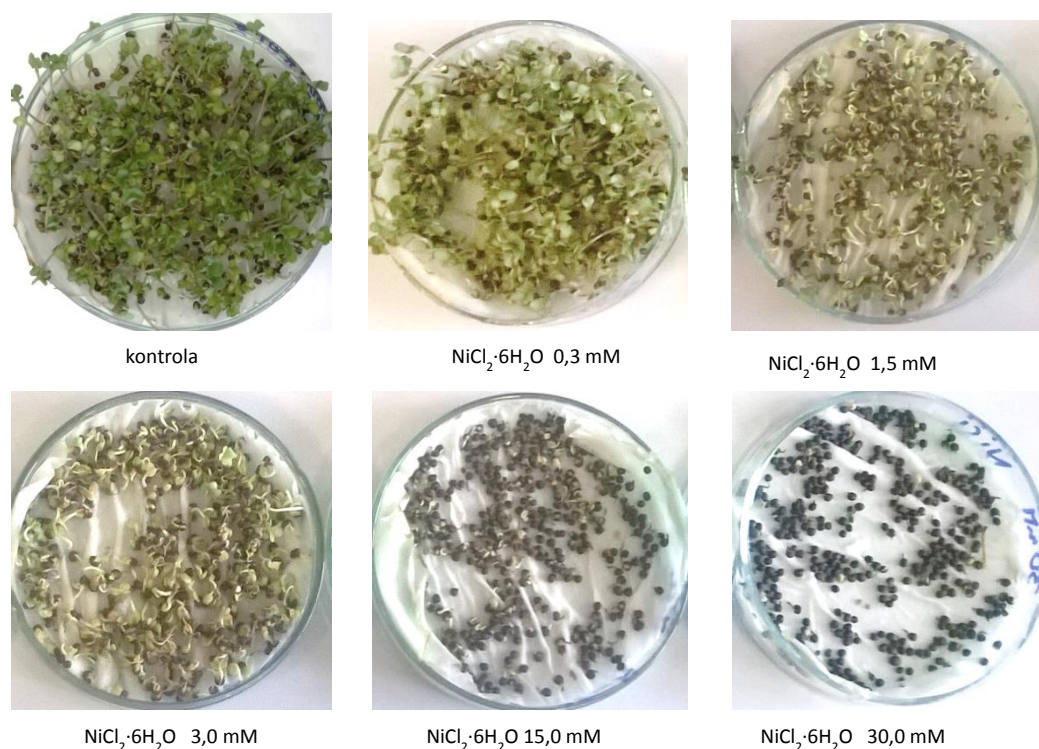
*Pomiary prowadzono w 50 mM buforze PBS o pH 7,0; stężenie substratu w próbie: 1mM; 100% przypisano aktywności wobec danego substratu uzyskanej dla próby kontrolnej; słupki błędów reprezentują odchylenia standardowe średniej z trzech powtórzeń; trójkąty nad słupkami oznaczają, że dana wartość nie różni się statystycznie od kontroli (poziom istotności ( $p < 0,05$ ) obliczony z wykorzystaniem testu t-Studenta ( $n=3$ )).*

Podlewanie siewek rzepaku roztworami molibdenianu amonu nie wpływało lub w niewielkim stopniu obniżało aktywność aminopeptydaz. Jedynie dla substratu z *N*-końcową glicyną obserwowano spadek aktywności o 40%, w stosunku do kontroli dla siewek podlewanych roztworami o stężeniu 0,3 i 1,5 mM. Brak jest doniesień na temat wpływu tego mikroelementu bezpośrednio na działanie roślinnych aminopeptydaz. Należy też zwrócić uwagę, że rzepak podlewany 3 mM roztworem znajdował się w widocznie wcześniejszym stadium rozwoju niż kontrola i pozostałe próby. Z przeprowadzonych obserwacji wynika, że mimo iż molibden w wysokich dawkach jest silnie toksyczny w stosunku do siewek rzepaku, to nie ma bezpośredniego wpływu na aktywność aminopeptydaz w tej roślinie.

#### 5.4.4.7. Wpływ niklu

Nikiel zaliczany jest do mikroelementów od stosunkowo niedługiego czasu (1991 rok)<sup>226</sup>. Pobierany jest w postaci  $\text{Ni}^{2+}$ . Zawartość tego pierwiastka w roślinach jest bardzo niska (0,1-1 mg/kg s.m.). Stanowi składnik ureazy i wpływa na pobieranie przez roślinę żelaza<sup>4</sup>. Nikiel jako dodatek

do nawozów mineralnych wpływa pozytywnie na mrozoodporność i plonowanie rzepaku<sup>226</sup>. W większych ilościach działa silnie toksycznie na rośliny, co widać na rysunku 52.

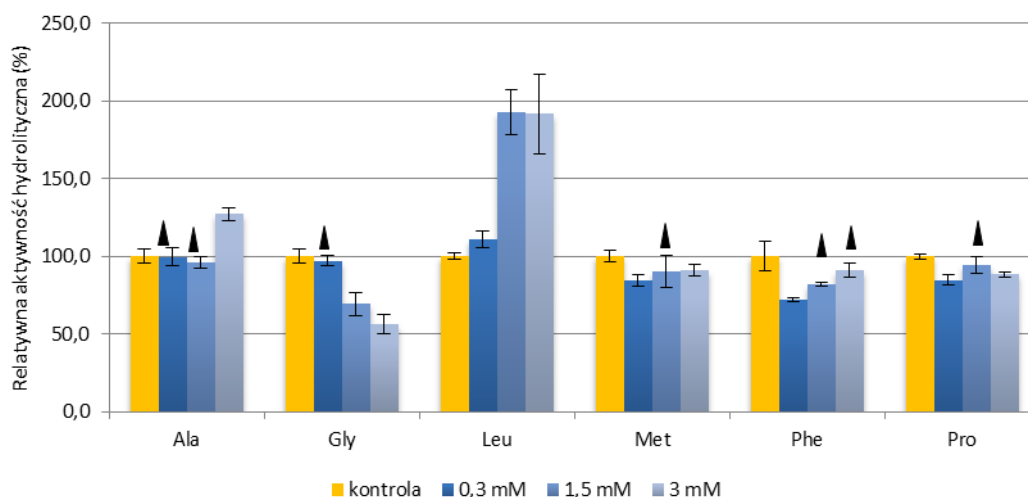


Rys.52. Wpływ podlewania roztworami  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  na wzrost siewek rzepaku ozimego

*Uprawa w trybie: 24 h imbibicji + 48 h kielkowania w ciemności + 96 h kielkowania w świetle w kontrolowanych warunkach (26°C, wilgotność 65%, 16 h światła i 8 h ciemności). Siewki rzepaku podlewano roztworami soli o stężeniach: 0,3, 1,5, 3, 15 i 30 mM raz dziennie, od drugiej doby uprawy. Rośliny zebrano po 144 h uprawy.*

Już przy najniższym stosowanym stężeniu (całkowita dawka 2,77 kg Ni/ha) obserwuje się ograniczenie wzrostu siewek rzepaku i chlorozę liści. Wraz ze wzrostem stężenia rośliny nie tylko kielkowały wolniej ale też charakteryzowały się nienaturalnie mniejszymi liścieniami. Stężenie soli 15 mM (dawka 138,5 kg Ni/ha) i wyższe okazały się toksyczne dla rzepaku. Rośliny nie wykiełkowały, nie zebrano próbek do dalszych badań.

Wyniki badań nad aktywnością aminopeptydaz w ekstraktach z siewek podlewanych roztworami soli niklu przedstawiono na rysunku 53.



Rys.53. Wpływ podlewania roztworami  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  na aktywność aminopeptydaz w siewkach rzepaku po 144 h uprawy

*Pomiary prowadzono w 50 mM buforze PBS o pH 7,0; stężenie substratu w próbce: 1mM; 100% przypisano aktywności wobec danego substratu uzyskanej dla próby kontrolnej; słupki błędów reprezentują odchylenia standardowe średniej z trzech powtórzeń; trójkąty nad słupkami oznaczają, że dana wartość nie różni się statystycznie od kontroli (poziom istotności ( $p < 0,05$ ) obliczony z wykorzystaniem testu t-Studenta ( $n=3$ )).*

Mimo wysokiej toksyczności niklu, nie zaobserwowano znaczących zmian w działaniu badanych enzymów w odpowiedzi na przenawożenie związkiem niklu, w stosunku do większości substratów. Jedynie dla Gly-pNA obserwowano stopniowy spadek aktywności aminopeptydaz. Natomiast w stosunku do Leu-pNA aktywność była prawie dwukrotnie wyższa w roślinach podlewanych roztworami o stężeniu 1,5 i 3 mM. Taka zmienność w działaniu na roślinne aminopeptydazy mogła być spowodowana faktem, że metal ten wpływa na metaloenzymy, oraz może wiązać się w centrum katalitycznym nie-metaloenzymów<sup>227</sup>. Brak jest doniesień na temat bezpośredniego wpływu tego mikroelementu na aminopeptydazy roślinne. Natomiast otrzymane wyniki są w zgodzie z badaniami przeprowadzonymi na ekstraktach z 120 h siewek rzepaku. Aktywność enzymów inkubowanych z dodatkiem soli niklu (0,1 mM) nie różniła się znacząco od kontroli (analizy prowadzono wobec substratów z N-końcową alaniną, fenyloalaniną i proliną).

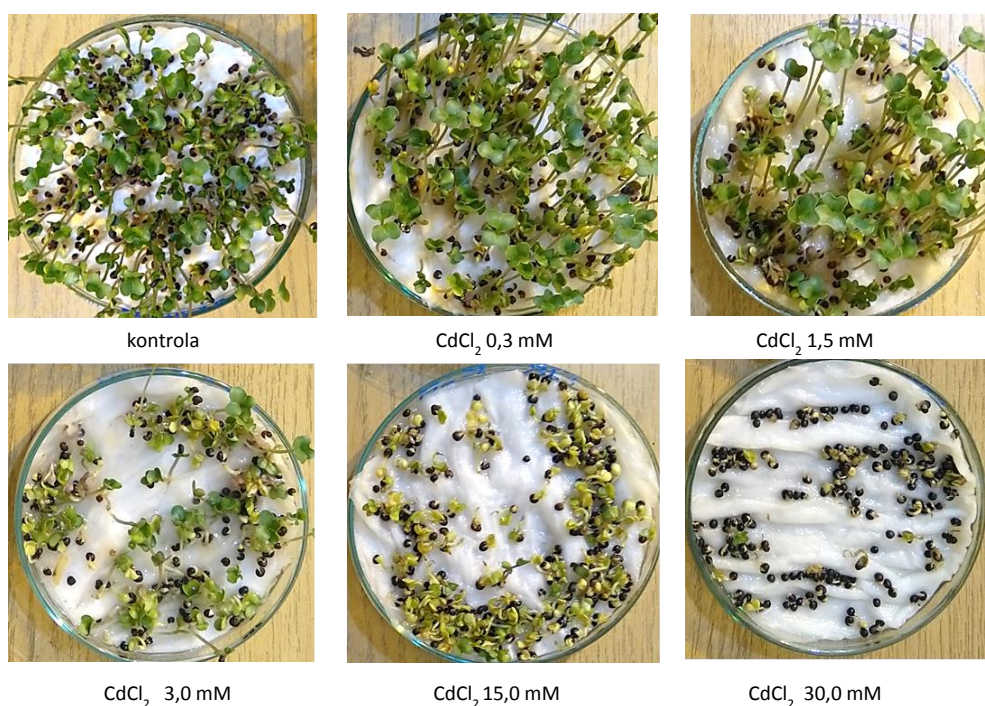
#### 5.4.5. Wpływ metali ciężkich

Badania nad wpływem metali ciężkich na aktywność aminopeptydaz w ekstraktach białkowych z siewek rzepaku ozimego przeprowadzono stosując związki kadmu, ołowiu i rtęci. Wymienione pierwiastki należą do grupy metali ciężkich o bardzo wysokim stopniu potencjalnego zagrożenia. Cd, Pb i Hg nie pełnią w organizmach roślinnych żadnej znanej funkcji<sup>103</sup>. Do badań użyto roztworów  $\text{CdCl}_2$ ,  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  i  $\text{HgCl}_2$  o stężeniach 0,3, 1,5, 3, 15 i 30 mM.

#### 5.4.5.1. Wpływ kadmu

Kadm, w postaci jonu  $\text{Cd}^{2+}$  (forma najczęściej występująca w glebie) jest łatwo pobierany przez system korzeniowy roślin. Objawy toksyczności tego pierwiastka pojawiają się już przy zawartości w glebie na poziomie 5-30 mg/kg. Kadm powoduje zaburzenia w przebiegu fotosyntezy oraz przemiany związków azotowych. Wpływa na zmiany w strukturze DNA oraz w przepuszczalności błon komórkowych. Jego silna toksyczność wynika z łatwości z jaką pierwiastek ten tworzy wiązania kowalencyjne i jonowe z atomami wodoru, tlenu i siarki<sup>103,228</sup>.

W przeprowadzonym eksperymencie zastosowano chlorek kadmu(II) w roztworach do podlewania o stężeniu 0,3, 1,5, 3, 15 i 30 mM. Wpływ stosowanych roztworów na wzrost i rozwój siewek rzepaku przedstawiono na rysunku 54.



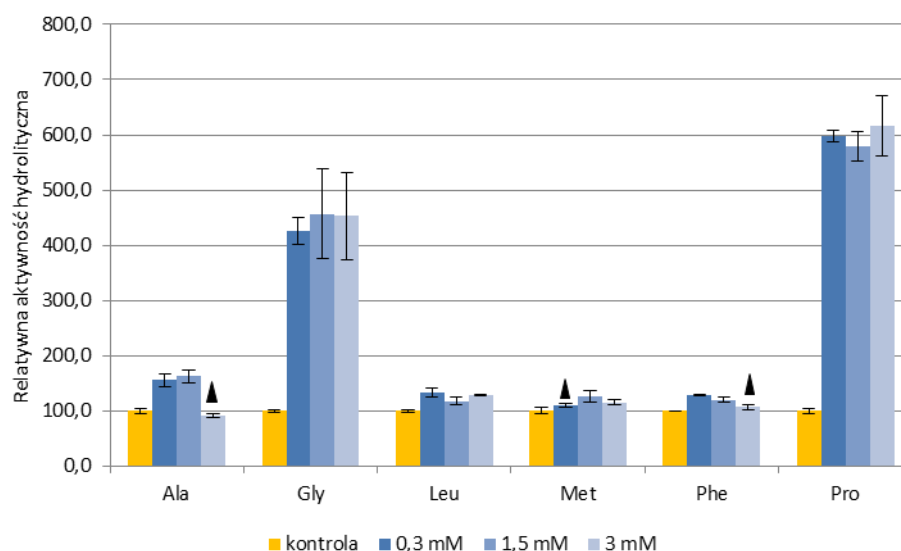
Rys.54. Wpływ podlewania roztworami  $\text{CdCl}_2$  na wzrost siewek rzepaku ozimego

*Uprawa w trybie: 24 h imbibicji + 48 h kielkowania w ciemności + 96 h kielkowania w świetle w kontrolowanych warunkach (26°C, wilgotność 65%, 16 h światła i 8 h ciemności). Siewki rzepaku podlewano roztworami o stężeniach: 0,3, 1,5, 3, 15 i 30 mM raz dziennie, od drugiej doby uprawy. Rośliny zebrano po 144 h uprawy.*

Negatywny wpływ jonów kadmu widoczny był już w próbce podlewanej roztworem o stężeniu 0,3 mM (chloroza liścieni). Wraz ze wzrostem stężenia obserwowano spowolnienie rozwoju siewek, ograniczenie ilości kiełkujących nasion oraz spadek zawartości chlorofilu. Rzepak należy do hiperakumulatorów i jest zdolny gromadzić duże ilości kadmu w swoich organach vegetatywnych<sup>229</sup>.

Wpływ podlewania roztworami soli kadmu na aktywności aminopeptydaz w ekstraktach białkowych z siewek rzepaku ozimego przedstawiono na rysunku 55.





Rys.55. Wpływ podlewania roztworami  $\text{CdCl}_2$  na aktywność aminopeptydaz siewkach rzepaku po 144 h uprawy

*Pomiary prowadzono w 50 mM buforze PBS o pH 7,0; stężenie substratu w próbce: 1mM; 100% przypisano aktywności wobec danego substratu uzyskanej dla próby kontrolnej; słupki błędów reprezentują odchylenia standardowe średniej z trzech powtórzeń; trójkąty nad słupkami oznaczają, że dana wartość nie różni się statystycznie od kontroli (poziom istotności ( $p < 0,05$ ) obliczony z wykorzystaniem testu t-Studenta ( $n=3$ )).*

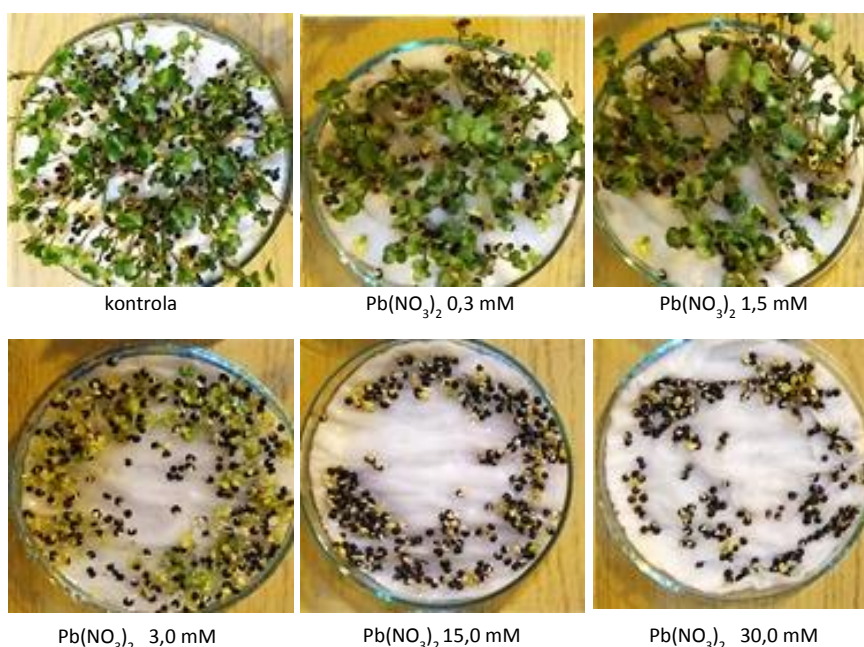
Zastosowanie roztworów chlorku kadmu do podlewania siewek rzepaku, skutkowało wzrostem aktywności aminopeptydaz w stosunku do dwóch substratów (*N*-końcowej glicyny i proliny). W stosunku do Gly-*p*NA obserwowano około 4,5-krotny wzrost aktywności, dla Pro-*p*NA wzrost był 6-krotny, niezależnie od stosowanego stężenia. Dla pozostałych substratów aktywność aminopeptydaz zmieniała się w stosunkowo niewielkim stopniu (do 50% w przypadku Ala-*p*NA) lub nie różniła się od kontroli. Obserwowana zmiana aktywności w stosunku do substratów z *N*-końcową glicyną i proliną była najprawdopodobniej odpowiedzią na stres związany z obecnością toksycznych jonów, a także zasoleniem i związanym z tym zapotrzebowaniem na zwiększone ilości osmoprotektantów. Zarówno glicyna jak i prolina są aminokwasami pełniącymi istotne role w tolerancji/aklimatyzacji roślin na stres<sup>230,231</sup>. Dodatkowo, ze względu na zaburzenia przemiany związków azotowych w obecności jonów kadmu, wysoka aktywność wobec *N*-końcowej glicyny może wynikać z roli tego aminokwasu jako źródła azotu (tzw. azotu organicznego). Podobny efekt działania jonów kadmu opisano dla aminopeptydazy prolinowej z siewek pszenżyta rosnących na pożywce zawierającej chlorek kadmu (ośmiokrotny wzrost aktywności)<sup>45</sup>. W literaturze opisano także przypadki zwiększonej ekspresji i aktywności innych aminopeptydaz w odpowiedzi na działanie kadmu. Przykładowo, chlorek kadmu wpływał na wzrost aktywności aminopeptydazy leucynowej w korzeniach pomidora. Obserwowano wzrost aktywności hydrolitycznej w stosunku do substratów z *N*-końcową leucyną i lizyną (5-krotny wzrost aktywności), metioniną (4-krotny wzrost aktywności), proliną i argininą (około 2-krotny wzrost aktywności)<sup>105</sup>. Aktywność dwóch aminopeptydaz

z peroksydomów siewek grochu zwyczajnego wzrosła natomiast o 55 i 31%, w stosunku do substratu z *N*-końcową leucyną<sup>104</sup>. W siewkach ryżu jony kadmu powodowały natomiast spadek aktywności aminopeptydazy leucynowej o 30-50%<sup>232</sup>.

#### 5.4.5.2. Wpływ ołowiu

Ołów w niewielkich ilościach naturalnie występuje w roślinach, jednak jego nadmiar ma działanie toksyczne. Ołów działa negatywnie na procesy fotosyntezy, metabolizm azotu i podział komórek roślinnych<sup>103</sup>. Pierwiastek ten może się akumulować w dużych ilościach w roślinach, zanim nastąpi zauważalny toksyczny efekt. W ten sposób ołów przedostaje się w górę łańcucha pokarmowego<sup>233</sup>.

Wpływ podlewania siewek rzepaku roztworami azotanu ołowiu(II) przedstawiono na rysunku 56.

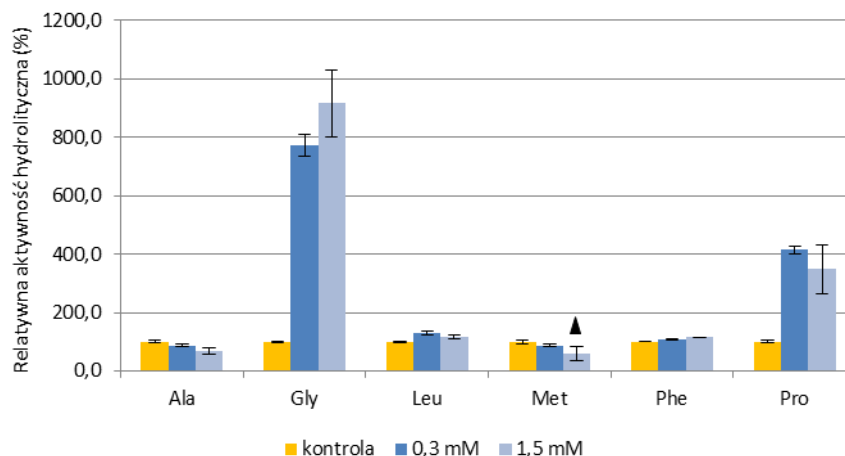


Rys.56. Wpływ podlewania roztworami  $Pb(NO_2)_2$  na wzrost siewek rzepaku ozimego

*Uprawa w trybie: 24 h imbibicji + 48 h kielkowania w ciemności + 96 h kielkowania w świetle w kontrolowanych warunkach (26°C, wilgotność 65%, 16 h światła i 8 h ciemności). Siewki rzepaku podlewano roztworami o stężeniach: 0,3, 1,5, 3, 15 i 30 mM raz dziennie, od drugiej doby uprawy. Rośliny zebrano po 144 h uprawy.*

Podlewanie roztworami ołowiu powodowało chlorozę liścieni i znaczne ograniczenie rozwoju. Powyżej stężenia 1,5 mM wzrost rzepaku był na tyle zahamowany, że nie zebrano próbek do dalszych badań.

Wpływ jonów ołowiu na aktywność aminopeptydaz w ekstraktach z siewek rzepaku ozimego przedstawiono na rysunku 57.



Rys.57. Wpływ podlewania roztworami  $Pb(NO_2)_2$  na aktywność aminopeptydaz w siewkach rzepaku po 144 h uprawy

*Pomiary prowadzono w 50 mM buforze PBS o pH 7,0; stężenie substratu w próbce: 1mM; 100% przypisano aktywności wobec danego substratu uzyskanej dla próby kontrolnej; słupki błędów reprezentują odchylenia standardowe średniej z trzech powtórzeń; trójkąty nad słupkami oznaczają, że dana wartość nie różni się statystycznie od kontroli (poziom istotności ( $p < 0,05$ ) obliczony z wykorzystaniem testu t-Studenta ( $n=3$ )).*

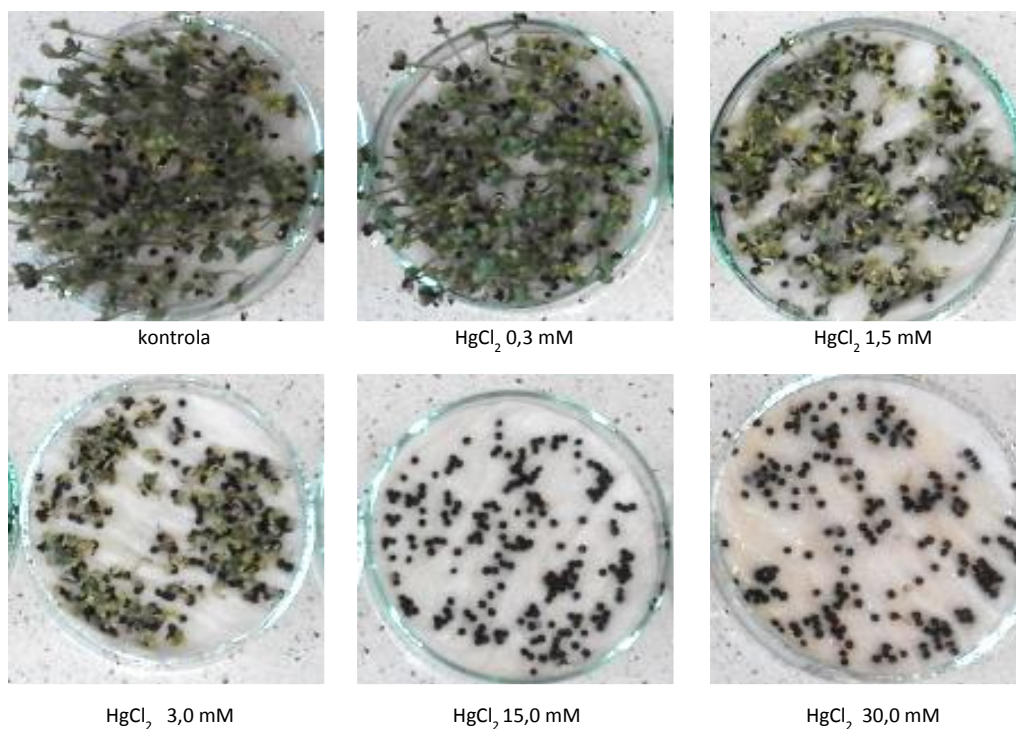
Podlewanie roztworami azotanu ołowiu(II) wpłynęło na wzrost aktywności aminopeptydaz, w stosunku do substratów z *N*-końcową glicyną i proliną. Podobnie jak w eksperymencie z kadmem nie obserwowano znaczących różnic w aktywności aminopeptydaz w stosunku do pozostałych substratów.

Otrzymane wyniki sugerują aktywację ścieżek obronnych, przeciwdziałających skutkom toksycznego działania ołowiu, a prowadzących do zwiększenia zawartości osmoprotektantów i azotu organicznego w komórkach rzepaku. Brak jest bezpośrednich doniesień dotyczących wpływu ołowiu na roślinne aminopeptydazy.

#### 5.4.5.3. Wpływ rtęci

Działanie toksyczne rtęci w komórkach roślinnych polega na zdolności tego pierwiastka do tworzenia połączeń z grupami  $-SH$  występujących w enzymach, prowadzącej do ich całkowitej, nieodwracalnej dezaktywacji. Ze względu na łatwość do wiązania się z siarką, mobilność rtęci w roślinach jest mocno ograniczona<sup>234</sup>.

Wpływ podlewania siewek rzepaku roztworami chlorku rtęci przedstawiono na rysunku 58.



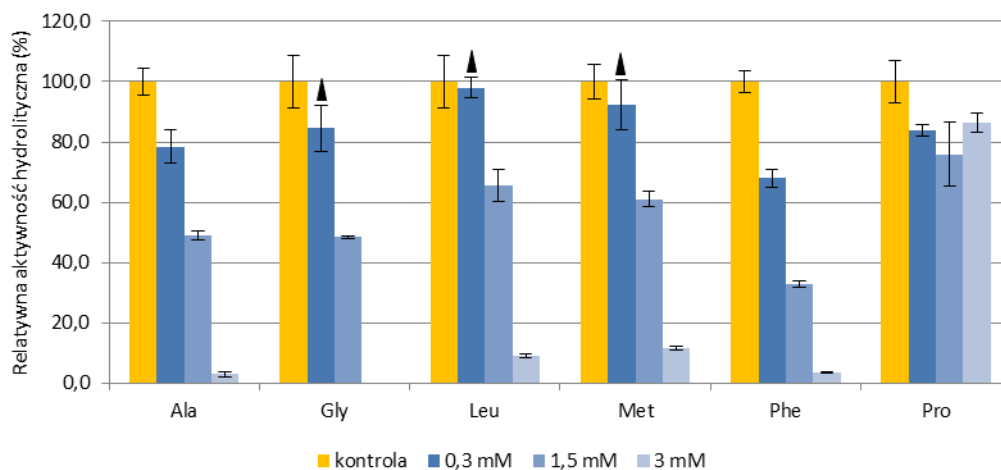
Rys.58. Wpływ podlewania roztworami  $\text{HgCl}_2$  na wzrost siewek rzepaku ozimego

*Uprawa w trybie: 24 h imbibicji + 48 h kielkowania w ciemności + 96 h kielkowania w świetle w kontrolowanych warunkach (26°C, wilgotność 65%, 16 h światła i 8 h ciemności). Siewki rzepaku podlewano roztworami o stężeniach: 0,3, 1,5, 3, 15 i 30 mM raz dziennie, od drugiej doby uprawy. Rośliny zebrano po 144 h uprawy.*

Wraz ze wzrostem stężenia stosowanych roztworów obserwowano ograniczenie wzrostu siewek, deformację liści oraz postępującą ich chlorozę. W próbach podlewanych roztworami o stężeniu  $\text{HgCl}_2$  15 i 30 mM nasiona nie wykłkowały.

Wpływ jonów rtęci na aktywność aminopeptydaz w ekstraktach białkowych z siewek rzepaku przedstawiono na rysunku 59.





Rys.59. Wpływ podlewania roztworami HgCl<sub>2</sub> na aktywność aminopeptydaz w siewkach rzepaku po 144 h uprawy

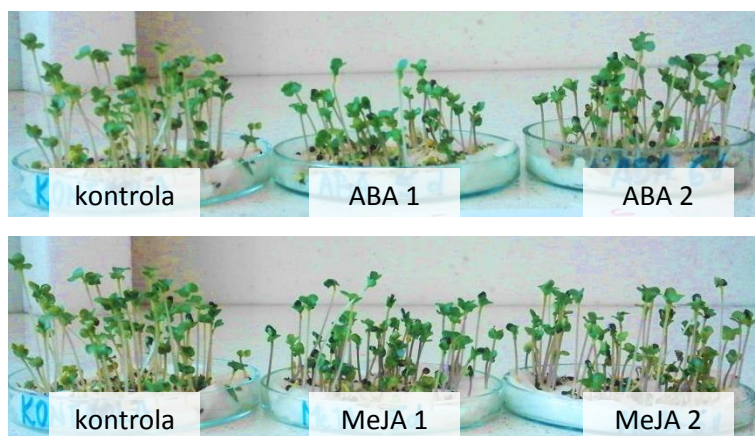
*Pomiary prowadzono w 50 mM buforze PBS o pH 7,0; stężenie substratu w próbce: 1mM; 100% przypisano aktywności wobec danego substratu uzyskanej dla próby kontrolnej; słupki błędów reprezentują odchylenia standardowe średniej z trzech powtórzeń; trójkąty nad słupkami oznaczają, że dana wartość nie różni się statystycznie od kontroli (poziom istotności ( $p < 0,05$ ) obliczony z wykorzystaniem testu t-Studenta ( $n=3$ )).*

Stosowanie roztworów chlorku rtęci do podlewania siewek rzepaku ozimego skutkowało spadkiem aktywności aminopeptydaz w ekstraktach białkowych z tych roślin. Wraz ze wzrostem stężenia roztworu, aktywność enzymatyczna w stosunku do pięciu stosowanych substratów była coraz mniejsza. Wyjątek stanowił substrat z *N*-końcową proliną, dla którego aktywność aminopeptydaz utrzymywała się na podobnym poziomie (75-85% aktywności kontroli), niezależnie od stosowanego stężenia roztworu do podlewania. Spadek aktywności może wynikać z powinowactwa jonów rtęci do grupy sulfhydrylowej cysteiny w centrum aktywnym enzymów. Rtęć powoduje denaturację białek. Z doniesień literaturowych wynika, że może również zastępować jon magnezu w chlorofilu<sup>235</sup>. Generalnie wysokie stężenie rtęci powoduje u roślin stres oksydacyjny, wpływa też negatywnie na pobieranie wody<sup>235,236</sup>, co może być przyczyną powstania stresu osmotycznego, który wraz z zasoleniem mógłby tłumaczyć utrzymującą się na podobnym poziomie aktywność aminopeptydaz wobec Pro-*p*NA. Biorąc pod uwagę znaczący spadek aktywności w stosunku do pozostałych substratów (łącznie z Gly-*p*NA) można przypuszczać, że utrzymująca się na stałym poziomie aktywność w stosunku do substratu z *N*-końcową proliną, była wynikiem kilku nakładających się efektów. Z jednej strony były to procesy dezaktywacji/denaturacji enzymów, a z drugiej silna aktywacja mechanizmów obronnych rośliny, objawiająca się nadekspresją genów kodujących aminopeptydazę specyficzną w stosunku do proliny. Brak jest doniesień na temat bezpośredniego wpływu rtęci na aktywność aminopeptydaz roślinnych.

#### 5.4.6. Wpływ roślinnych hormonów stresu

Do roślinnych hormonów stresu zalicza się kwas abscysynowy (ABA), kwas jasmonowy (JA) (aktywna forma to jasmonian metylu MeJA), kwas salicylowy i etylen. Hormony te biorą udział w odpowiedzi rośliny na stres, tworząc złożoną sieć interakcji. ABA jest wydzielany przede wszystkim w czasie wystąpienia stresu osmotycznego. Natomiast JA wydzielany jest w odpowiedzi na stropy biotyczne, na przykład atak patogenów czy roślinożerców<sup>4,237</sup>.

W przeprowadzonym eksperymencie stosowano roztwory kwasu abscysynowego i jasmonianu metylu, którymi jednorazowo podlano siewki rzepaku ozimego w 5 (ABA 1, MeJA 1) lub w 6 (ABA 2, MeJA 2) dobie kiełkowania. Rośliny zebrano w 7 dobie wzrostu. Stężenia roztworów hormonów dobrano na podstawie literatury<sup>66</sup>. Wpływ stosowanych hormonów na wzrost siewek przedstawiono na rysunku 60.

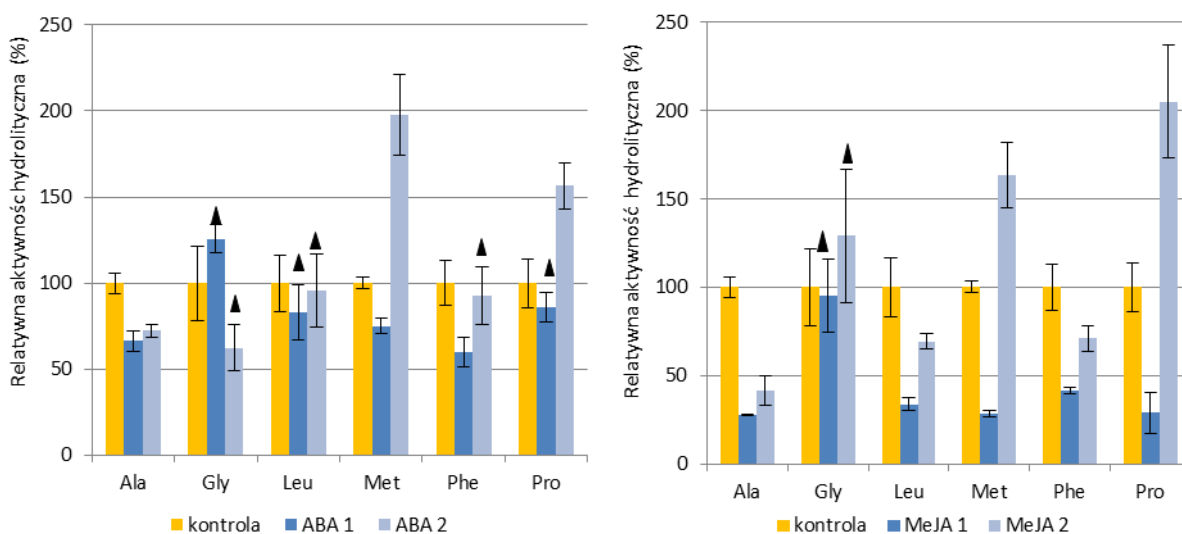


Rys.60. Wpływ kwasu abscysynowego i jasmonianu metylu na wzrost siewek rzepaku ozimego

*Uprawa w trybie: 24 h imbibicji + 48 h kiełkowania w ciemności + 96 h kiełkowania w świetle w kontrolowanych warunkach (26°C, wilgotność 65%, 16 h światła i 8 h ciemności). Siewki podlewano roztworami ABA (15 ml r-r 500µM) lub MeJA (15 ml 100 µM) w 5 (ABA 1, MeJA 1) lub w 6 (ABA 2, MeJA 2) dobie kiełkowania. Rośliny zebrano po 7 dniach uprawy*

W przeprowadzonym eksperymencie nie odnotowano znaczących różnic w wyglądzie siewek (kolorze i kształcie liści). W przypadku rzepaku podlewanego roztworem kwasu abscysynowego w 5 dobie, zauważono spowolnienie wzrostu, siewki były krótsze o około 40% w stosunku do kontroli. Obserwacje potwierdzają fakt, że hormon ten wpływa na hamowanie wzrostu roślin<sup>4</sup>. Na regulację kiełkowania wpływa też jasmonian metylu, jednak w przypadku stosowania MeJA, różnica we wzroście siewek nie była tak znaczna. Wpływ jasmonianów na kiełkowanie i wzrost nie jest do końca poznany. Ogólnie postuluje się, że związki te stymulują kiełkowanie nasion, ale spowalniają wzrost rośliny. Przykładowo JA wpływa hamująco na wzrost korzeni<sup>238</sup>.

Wpływ stosowanych hormonów na aktywność aminopeptydaz w ekstraktach białkowych z siewek rzepaku ozimego przedstawiono na rysunku 61.



Rys.61. Wpływ kwasu absycynowego i jasmonianu metylu na aktywność aminopeptydaz w ekstraktach białkowych

*Pomiary prowadzono w 50 mM buforze PBS o pH 7,0; stężenie substratu w próbce: 1; 100% przypisano aktywności wobec danego substratu uzyskanej dla próby kontrolnej; słupki błędów reprezentują odchylenia standardowe średniej z trzech powtórzeń; trójkąty nad słupkami oznaczają, że dana wartość nie różni się statystycznie od kontroli (poziom istotności ( $p < 0,05$ ) obliczony z wykorzystaniem testu t-Studenta ( $n=3$ )).*

Na podstawie otrzymanych wyników można zaobserwować, że aktywność aminopeptydaz zmienia się pod wpływem działania stosowanych hormonów stresu i zmiana ta jest zależna od czasu, który upłynął od aplikacji hormonu. W sytuacji gdy roztworem ABA podlano rośliny na dwie doby przed zbiorem (ABA 1) spadek aktywności aminopeptydaz o 25-40% zaobserwowano dla trzech substratów (Ala-, Met- i Phe-*p*NA). Dla pozostałych substratów zmiana aktywności nie była istotna statystycznie. Natomiast gdy hormon ten został podany na dobę przed zbiorem (ABA 2) zaobserwowano istotny wzrost aktywności w stosunku do substratów z *N*-końcówką metioniną (około 2-krotny) i proliną (1,5-krotny wzrost). W przypadku stosowania MeJA na dwie doby przed zbiorem (MeJA 1), aktywność enzymatyczna w stosunku do wszystkich substratów poza Gly-*p*NA spadła o 58-72%. Natomiast przy stosowaniu hormonu na dobę przed zbiorem zaobserwowano istotny wzrost aktywności w stosunku do Met-*p*NA (ponad 1,5-krotny) i Pro-*p*NA (2-krotny). Dla pozostałych substratów (poza Gly-*p*NA) aktywność aminopeptydaz była niższa od kontroli. Zbliżone oddziaływanie badanych hormonów stresu na aktywność aminopeptydaz mogła być związana z faktem, że związki te powodują podobne skutki w roślinach podczas wystąpienia stresu. Wydzielanie zarówno ABA jak i JA prowadzi do zamknięcia aparatów szparkowych, chociaż wykorzystywane są do tego różne ścieżki sygnałowe<sup>239</sup>. ABA aktywuje również geny odpowiedzialne za ochronę przed dehydratacją, w tym wpływa na syntezę osmoprotektantów<sup>240,241</sup>. Potwierdza to zwiększona aktywność aminopeptydaz wobec proliny, która jest związana z uruchomieniem przez ABA i MeJA szlaków ochrony rośliny przed dehydratacją. Natomiast wysoka aktywność

aminopeptydaz wobec substratu z *N*-końcową metioniną, mogła być konsekwencją zwiększonej ekspresji białek spowodowanej działaniem hormonów. Usunięcie *N*-końcowej metioniny jest zazwyczaj pierwszym etapem obróbki potranslacyjnej nowo zsyntetyzowanego białka, za proces ten u roślin odpowiada sześć różnych aminopeptydaz metioninowych<sup>5</sup>. W dostępnej literaturze znane są przypadki zwiększonej ekspresji lub aktywności aminopeptydaz roślinnych w odpowiedzi na działanie hormonów stresu. Zarówno w przypadku MeJA jak i ABA doniesienia te dotyczą aminopeptydaz leucynowych<sup>66,67,117,118</sup>. Aktywność aminopeptydazy leucynowej z pomidora wzrosła trzykrotnie po zastosowaniu MeJA i dwukrotnie gdy użyto ABA<sup>66</sup>. Dwukrotnie też wzrosła aktywność aminopeptydazy leucynowej z siewek nikli indyjskiej poddanych działaniu MeJA<sup>67</sup>. Brak jest doniesień na temat wpływu ABA i MeJA na inne aminopeptydazy roślinne np. prolinowe.

### **5.5. Wpływ wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych oraz zanieczyszczeń ropopochodnych na aktywność aminopeptydaz w siewkach rzepaku na wczesnym etapie wzrostu**

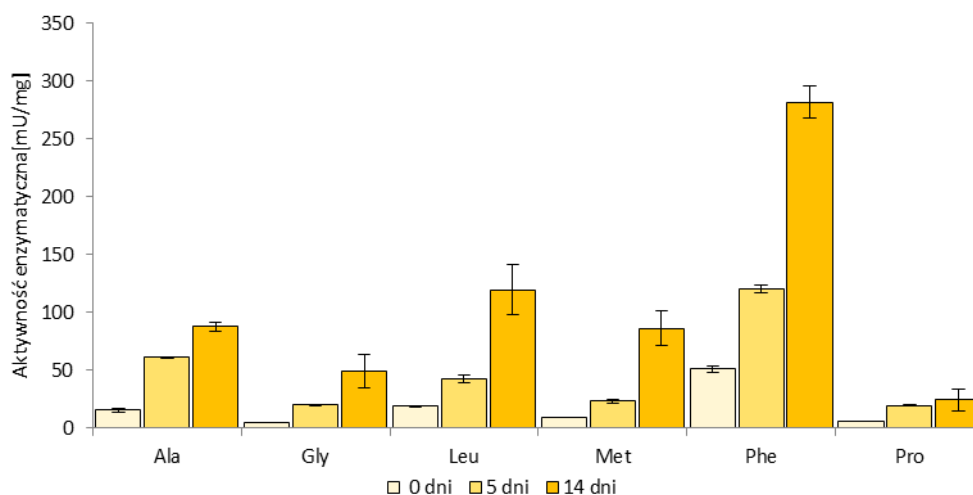
Intensywne wykorzystanie ropy naftowej, węgla kamiennego oraz transport drogowy stanowią największe źródła zanieczyszczeń ropopochodnych. Skażenie wielopierścieniowymi węglowodorami aromatycznymi, paliwami oraz produktami ich spalania dotyczy również obszarów rolniczych. Szczególnie narażone są tereny znajdujące się w pobliżu dużych szlaków komunikacyjnych i terenów przemysłowych. Poprzez akumulację w roślinach, substancje te zostają włączone do łańcucha pokarmowego<sup>242</sup>. Zanieczyszczenie gleby związkami ropopochodnymi i paliwami może spowodować zmiany w rozwoju roślin i zakłócenia równowagi biologicznej. Przeważnie obecność takich zanieczyszczeń upośledza pobieranie wody, składników odżywczych i minerałów. Dopuszczalne poziomy zanieczyszczenia gleby są zależne od klasyfikacji gruntu do jednej z czterech grup. Do pierwszej grupy zalicza się tereny mieszkaniowe, zurbanizowane i tereny rekreacyjno-wypoczynkowe. Druga grupa to grunty orne, łąki, sady, ogródki działkowe i pastwiska, grupa ta dzieli się jeszcze na podgrupy w zależności od parametrów gleby. Do trzeciej grupy zalicza się lasy, grunty zadrzewione i zakrzewione oraz nieużytki. Czwartą grupę stanowią tereny przemysłowe, komunikacyjne, przeznaczone pod budowę dróg i linii kolejowych<sup>243,244</sup>. W tabeli 25 przedstawiono dopuszczalne wartości zanieczyszczeń WWA oraz benzyny i oleju napędowego dla gruntów na głębokości 0-0,25 m.

Tab.25. Dopuszczalne wartości zanieczyszczeń (mg/kg suchej masy)<sup>243,244</sup>.

| Substancja   | Grupy gruntów / dopuszczalne stężenie zanieczyszczenia<br>(mg/kg suchej masy) |     |     |      |
|--|---|-----|-----|------|
|  | I   | II  | III | IV   |
| Benzen   | 0,1   | 0,1 | 10  | 100  |
| Naftalen   | 0,1   | 0,1 | 1   | 20   |
| Antracen   | 0,2   | 0,2 | 1   | 20   |
| Suma węglowodorów C <sub>6</sub> -C <sub>12</sub><br>składników frakcji benzyn | 1   | 1   | 50  | 500  |
| Suma węglowodorów C <sub>12</sub> -C <sub>35</sub><br>składników frakcji oleju | 30  | 50  | 300 | 3000 |

Jedynie doniesienia o wpływie WWA na aktywność aminopeptydaz roślinnych dotyczą aminopeptydazy leucynowej z siewek owsa poddanego różnym metodom remediacji. Wyniki tego eksperymentu sugerują, że natlenianie zanieczyszczonych gleb promuje wzrost aktywności aminopeptydaz roślin rosnących na tych podłożach<sup>138</sup>.

W przeprowadzonych badaniach siewki rzepaku ozimego odmiany Bellevue były uprawiane w ziemi zanieczyszczonej benzenem, naftalenem, antracenenem i fenantrenem, a także benzyną bezołowiową i olejem napędowym. Stosowano dodatek 2,5, 5 i 10%, w stosunku do masy uniwersalnej ziemi uprawnej, na której został posiany rzepak. Rośliny kiełkowały i rosły na zanieczyszczonym podłożu przez 14 dni i w większości przypadków osiągnęły stadium rozwoju BBCH 10. Na rysunku 62 przedstawiono jak kształtowała się aktywność aminopeptydaz roślin kontroli (rosnących na podłożu wolnym od zanieczyszczeń), na tym etapie wzrostu (po 14 dobach). Dla porównania, na rysunku umieszczono też aktywność aminopeptydaz w suchych ziarnach i siewkach po 120 h (5 dobach) uprawy. Porównano również te wartości z otrzymanymi dla suchych ziaren oraz siewek po 120 h wzrostu (5 dni).



Rys.62. Aktywność aminopeptydaz w rzepaku ozimym na różnych etapach wzrostu (0 dni – suche ziarno; 5 dni (120h); 14 dni

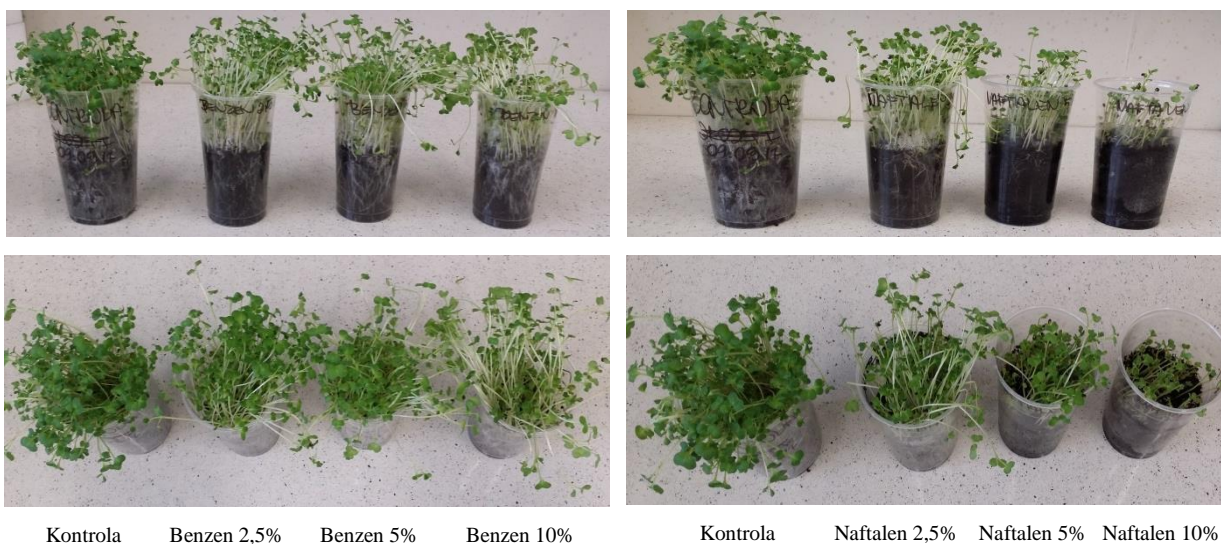
*Słupki błędów reprezentują odchylenia standardowe średniej z trzech powtórzeń*

Aktywność aminopeptydaz w ekstraktach białkowych z siewek rzepaku ozimego na etapie wzrostu BBCH 10 (14 dni wzrostu), była dużo wyższa niż we wcześniejszych fazach, szczególnie wobec substratu z *N*-końcową fenyloalaniną (około 282 mU/mg). W dalszej kolejności hydrolizowane były substraty Leu-*p*NA (120 mU/mg), Ala-*p*NA (88 mU/mg), Met-*p*NA (86 mU/mg) oraz Gly-*p*NA (49 mU/mg). Najniższą aktywność odnotowano dla substratu z *N*-końcową proliną (25 mU/mg). Wynika to zapewne z intensywnego wzrostu rośliny, przemiany białek zapasowych i zachodzących procesów metabolicznych. Stosunkowo wysoka aktywność wobec Met-*p*NA sugeruje, że na tym etapie dochodzi do intensyfikacji procesów potranslacyjnej obróbki białek. Jest to najprawdopodobniej związane z rozwojem pierwszych prawidłowych liści. Na etapie BBCH 10 liścienie są całkowicie rozwinięte, pojawia się ogonek pierwszego prawidłowego liścia<sup>142</sup>. Otrzymane wyniki potwierdzają kluczową rolę aminopeptydaz metioninowych w potranslacyjnej obróbce białek<sup>5</sup>. Można również stwierdzić, że aktywność i specyficzność aminopeptydaz rzepaku (a właściwie poziom ekspresji genów kodujących te enzymy) silnie zależy od wieku i kondycji rośliny.

#### 5.5.1. Benzen, naftalen, antracen, fenantren

Obecność benzenu, naftalenu, antracenu i fenantrenu w ziemi uprawnej wpłynęła niekorzystnie na wzrost i rozwój siewek rzepaku ozimego (rysunek 63 i 64).





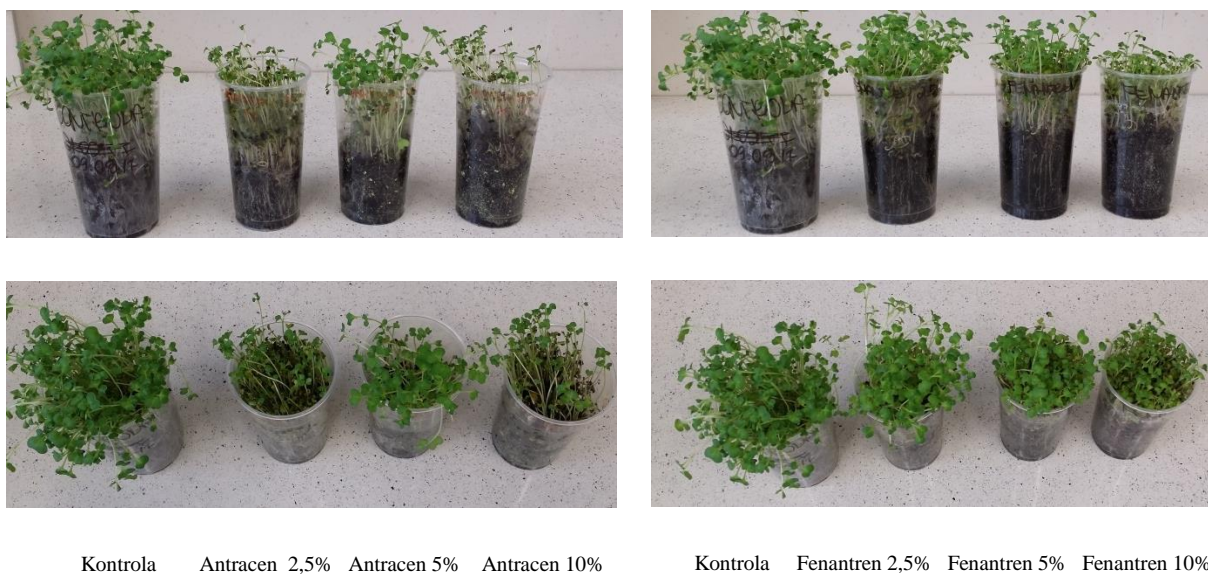
**A**

**B**

Rys.63. Wpływ benzenu (A) i naftalenu (B) na wzrost siewek rzepaku ozimego (zdjęcia z boku i z góry)

*Uprawa w trybie: 24 h imbibicji, a następnie wzrost w świetle w kontrolowanych warunkach (26°C, wilgotność 65%, 16 h światła i 8 h ciemności). Nasiona wysiano na 100 g uniwersalnej ziemi uprawnej wzbogaconej o 2,5, 5 lub 10% dodatek badanego zanieczyszczenia.*

*Rośliny kontroli wzrastały na podłożu bez dodatków. Rośliny zebrano po 14 dniach uprawy*



**A**

**B**

Rys.64. Wpływ antracenu (A) i fenantrenu (B) na wzrost siewek rzepaku ozimego (zdjęcia z boku i z góry)

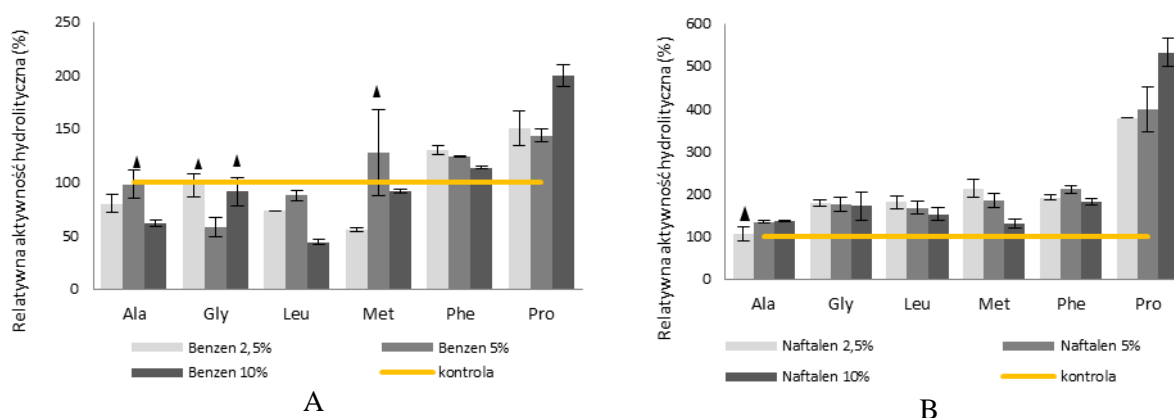
*Uprawa w trybie: 24 h imbibicji, a następnie wzrost w świetle w kontrolowanych warunkach (26°C, wilgotność 65%, 16 h światła i 8 h ciemności). Nasiona wysiano na 100 g uniwersalnej ziemi uprawnej wzbogaconej o 2,5, 5 lub 10% dodatek badanego zanieczyszczenia.*

*Rośliny kontroli wzrastały na podłożu bez dodatków. Rośliny zebrano po 14 dniach uprawy*

Dla wszystkich węglowodorów obserwowano ograniczenie długości i ilości korzeni siewek, jak i wzrostu części nadziemnych. Efekt ten był szczególnie widoczny dla siewek uprawianych w ziemi zanieczyszczonej naftalenem i antracenenem. Rzepak rosnący w ziemi zanieczyszczonej

benzenem charakteryzował się znacznym wydłużeniem łączy siewek, co może wynikać ze sposobu w jaki ten związek jest pobierany przez rośliny. Benzen jako najbardziej lotna ze stosowanych substancji pobierany jest przez aparaty szparkowe roślin<sup>245</sup>. Naftalen, antracen i fenantren pobierane są zarówno przez aparaty szparkowe jak i korzenie, a zdolność do ich pobierania jest cechą danego gatunku rośliny<sup>246,247</sup>.

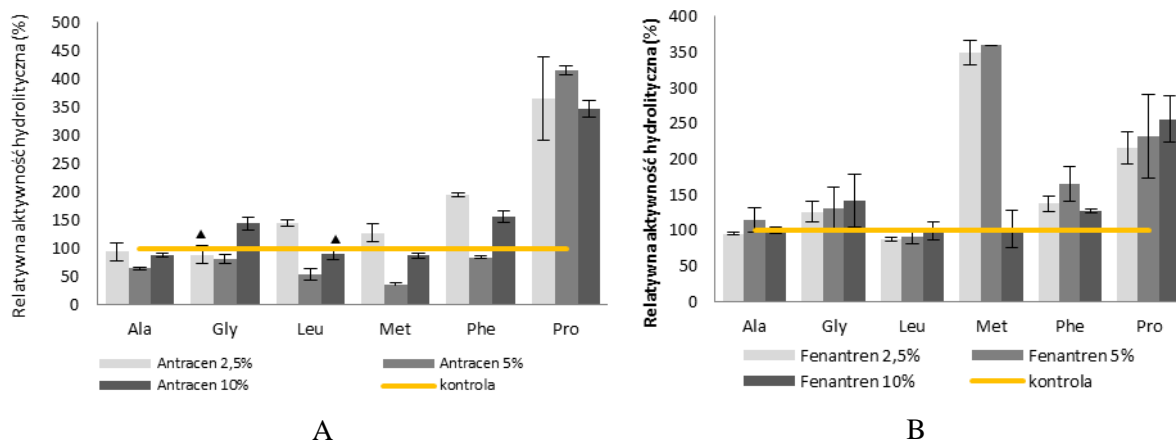
Skażenie podłoża benzenem i WWA wpłynęło także na aktywność aminopeptydaz w 14-dniowych siewkach rzepaku ozimego, co przedstawiono na rysunkach 65 i 66.



Rys.65. Wpływ benzenu (A) i naftalenu (B) na aktywność aminopeptydaz w ekstraktach z 14 dniowych siewek rzepaku

Oznaczenie: 87,5  $\mu$ l buforu PBS (50 mM) pH 7,0 + 2,5  $\mu$ l substratu + 10  $\mu$ l ekstraktu białkowego, temp. 37 °C, 10 minut, 100% przypisano aktywności wobec danego substratu uzyskanej dla próby kontrolnej; słupki błędów reprezentują odchylenia standardowe średniej z trzech powtórzeń; trójkąty nad słupkami oznaczają, że dana wartość nie różni się statystycznie od kontroli (poziom istotności ( $p < 0,05$ ) obliczony z wykorzystaniem testu *t*-Studenta ( $n=3$ )).





Rys.66. Wpływ antracenu (A) i fenantrenu (B) na aktywność aminopeptydaz w ekstraktach z 14 dniowych siewek rzepaku

Oznaczenie: 87,5  $\mu$ l buforu PBS (50 mM) pH 7,0 + 2,5  $\mu$ l substratu + 10  $\mu$ l ekstraktu białkowego, temp. 37 °C, 10 minut, 100% przypisano aktywności wobec danego substratu uzyskanej dla próby kontrolnej; słupki błędów reprezentują odchylenia standardowe średniej z trzech powtórzeń; trójkąty nad słupkami oznaczają, że dana wartość nie różni się statystycznie od kontroli (poziom istotności ( $p < 0,05$ )) obliczony z wykorzystaniem testu t-Studenta ( $n=3$ ).

Dla wszystkich stosowanych węglowodorów, szczególnie widoczny jest znaczący wzrost aktywności w stosunku do substratu z *N*-końcową proliną. Największy wzrost aktywności obserwowano w ekstraktach z roślin uprawianych w ziemi zanieczyszczonej naftalenem (ponad 5-krotny wzrost aktywności wobec Pro-*p*NA, przy stężeniu naftalenu 10%). W przypadku antracenu wzrost aktywności był 3,5-4-krotny, a dla fenantrenu około 2,5-krotny. Dla siewek rosnących w ziemi z dodatkiem benzenu, aktywność wobec tego substratu wzrosła o 50-100%, w zależności od stężenia zanieczyszczenia. Tak znaczący wzrost aktywności aminopeptydaz wobec proliny, świadczy o ich kluczowej roli w akumulacji wolnej proliny, pełniącej rolę osmoprotektanta<sup>4</sup>. Wiadomo, że obecność WWA wpływa na upośledzenie pobierania wody przez system korzeniowy. Zaobserwowano również 3,5-krotny wzrost aktywności wobec substratu z *N*-końcową metioniną, przy zanieczyszczeniu fenantrenem (dodatek 2,5 i 5%). Prawdopodobnie jest to związane z intensyfikacją modyfikacji białek, w celu ograniczenia niekorzystnego wpływu zanieczyszczeń. Brak jest jednak doniesień na temat bezpośredniego wpływu WWA czy benzenu na aktywność roślinnych aminopeptydaz.

#### 5.5.2. Olej napędowy i benzyna bezołowiowa (95)

Zanieczyszczenia komunikacyjne (olej napędowy, benzyna) mogą stanowić poważne zagrożenie dla upraw rzepaku. Zbadano wpływ tych substancji na kondycję roślin, jak również na aktywność aminopeptydaz, stosując olej napędowy oraz 95-oktanową benzynę bezołowiową (rysunek 67).



Kontrola    Pb 95 2,5%    Pb 95 5%    Pb 95 10%

Kontrola    ON 2,5%    ON 5%    ON 10%

**A**

**B**

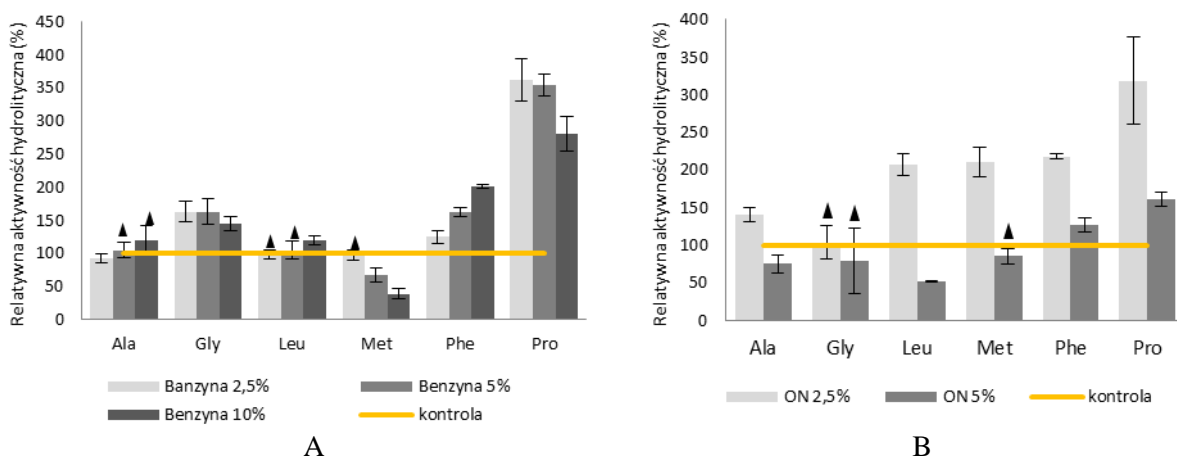
Rys.67. Wpływ benzyny bezołowiowej 95 (A) i oleju napędowego (B) na wzrost siewek rzepaku ozimego (zdjęcia z boku i z góry)

*Uprawa w trybie: 24 h imbibicji wzrost w świetle w kontrolowanych warunkach (26°C, wilgotność 65%, 16 h światła i 8 h ciemności). Nasiona wysiano na 100 g uniwersalnej ziemi uprawnej wzbogaconej o 2,5, 5 lub 10% dodatek badanego zanieczyszczenia. Rośliny kontroli wzrastały na podłożu bez dodatków. Rośliny zebrano po 14 dniach uprawy*

W przypadku 95-oktanowej benzyny bezołowiowej nie obserwowano znaczących zmian we wzroście i rozwoju naziemnych części siewek rzepaku. Natomiast, w porównaniu do kontroli, korzenie rzepaku rosnącego na skażonym podłożu były zarówno krótsze jak i mniej rozwinięte. Efekt ten jest tym większy im wyższe było stężenie benzyny w podłożu. Obecność oleju napędowego w ziemi, w której uprawiano rzepak ozimy, wpłynęła na niemal całkowite zahamowanie wzrostu rzepaku. Dla stężeń 2,5 i 5% udało się zebrać próbki roślin, choć były one zdecydowanie mniejsze niż rośliny kontroli. Obserwowano również chlorozę liści (intensywniejszą przy stężeniu oleju napędowego 5%). Wyjaśnieniem takiego wpływu badanych paliw może być ich skład. Benzyna składa się przede wszystkim z węglowodorów alifatycznych C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub>, natomiast olej napędowy, to poza węglowodorami alifatycznymi mieszanina ciekłych węglowodorów cyklicznych, w tym aromatycznych. Najprawdopodobniej obecność węglowodorów naftenowych i aromatycznych wpłynęła na upośledzenie pobierania wody oraz składników mineralnych przez korzenie rzepaku, skutkując niemal całkowitym zahamowaniem wzrostu siewek. Należy również pamiętać, że zarówno benzyna jak i olej napędowy posiadają w swoim składzie różne dodatki. W przypadku benzyny bezołowiowej są to między innymi: środki przeciwstukowe (etanol, toluen, kumen, MTBE - eter tert-butylowo-metylowy), inhibitory utleniania (aminy aromatyczne i fenole), detergenty i substancje dyspergujące (polibutylenoaminy, polieteroaminy), stabilizatory (wyższe alkohole i kwasy karboksylowe na przykład: n-dekanol i kwas palmitynowy), środki poprawiające smarność (kwasy

karboksylowe, estry, aminy) i inne (biocydy, markery, substancje zapachowe, deemulgatory)<sup>248</sup>. W oleju napędowym znajdują się między innymi dodatki zwiększające liczbę cetanową (np. azotan 2-etyloheksylu, nadtlenuk di-tert-butylu), detergenty (pochodne amidowe lub imidowe bezwodnika bursztynowego lub różnego typu zasady Mannicha), środki poprawiające smarność (kwasy monokarboksylowe, amidy, estry) i katalizatory utleniania sadzy (organorozpuszczalne związki zawierające tlenki metali, szczególnie żelaza). Ponadto w oleju napędowym znajdują się środki przeciwdziałające pienieniu, dodatki antystatyczne, depresatory (związki obniżające temperaturę powstawania kryształów wosków), biocydy, inhibitory korozji, markery, stabilizatory i inne<sup>249</sup>. Zawartość wymienionych dodatków w benzynie i oleju napędowym waha się od kilku do kilkuset mg/kg, niemniej jednak mogą one wpływać na wzrost i rozwój siewek rzepaku<sup>248,249</sup>. Nie bez znaczenia jest też fakt, że benzyna jest bogatsza w bardziej lotne składniki niż olej napędowy. Będzie to wpływało na zmniejszanie się stężenia zanieczyszczeń w glebie w czasie, co również ma znaczenie dla kondycji siewek.

Wpływ zanieczyszczenia ziemi paliwami wpłynęło na aktywność aminopeptydaz w ekstraktach z 14-dniowych siewek rzepaku ozimego (rysunek 68).



Rys.68. Wpływ benzyny bezołowiowej 95 (A) i oleju napędowego (B) na aktywność aminopeptydaz w ekstraktach z 14 dniowych siewek rzepaku

Oznaczenie: 87,5  $\mu$ l buforu PBS (50 mM) pH 7,0 + 2,5  $\mu$ l substratu + 10  $\mu$ l ekstraktu białkowego, temp. 37 °C, 10 minut, 100% przypisano aktywności wobec danego substratu uzyskanej dla próby kontrolnej; słupki błędów reprezentują odchylenia standardowe średniej z trzech powtórzeń; trójkąty nad słupkami oznaczają, że dana wartość nie różni się statystycznie od kontroli (poziom istotności ( $p < 0,05$ ) obliczony z wykorzystaniem testu t-Studenta ( $n=3$ )).

Podobnie jak w przypadku zanieczyszczenia benzenem i WWA, największy wzrost aktywności aminopeptydaz obserwowano w stosunku do substratu z *N*-końcową proliną. Była to jedna ze ścieżek obronnych rośliny, mająca na celu zwiększenie zawartości wolnej proliny jako osmoprotektanta. W siewkach rosnących w ziemi zanieczyszczonej benzyną, potwierdzeniem uruchomienia ścieżki obronnej był również wzrost aktywności wobec *N*-końcowej glicyny

(osoprotektanta, źródła azotu). Składniki paliw powodują ograniczenia w pobieraniu wody przez roślinę, a co za tym idzie tzw. suszę fizjologiczną. Brak jednak doniesień naukowych na temat wpływu tego rodzaju zanieczyszczeń na aktywność aminopeptydaz roślinnych. Na podstawie uzyskanych danych można wysnuć wniosek, że pod wpływem badanych zanieczyszczeń, uruchomione zostały mechanizmy obronne, polegające między innymi na intensyfikacji ekspresji genów kodujących aminopeptydazy (a co za tym idzie wzroście aktywności tych enzymów), w szczególności tych specyficznych w stosunku do proliny i glicyny. W przypadku oleju napędowego bezpośrednie porównanie otrzymanych wyników do kontroli nie było do końca możliwe, ze względu na znaczne ograniczenie wzrostu siewek w zanieczyszczonej glebie. Rośliny te znajdowały się na innym etapie wzrostu.

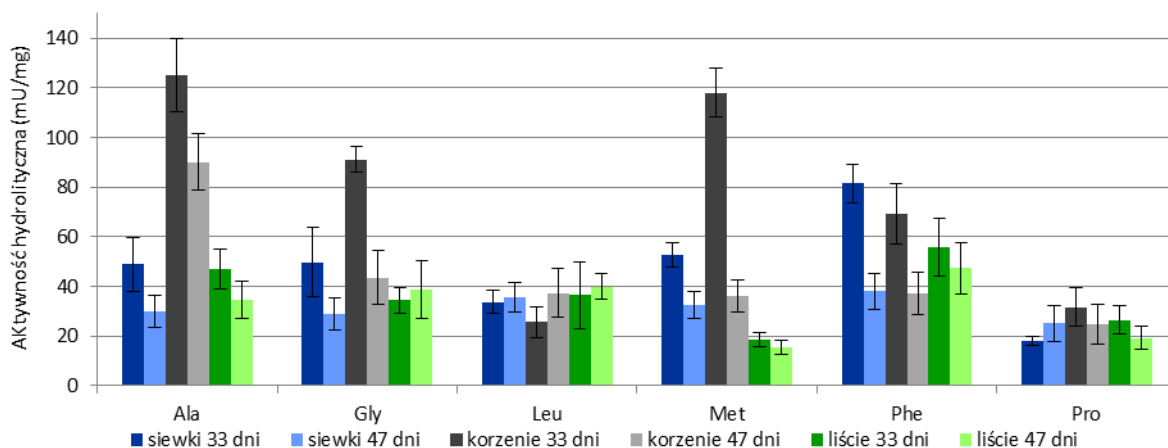
### **5.6. Wpływ grzybów chorobotwórczych na aktywność aminopeptydaz w siewkach rzepaku**

Znanych jest około 10 000 gatunków grzybów zdolnych do atakowania roślin. Poszczególne gatunki różnią się od siebie zjadliwością, ilością i różnorodnością żywicieli, oraz sposobami atakowania i kolonizacji rośliny. Najbardziej wrażliwe są kiełkujące nasiona i młode siewki<sup>125</sup>. Dane literaturowe opisują wpływ infekcji grzybami z gatunku *Fusarium oxysporum* i *Aspergillus niger* na aktywność aminopeptydaz leucynowych w nikli indyjskiej. Udowodniono, że aktywność jednej z aminopeptydaz (AP1) była ponad dwukrotnie większa u roślin zarażonych tymi patogenami<sup>130</sup>.

W celu określenia czy obecność grzybów chorobotwórczych spowoduje uruchomienie reakcji obronnych związanych z aktywnością aminopeptydaz, zastosowano cztery szczepy grzybów. Nasiona rzepaku wysiano na ziemi wymieszanej z inokulum jednego ze szczepów grzybów (*Pythium aristosporum*, *Rhizoctonia cerealis*, *Rhizoctonia solani* i *Fusarium culmorum*). Grzyby z gatunku *Fusarium*, *Pythium* i *Rhizoctonia* mogą powodować zgorzel siewek. Choroba ta poraża zarówno rośliny uprawne (w tym rzepak), jak i wiele gatunków drzew i krzewów leśnych. Rozróżnia się dwa rodzaje zgorzeli. Zgorzel przedwzrostowa atakuje rośliny już na etapie kiełkowania, co najczęściej skutkuje brakiem wschodów. Natomiast zgorzel powzrostowa atakuje 3-6-tygodniowe siewki, starsze rośliny na ogół wykazują odporność na zakażenie<sup>250,251</sup>. Głównymi objawami tej choroby są: zahamowanie wzrostu, czernienie korzenia głównego, zanik korzeni bocznych, przewężanie się łodyżek u nasady oraz przewracanie się siewek. Ponadto na korzeniach i liścieniach mogą się pojawiać brunatne plamy, a w miejscu porażenia występuje białoróżowy nalot<sup>250,252</sup>.

Uprawę rzepaku oraz przygotowanie inokulum wykonano we współpracy z Instytutem Ochrony Roślin- Państwowy Instytut Badawczy, Oddział Sośnicowice. Kontrolę stanowiły rośliny kiełkujące na podłożu wolnym od patogenów. Nasiona wysiano w 60-dółkowych wielodoniczkach z odprowadzeniem wody (2 wielodoniczki dla każdego gatunku patogenu i kontroli). W każdym z dołków znajdowało się jedno ziarno rzepaku ozimego odmiany Bellevue. Rzepak zebrano w dwóch terminach, po 33 i 47 dniach od siewu, rośliny znajdowały się w stadium wzrostu BBCH 15

(faza 5-tego liścia). W celu określenia profilu aktywności aminopeptydaz w rzepaku na tym etapie wzrostu, zbadano aktywność badanych enzymów w roślinach kontroli. Osobno analizowano ekstrakty z korzeni, liści i całych siewek (rysunek 74).



Rys.74. Aktywność aminopeptydaz w ekstraktach z rzepaku na etapie BBCH 15 (rośliny kontroli), po 33 i 47 dniach wzrostu,

Pomiary prowadzono w 50 mM buforze PBS o pH 7,0; stężenie substratu w próbce: 1 mM; słupki błędów reprezentują odchylenia standardowe średniej z trzech powtórzeń

Aktywność wobec substratu z *N*-końcową leucyną i proliną w ekstraktach z roślin kontroli jest zbliżona, niezależnie od wieku i części rośliny. Natomiast dla substratu z *N*-końcową alaniną, glicyną i metioniną obserwowano podwyższoną aktywność w ekstraktach z korzeni 33-dniowych siewek. Wyjątkowo wysoka aktywność hydrolityczna aminopeptydaz w korzeniach 33-dniowych siewek mogła wynikać z procesów zachodzących w tej fazie wzrostu, w tych organach roślinnych. Wiadome jest, że aktywność/ekspresja aminopeptydaz różni się w poszczególnych organach roślin (na przykład w 18-dniowych siewkach pszenicy aktywność aminopeptydaz w stosunku do substratu z *N*-końcową leucyną była ponad dwukrotnie większa w korzeniach niż w liściach)<sup>101</sup>, a także zmienia się podczas wzrostu (np. podczas pierwszych 72 h wzrostu siewek jęczmienia aktywność aminopeptydaz w stosunku do wybranych substratów (np. Phe-*p*NA) wahała się nawet o 50%)<sup>161</sup>.

Obecność grzybów chorobotwórczych wpłynęła niekorzystnie na ilość wykiełkowanych nasion, co przedstawiono w tabeli 26.

Tab.26. Wydajność kiełkowania nasion rzepaku

|                               | Kontrola | <i>Rhizoctonia solani</i> | <i>Rhizoctonia cerealis</i> | <i>Fusarium culmorum</i> | <i>Pythium aristosporum</i> |
|-------------------------------|----------|---------------------------|-----------------------------|--------------------------|-----------------------------|
| %<br>wykiełkowanych<br>nasion | 95,0     | 66,7                      | 88,3                        | 90,0                     | 86,7                        |

W przypadku roślin kontroli nie wykiełkowało 5% nasion. W doniczkach zawierających glebę skażoną grzybami chorobotwórczymi obserwowano większy udział niewykiełkowanych nasion. Wynikało to zapewne z wystąpienia przedwzrostowej zgorzeli siewek. Najmniej nasion wykiełkowało w doniczkach zawierających grzyb *Rhizoctonia solani* (66,7%). Obserwowano też istotne różnice we wzroście siewek zakażonych grzybami chorobotwórczymi, a roślinami kontroli (rysunek 74 i 75).



Rys.74. Porównanie wzrostu i rozwoju siewek kontroli i zakażonych grzybami chorobotwórczymi po 33 dniach uprawy

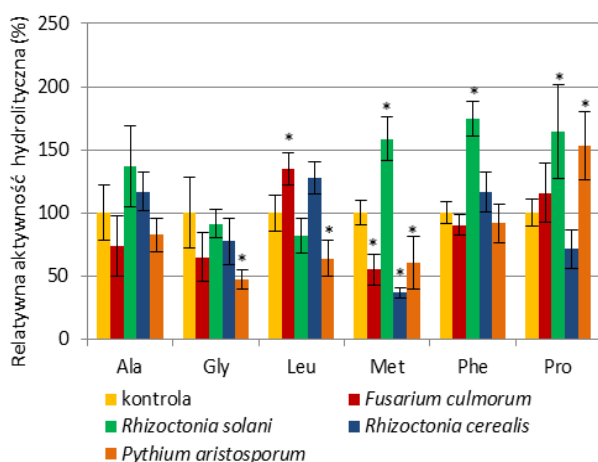


Rys.75. Porównanie wzrostu i rozwoju siewek kontroli i zakażonych grzybami chorobotwórczymi po 47 dniach uprawy



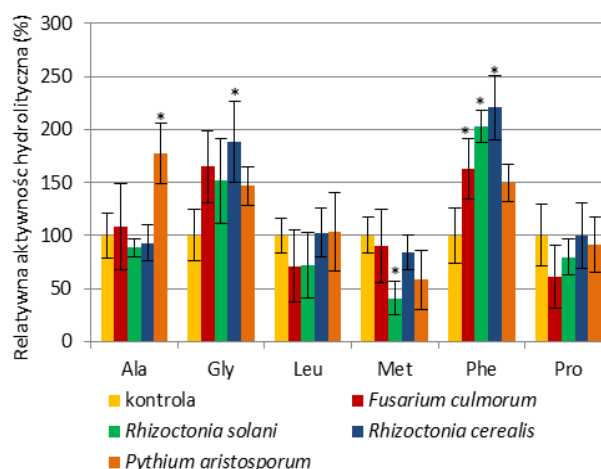
Zahamowanie wzrostu porażonych siewek było szczególnie widoczne w przypadku młodszych roślin (33 dni). Siewki rzepaku rosnącego na ziemi zakażonej grzybem z gatunku *Rhizoctonia solani* charakteryzowały się średnio o połowę krótszymi korzeniami i łodyżkami, oraz opóźnionym rozwojem (obecne były 3 liście, natomiast w kontroli 5 liści). Wraz ze wzrostem, różnice pomiędzy zainfekowanymi roślinami, a kontrolą były mniejsze. Po 47 dniach uprawy wszystkie wykiełkowane siewki znajdowały się na zbliżonym etapie rozwoju. Jednie dla roślin uprawianych w glebie skażonej *Rhizoctonia solani* rozwój był wyraźnie opóźniony (większość roślin rozwinęło jedynie 4 liście). Obserwowano również skrócenie korzeni siewek porażonych patogenami (za wyjątkiem eksperymentu z udziałem *Fusarium culmorum*). Przeprowadzone badania potwierdzają negatywny wpływ grzybów na rozwój rzepaku, ale jednocześnie wskazują, że wraz z rozwojem siewek w skażonym środowisku, następuje wzrost odporności na choroby wywoływane przez stosowane grzyby<sup>250,251</sup>, ponieważ zainfekowane rośliny podejmują walkę z patogenem<sup>125</sup>.

W celu określenia wpływu grzybów chorobotwórczych na aktywność aminopeptydaz rzepaku, przygotowano ekstrakty z całych siewek, korzeni i liści, a następnie oznaczono ich aktywność hydrolityczną wobec sześciu substratów. Na rysunkach 76 i 77 przedstawiono zmiany w aktywności aminopeptydaz występujących w całych siewkach rzepaku, rosnących w ziemi zawierającej różne gatunki grzybów.



Rys.76. Zmiany w aktywności aminopeptydaz w ekstraktach białkowych z 33-dniowych siewek rzepaku narażonych na działanie różnych gatunków grzybów chorobotwórczych

Pomiary prowadzono w 50 mM buforze PBS o pH 7,0; stężenie substratu w próbie: 1 mM; 100% przypisano aktywności wobec danego substratu uzyskanej dla próby kontrolnej; słupki błędów reprezentują odchylenia standardowe średniej z trzech powtórzeń; gwiazdki nad słupkami oznaczają, że dana wartość różni się statystycznie od kontroli (poziom istotności ( $p < 0,05$ ) obliczony z wykorzystaniem testu t-Studenta ( $n=3$ )).

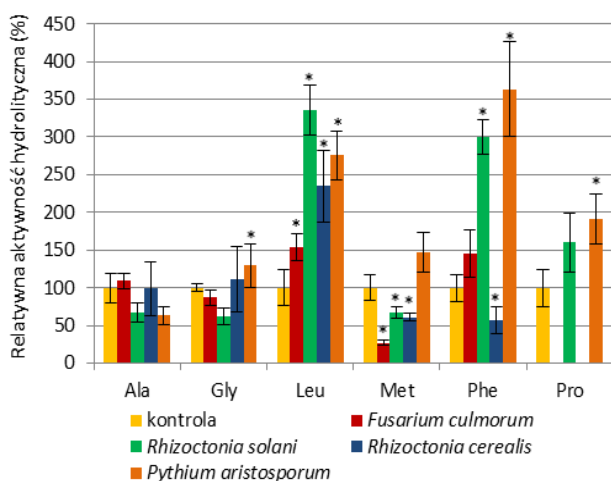


Rys.77. Zmiany w aktywności aminopeptydaz w ekstraktach białkowych z 47-dniowych siewek rzepaku narażonych na działanie różnych gatunków grzybów chorobotwórczych

Pomiary prowadzono w 50 mM buforze PBS o pH 7,0; stężenie substratu w próbie: 1 mM; 100% przypisano aktywności wobec danego substratu uzyskanej dla próby kontrolnej; słupki błędów reprezentują odchylenia standardowe średniej z trzech powtórzeń; gwiazdki nad słupkami oznaczają, że dana wartość różni się statystycznie od kontroli (poziom istotności ( $p < 0,05$ ) obliczony z wykorzystaniem testu t-Studenta ( $n=3$ )).

Dla całych siewek obserwuje się znaczące zmiany w aktywności badanych enzymów jedynie w kilku przypadkach. Dla siewek 33-dniowych obserwuje się około 60% wzrost aktywności aminopeptydaz w stosunku do substratów z *N*-końcówką metioniną, fenyloalaniną i proliną, dla roślin uprawianych na podłożu skażonym grzybami *Rhizoctonia solani*. W przypadku siewek 47-dniowych istotny statystycznie wzrost aktywności odnotowano jedynie w stosunku do substratu z *N*-końcówką fenyloalaniną, dla roślin rosnących w podłożu zawierającym grzyby z gatunków *Fusarium culmorum*, *Rhizoctonia solani* i *Rhizoctonia cerealis*.

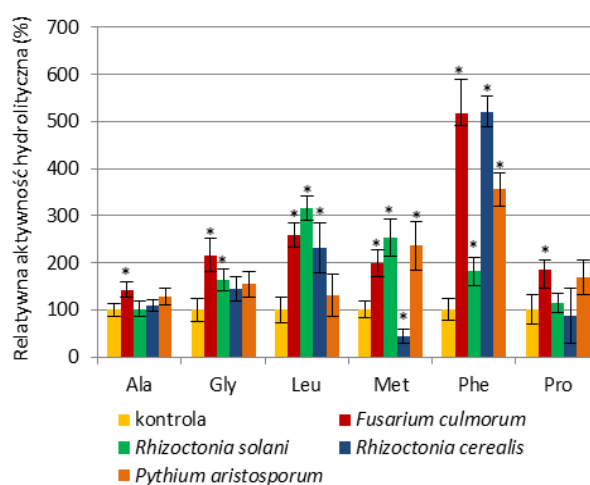
Z uwagi na fakt, że zgorzel siewek atakuje przede wszystkim system korzeniowy siewek, szczególnie istotna wydaje się analiza aktywności aminopeptydaz z ekstraktów z korzeni rzepaku (rysunki 78 i 79).



Rys.78. Zmiany w aktywności aminopeptydaz

w ekstraktach białkowych z korzeni 33-dniowych siewek rzepaku narażonych na działanie różnych gatunków grzybów chorobotwórczych

Pomiary prowadzono w 50 mM buforze PBS o pH 7,0; stężenie substratu w próbce: 1 mM; 100% przypisano aktywności wobec danego substratu uzyskanej dla próby kontrolnej; słupki błędów reprezentują odchylenia standardowe średniej z trzech powtórzeń; gwiazdki nad słupkami oznaczają, że dana wartość różni się statystycznie od kontroli (poziom istotności ( $p < 0,05$ ) obliczony z wykorzystaniem testu t-Studenta ( $n=3$ )).



Rys.79. Zmiany w aktywności aminopeptydaz

w ekstraktach białkowych z korzeni 47-dniowych siewek rzepaku narażonych na działanie różnych gatunków grzybów chorobotwórczych

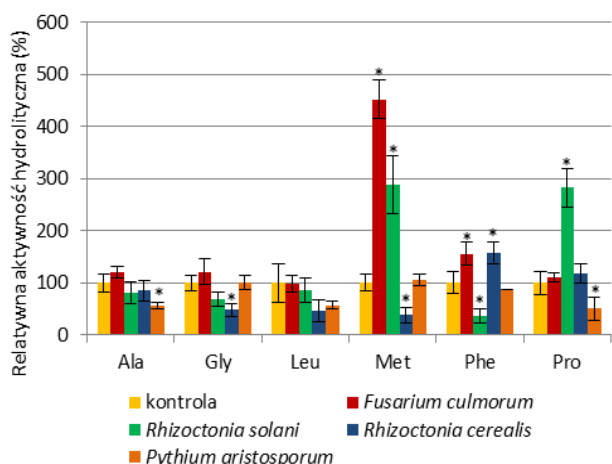
Pomiary prowadzono w 50 mM buforze PBS o pH 7,0; stężenie substratu w próbce: 1 mM; 100% przypisano aktywności wobec danego substratu uzyskanej dla próby kontrolnej; słupki błędów reprezentują odchylenia standardowe średniej z trzech powtórzeń; gwiazdki nad słupkami oznaczają, że dana wartość różni się statystycznie od kontroli (poziom istotności ( $p < 0,05$ ) obliczony z wykorzystaniem testu t-Studenta ( $n=3$ )).

W przypadku korzeni szczególny wzrost aktywności obserwuje się dla aminokwasów z *N*-końcówką leucyną i fenyloalaniną zarówno w siewkach 33- jak i 47-dniowych. Na szczególną uwagę zasługuje wysoki (ponad 5-krotny) wzrost aktywności w stosunku do fenyloalaniny, obserwowany w 47-dniowych siewkach narażonych na działanie *Fusarium culmorum* i *Rhizoctonia cerealis*. W przypadku roślin rosnących na podłożu skażonym *Pythium aristosporum* zmiany w aktywności badanych enzymów były zbliżone niezależnie od wieku siewek. Przykładowo,



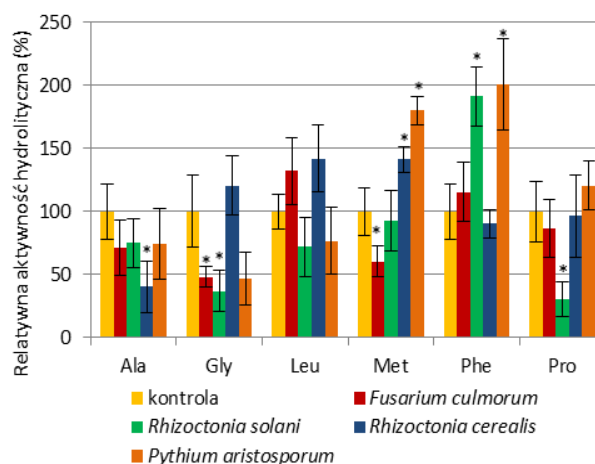
obserwowano około 3,5-krotny wzrost aktywności w stosunku do Phe-*pNA* i ponad 1,5-krotny w stosunku do Pro-*pNA*, niezależnie od wieku roślin.

Na rysunkach 80 i 81 Przedstawiono zmiany w aktywności aminopeptydaz w ekstraktach z liści siewek rzepaku ozimego.



Rys.80. Zmiany w aktywności aminopeptydaz w ekstraktach białkowych z liści 33-dniowych siewek rzepaku narażonych na działanie różnych gatunków grzybów chorobotwórczych

Pomiary prowadzono w 50 mM buforze PBS o pH 7,0; stężenie substratu w próbce: 1 mM; 100% przypisano aktywności wobec danego substratu uzyskanej dla próby kontrolnej; słupki błędów reprezentują odchylenia standardowe średniej z trzech powtórzeń; gwiazdki nad słupkami oznaczają, że dana wartość różni się statystycznie od kontroli (poziom istotności ( $p < 0,05$ ) obliczony z wykorzystaniem testu t-Studenta ( $n=3$ )).



Rys.81. Zmiany w aktywności aminopeptydaz w ekstraktach białkowych z liści 47-dniowych siewek rzepaku narażonych na działanie różnych gatunków grzybów chorobotwórczych

Pomiary prowadzono w 50 mM buforze PBS o pH 7,0; stężenie substratu w próbce: 1 mM; 100% przypisano aktywności wobec danego substratu uzyskanej dla próby kontrolnej; słupki błędów reprezentują odchylenia standardowe średniej z trzech powtórzeń; gwiazdki nad słupkami oznaczają, że dana wartość różni się statystycznie od kontroli (poziom istotności ( $p < 0,05$ ) obliczony z wykorzystaniem testu t-Studenta ( $n=3$ )).

Rozpatrując aktywność aminopeptydaz w ekstraktach z liści siewek rzepaku w 33 dniu uprawy nie obserwuje się znaczących zmian, za wyjątkiem aktywności wobec Met-*pNA* i Pro-*pNA* (dla roślin rosnących na podłożu zakażonym *Fusarium culmorum* i *Rhizoctonia solani*). W starszych siewkach zmiany w ekspresji/aktywności aminopeptydaz w większości przypadków nie były istotne statystycznie. Jedynie w stosunku do Phe-*pNA* obserwuje się niemal 2-krotny wzrost aktywności w przypadku rzepaku narażonego na działanie *Rhizoctonia solani* i *Pythium aristosporum*.

W roślinach zainfekowanych grzybami dochodzi do ekspresji genów kodujących wiele enzymów (np. chitynazy, peroksydazy i innych)<sup>253</sup>. Występować może również zwiększenie ekspresji/aktywności proteaz w tym aminopeptydaz<sup>254</sup>. Infekcja grzybami chorobotwórczymi powodowała wzrost aktywności aminopeptydaz wobec wybranych substratów (Leu-*pNA*, Met-*pNA*, Phe-*pNA* i Pro-*pNA*) szczególnie w korzeniach. Podobne wyniki zostały opisane dla nikli indyjskiej. W przypadku tej rośliny infekcja grzybami z gatunku *Fusarium oxysporum* i *Aspegillus niger*

wpływała na zwiększenie aktywności aminopeptydazy API specyficznej wobec substratu z *N*-końcową leucyną. Ponadto aktywność w zainfekowanych roślinach rosła wraz ze wzrostem siewek (zmiany aktywności obserwowano we wczesnym stadium rozwoju od 0-72 h wzrostu), podczas gdy w kontroli utrzymywała się na zbliżonym poziomie<sup>130</sup>.

Obecność patogenów wpływała niekorzystnie na pobieranie, przez system korzeniowy, wody i składników odżywczych (między innymi, poprzez zmniejszenie ilości i wielkości korzeni)<sup>125</sup>. Można by się zatem spodziewać wzrostu aktywności aminopeptydaz w stosunku do substratów z *N*-końcową proliną czy glicyną (osmoprotektantów), jednak, nie zaobserwowano takiego efektu. Odnotowano natomiast wzrost aktywności aminopeptydaz w stosunku do substratów z *N*-końcową leucyną, fenyloalaniną i metioniną. Może być to związane ze sposobem przenikania grzyba do tkanek rośliny podczas infekcji. Odbywa się to na różne sposoby, na przykład przez istniejące rany lub sekrecję mieszaniny enzymów hydrolitycznych przez grzyb. Innym, bardziej wyrafinowanym, sposobem jest penetracja kutykuli rośliny przez specjalne organy grzyba nazywane apressoriami (przyciskami)<sup>125</sup>. W każdym z tych przypadków dochodzi do przerwania ciągłości tkanek rośliny, czyli do zranienia. Zranienie, natomiast jest jednym z czynników stresowych powodujących akumulację aminopeptydaz<sup>117,255</sup>. Przykładem może być intensyfikacja ekspresji genów kodujących aminopeptydazę leucynową w liściach pomidora w odpowiedzi na infekcję *Pseudomonas syringae* (infekcja tą bakterią również zaczyna się od przerwania ciągłości ścian i błon komórek roślinnych)<sup>122</sup>. Enzym ten preferuje substraty z *N*-końcową leucyną, metioniną i argininą<sup>256</sup>. Brak jest doniesień na temat aminopeptydaz fenyloanalynowych, których ekspresja/aktywność zmieniała by się pod wpływem infekcji patogenem. Fakt, że do zakażenia dochodzi głównie przez korzenie roślin, tłumaczy wyższą aktywność aminopeptydaz w częściach podziemnych siewek niż w częściach zielonych. Można postulować, że obserwowany wzrost aktywności aminopeptydaz w siewkach rzepaku ozimego wynika z uruchomienia mechanizmów obronnych indukowanych przez infekcję grzybami chorobotwórczymi i angażujących aminopeptydazy.

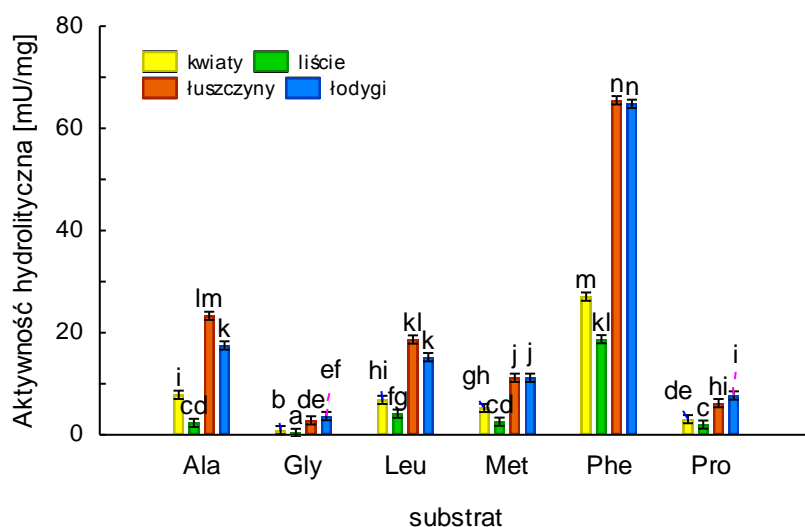
### **5.7. Wpływ fungicydów na aktywność aminopeptydaz z rzepaku na etapie formowania się łuszczyn**

Przeprowadzono badania nad wpływem fungicydów stosowanych w uprawie rzepaku na aktywność aminopeptydaz w poszczególnych częściach roślinnych (kwiaty, liście, łodygi i łuszczyny) zebranych w fazie formowania się łuszczyn (BBCH 69-73). Badania prowadzono we współpracy z dr hab. Mariolą Głazek prof. nadzw. IOR i dr Agnieszką Mączyńską z Instytutu Ochrony Roślin – Państwowy Instytut Badawczy, Oddział Sośnicowice, które nadzorowały uprawę rzepaku, aplikację fungicydu, zbiór roślin oraz określenie wydajności plonowania.

Podczas uprawy rzepaku stosuje się szereg zabiegów agrochemicznych w celu uzyskania wysokich plonów. Do jednych z największych zagrożeń podczas uprawy rzepaku należą grzyby chorobotwórcze (np. *Pythium debaryanum*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Pyrenopeziza*

*brassicae*). W celu uniknięcia infekcjom grzybiczym stosuje się różne fungicydy o odmiennym mechanizmie działania. Przykładem mogą być fungicydy z grupy triazoli inhibujące biosyntezę ergosterolu, a strobiluryny hamujące oddychanie komórkowe.

W badaniach na wpływem wybranych fungicydów na aktywność aminopeptydaz w ekstraktach białkowych z rzepaku stosowano środki używane komercyjnie w ochronie rzepaku przed grzybami z gatunku *Sclerotinia sclerotiorum*. Kontrolę stanowiły rośliny, których nie poddano działaniu badanych fungicydów. Wszystkie rośliny zebrano w fazie wzrostu BBCH 69-73. Aktywność aminopeptydaz w ekstraktach białkowych z kwiatów, liści, łodyg i łuszczyń roślin stanowiących kontrolę przedstawiono na rysunku 59.



Rys.69. Aktywność aminopeptydaz w ekstraktach białkowych z kwiatów, liści, łodyg i łuszczyń rzepaku (rośliny kontroli) na etapie wzrostu BBCH 69-73

Stężenie substratów 1 mM. Słupki błędów reprezentują 95% przedział ufności ze średniej ( $n=3$ ). Różne litery nad słupkami oznaczają różnice istotne statystycznie pomiędzy średnimi na podstawie testu Tukey'a HSD ( $\alpha=0,05$ )

Zgodnie z doniesieniami literaturowymi i wcześniej przedstawionymi badaniami, aktywność aminopeptydaz zmienia się zarówno w zależności od rozpatrywanej części roślinnej jak i etapu wzrostu rośliny<sup>68,86,161</sup>. W rzepaku na etapie formowania się łuszczyń najwyższą aktywność, ze względu na rozpatrywaną część rośliny, obserwowano w ekstraktach z łodyg i łuszczyń. Aktywność w tych częściach roślinnych była około 4-krotnie wyższa niż w liściach i około 2,5-krotnie wyższa niż w kwiatach. Może to wynikać z intensywności procesów fizjologicznych zachodzących w danej części rośliny. Na przykład w łuszczyinach dynamicznie dojrzewają nasiona. Szczególnie na początku tego procesu zachodzi intensyfikacja procesów biochemicznych prowadząca do akumulacji związków organicznych i nieorganicznych w rozwijających się nasionach. W niedojrzałych nasionach występują duże ilości fitohormonów (akusyny, cytokiny i gibereliny) stymulujących podziały komórkowe<sup>4</sup>. Najniższą aktywność odnotowano w ekstraktach białkowych z liści. Niezależnie od badanej części roślinnej, aktywność aminopeptydaz wobec poszczególnych

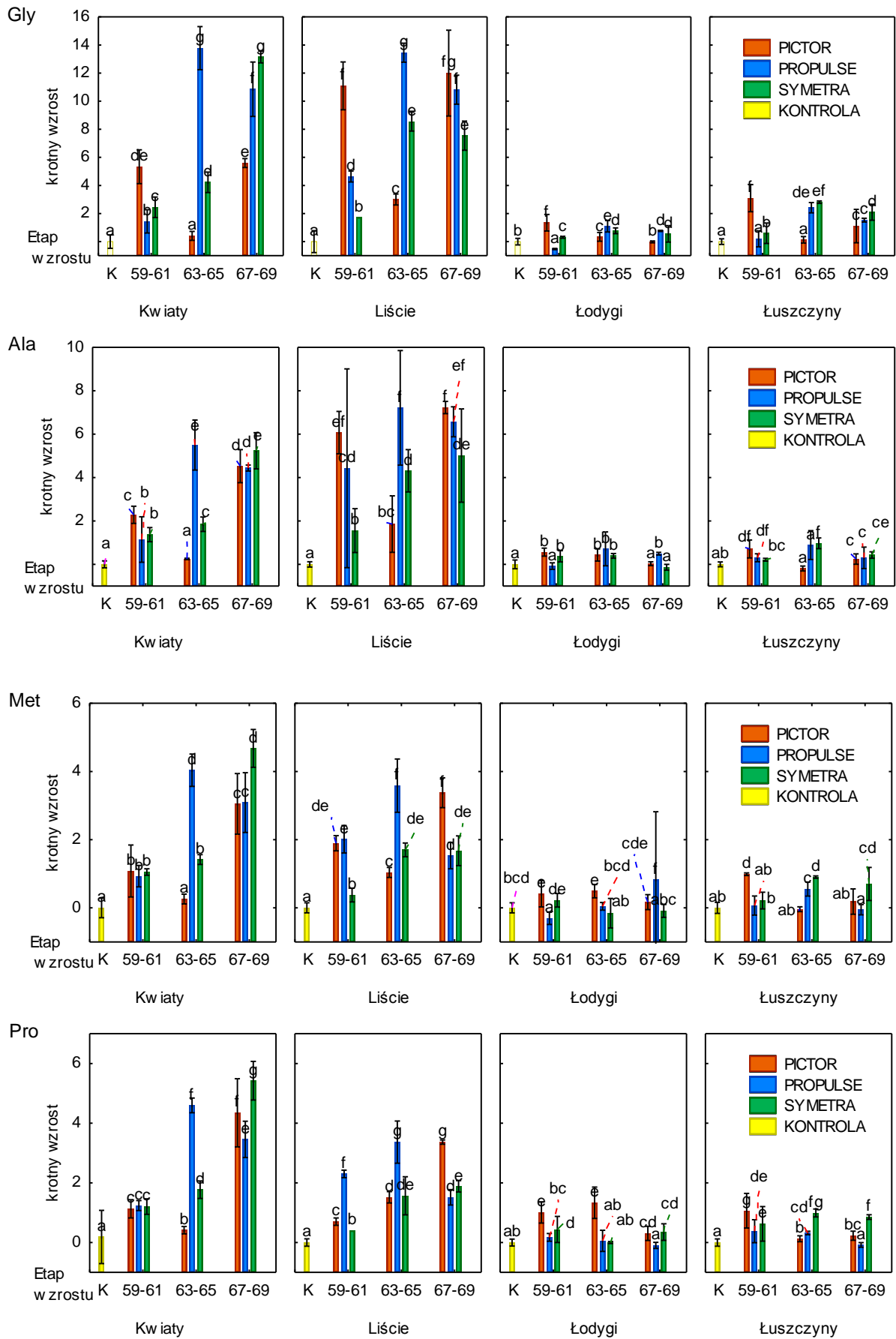
substratów układała się w następujący szereg: Phe>Ala>Leu>Met>Pro>Gly. Podobnie przedstawiała się aktywność dla aminopeptydaz z ekstraktów z siewek rzepaku oraz oczyszczonej aminopeptydazy z nasion rzepaku (za wyjątkiem substratu z *N*-końcową leucyną, dla którego aktywność była wyższa niż w stosunku do substratu *N*-końcową alaniną)<sup>81</sup>. Na podstawie otrzymanych danych można wysnuć wniosek, że na etapie końca kwitnienia i na początku formowania się łuszczyń (BBCH 69-73) następuje intensyfikacja ekspresji aminopeptydaz o specyficzności wobec *N*-końcowych aminokwasów z dużą hydrofobową grupą boczną.

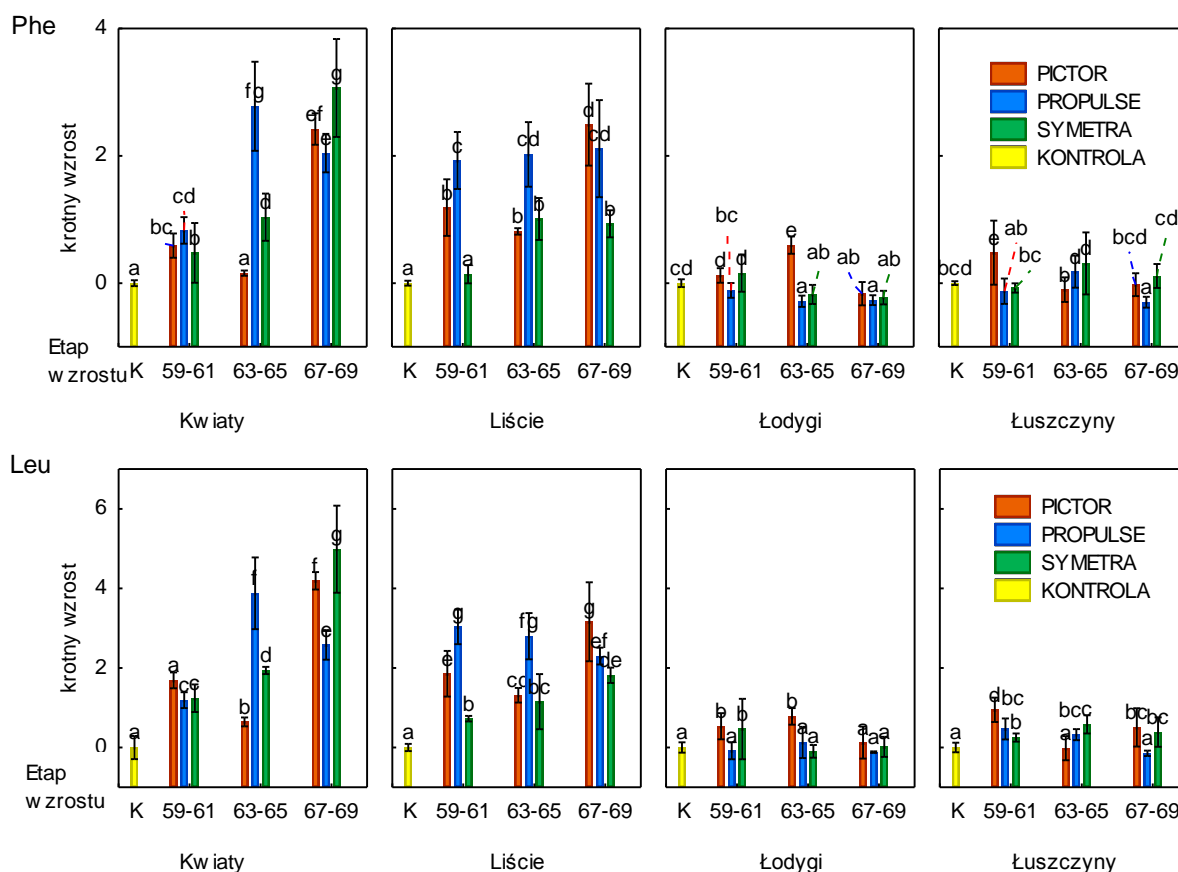
W celu zbadania wpływu fungicydów na aktywność aminopeptydaz w rzepaku dokonano oprysku roślin następującymi preparatami: Pictor 400 SC, Symetra 325 SC i Propulse 250 SE. Fungicydy Pictor 400 SC i Symetra 325 SC zawierały środki grzybobójcze z tych samych grup: SDHI – inhibitory dehydrogenazy bursztynianowej i strobilurynę. Natomiast substancje czynne w Propulse 250 SE stanowiły SDHI i inhibitor syntezy steroli. Dawki i substancje czynne użytych środków ochrony roślin przedstawiono w tabeli 27.

Tab.27. Zestawienie stosowanych w eksperymencie fungicydów wraz ze stosowanymi dawkami oraz charakterystyką substancji czynnych

| Fungicyd               | Substancje aktywne | Działanie                                   | Dawki substancji aktywnych (g/ha) |
|------------------------|--------------------|---|-----------------------------------|
| <b>Pictor 400 SC</b>   | dimoksytrobina     | strobiluryna (inhibitor procesu oddychania) | 100                               |
|                        | boskalid           | SDHI  | 100                               |
| <b>Symetra 325 SC</b>  | izopyrazam         | SDHI  | 125                               |
|                        | azoksytrobina      | strobiluryna (inhibitor procesu oddychania) | 200                               |
| <b>Propulse 250 SE</b> | protriokonazol     | inhibitor syntezy steroli                   | 125                               |
|                        | fluopyram          | SDHI  | 125                               |

Fungicydy stosowano jednorazowo, w jednej z trzech różnych faz wzrostu: na początku kwitnienia BBCH 59-61, w pełni rozkwitu BBCH 63-65 i na końcu kwitnienia BBCH 67-69. W fazie wzrostu BBCH 69-73 wszystkie rośliny zebrano i dla otrzymanych ekstraktów białkowych z kwiatów, liści, łodyg i łuszczyń oznaczono aktywność aminopeptydaz. Zebrane wyniki przedstawiono jako krotność wzrostu w porównaniu do kontroli na rysunku 70.





Rys.70. Zmiany aktywności aminopeptydaz w kwiatach, liściach, łodygach i łuszczyznach rzepaku ozimego odmiany Hybrirock poddanego działaniu fungicydów Pictor 400 SC, Propulse 250 SE i Symetra 325 SC na różnych etapach wzrostu BBCH: 59–61, 63–65 i 67–69. Aktywność hydrolityczną badano wobec substratów:

Gly-*p*NA, Ala-*p*NA, Met-*p*NA, Pro-*p*NA, Leu-*p*NA i Phe-*p*NA.

Stężenie substratów: 1 mM. Słupki błędów reprezentują 95% przedział ufności ze średniej ( $n=3$ ). Różne litery nad słupkami oznaczają różnice istotne statystycznie pomiędzy średnimi na podstawie testu Tukey'a HSD ( $\alpha=0,05$ )

Wyniki przedstawione na rysunku 70 wskazują, że wszystkie rozpatrywane czynniki (część rośliny, stosowany substrat, fungicyd oraz faza wzrostu, w której zastosowano fungicyd) mają wpływ na aktywność aminopeptydaz.

Biorąc pod uwagę części roślin, największe zmiany w aktywności aminopeptydaz pod wpływem działania fungicydów zaobserwowano w liściach i kwiatach (średnio 4-4,7-krotny wzrost aktywności). Natomiast w łuszczyznach obserwowano średnio 1,6-krotny wzrost, a w łodygach 1,3-krotny.

Rozpatrując budowę stosowanych substratów, zaobserwowano, że największy wzrost aktywności nastąpił dla substratów z małymi grupami bocznymi (Gly 5,8-krotny wzrost; Ala 3,1-krotny wzrost). Dla pozostałych substratów średni wzrost aktywności hydrolitycznej przedstawiał się następująco: Leu 2,3-, Met 2,2-, Pro 2,4- i Phe 1,7-krotny wzrost.

Jednym z czynników o najmniejszym wpływie na zmiany w aktywności aminopeptydaz, a tym samym na ekspresję badanych enzymów był rodzaj stosowanego fungicydu. Biorąc pod uwagę wyniki uzyskane dla poszczególnych substratów, w każdej części roślinnej i w każdym z terminów aplikacji, największy średni wzrost aktywności odnotowano wobec Propulse 250 SE (3,3-krotny wzrost). Wpływ pozostałych fungicydów był bardzo zbliżony (Pictor 400 SC 2,8-krotny wzrost aktywności i Symetra 325 SC 2,7- krotny wzrost).

Analizując wpływ czasu aplikacji fungicydów zaobserwowano, że największy wzrost aktywności aminopeptydaz występuje w przypadku aplikacji preparatów na etapie 67-69 skali BBCH (3,6-krotny wzrost aktywności hydrolitycznej), 2,9- i 2,3-krotny wzrost aktywności obserwowano odpowiednio dla aplikacji na etapie BBCH 63-65 i BBCH 59-61.

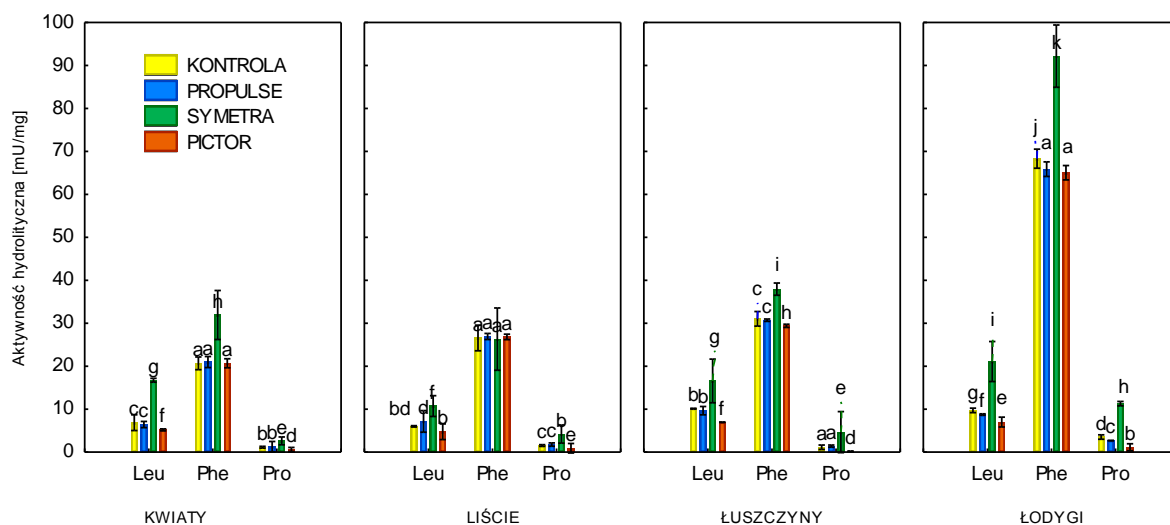
Należy podkreślić, że dla poszczególnych fungicydów optimum aktywności przypadało na różny czas aplikacji. W przypadku Pictor 400 SC i Symetra 325 SC, był to etap BBCH 67-69 (koniec kwitnienia rzepaku), kiedy to aktywność wzrosła 3,6-krotnie. Natomiast dla Propulse 250 SE największy, 4,3-krotny wzrost przypadał na pełnię kwitnienia (BBCH 63-65). Producenci fungicydów udostępniają informacje o najbardziej korzystnym terminie aplikacji swojego produktu. Przykładowo, fungicyd Propulse 250 SE i Pictor 400 SC powinien być aplikowany podczas pełnego rozkwitu kwiatów rzepaku. Analizując otrzymane wyniki można zauważyć, że najbardziej efektywna pod względem wpływu na ekspresję aminopeptydaz była aplikacja fungicydów właśnie w tej fazie oraz pod koniec kwitnienia, czyli w terminach sugerowanych przez producentów preparatów.

Propulse 250 SE oprócz ochrony przed grzybami chorobotwórczymi wpływa również na zwiększenie zawartości chlorofilu w liściach i łuszczykach<sup>257</sup>. Powoduje on ograniczenie wydzielania etylenu i opóźnia starzenie się roślin. Fungicyd ten wpływa na większą odporność rzepaku na stres i minimalizuje straty w plonach<sup>257</sup>.

Podsumowując otrzymane wyniki, wpływ stosowanych fungicydów na profil aktywności aminopeptydaz w rzepaku, był szczególnie znaczący w kwiatach i liściach. Szczególnie widoczny był ten efekt w stosunku do aminokwasów o małym łańcuchu bocznym (Gly, Ala i Pro), niezależnie od stosowanego fungicydu. Można więc stwierdzić, że stosowane substancje nie tylko działały na swoje cele molekularne, ale wpływały znacząco na ekspresję genów kodujących aminopeptydazy (a tym samym na aktywność aminopeptydaz), co jest ściśle związane z aktywacją mechanizmów obronnych w rzepaku oraz procesami wydłużenia czasu wegetacji i opóźnienia wędnięcia poprzez usuwanie nieprawidłowych białek i recykling aminokwasów<sup>7,94</sup>. Podobnie jak przedstawiono w poprzednich rozdziałach glicyna, alanina i prolina pełnią istotne role w tolerancji roślin na działanie czynników szkodliwych (niska temperatura czy stres osmotyczny)<sup>107,231</sup>.

W celu wykluczenia działania fungicydów na aktywność samych aminopeptydaz (a nie na ekspresję genów kodujących aminopeptydazy w roślinach), przeprowadzono badania określające możliwy wpływ aktywujący lub hamujący stosowanych preparatów na te enzymy. Ekstrakty białkowe z poszczególnych części roślin stanowiących kontrolę inkubowano z roztworami

każdego z fungicydów, a następnie określono aktywność aminopeptydaz w stosunku do trzech substratów. Wyniki przedstawiono na rysunku 71.



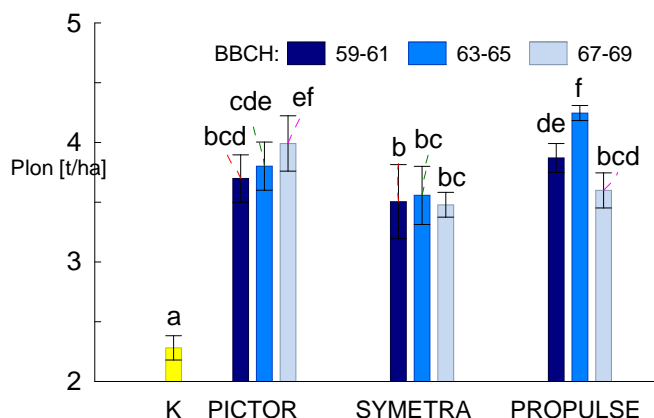
Rys.71. Wpływ fungicydów Pictor 400 SC, Propulse 250 SE i Symetra 325 SC na aktywność aminopeptydaz w ekstraktach białkowych z kwiatów, liści, łodyg i łuszczyń roślin kontrolnych rzepaku ozimego odmiany Hybrirock na etapie BBCH 69-73, wobec Leu-, Phe- i Pro-pNA

*Ekstrakty białkowe inkubowano przez 1 h z roztworami fungicydu. Słupki błędów reprezentują 95% przedział ufności ze średniej (n=3). Różne litery nad słupkami oznaczają różnice istotne statystycznie pomiędzy średnimi na podstawie testu Tukey'a HSD*

Badania wykazały, że wśród stosowanych fungicydów tylko Symetra 325 SC wykazywała nieznaczne działanie aktywujące. Pictor 400S SC wykazywał umiarkowane działanie inhibujące (średnio 30%), szczególnie wobec substratów z *N*-końcową leucyną i proliną. Natomiast w przypadku Propulse 250 SE nie odnotowano znaczących różnic w aktywności aminopeptydaz. Badania potwierdziły, że stosowane preparaty wpływały głównie na ekspresję genów kodujących aminopeptydazy w rzepaku ozimym. Natomiast miały nieznaczny wpływ na aktywność samych enzymów.

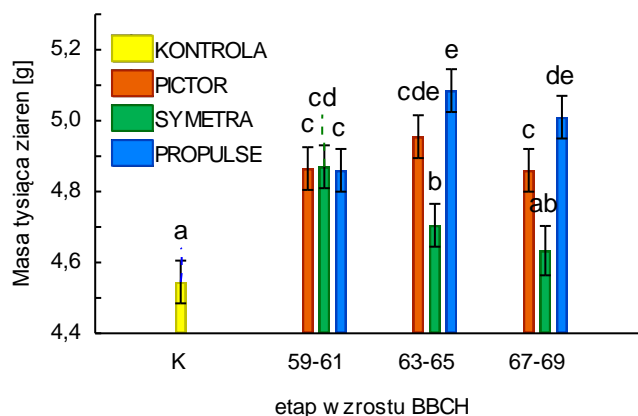
W celu określenia zależności pomiędzy stosowaniem fungicydów, a wysokością zbiorów rzepaku z jednego hektara, dokonano porównania plonowania rzepaku poddanego działaniu poszczególnych preparatów oraz roślin kontroli (rysunek 72). Ponadto dokonano pomiaru podstawowych cech zebranych nasion (masa tysiąca ziaren, zawartość oleju) (rysunek 73).





Rys.72. Wydajność plonu rzepaku ozimego odmiany Hybrirock ozimego poddanego działaniu fungicydów Pictor 400 SC, Propulse 250 SE i Symetra 325 SC na różnych etapach wzrostu BBCH: 59–61, 63–65 i 67–69. Słupki błędów reprezentują 95% przedział ufności ze średniej ( $n=3$ ). Różne litery nad słupkami oznaczają różnice istotne statystycznie pomiędzy średnimi na podstawie testu Tukey'a HSD

Zastosowanie fungicydów wpłynęło znacząco na zwiększenie plonu rzepaku. Największy plon uzyskano gdy rzepak był poddany działaniu Propulse 250 SE, na etapie wzrostu BBCH 63-65 (4,2 t/ha), w porównaniu do plonu roślin kontroli (2,3 t/ha). W przypadku stosowania fungicydu Symetra 325 SC, niezależnie do terminu aplikacji uzyskany plon był o około 1,2 t/ha większy niż w kontroli. Natomiast im późniejszy termin aplikacji fungicydu Pictor 400 SC, tym wyższy plon otrzymano.



Rys.73. Masa tysiąca ziaren rzepaku ozimego poddanego działaniu fungicydów Pictor 400 SC, Propulse 250 SE i Symetra 325 SC na różnych etapach wzrostu BBCH: 59–61, 63–65 i 67–69. Słupki błędów reprezentują 95% przedział ufności ze średniej ( $n=3$ ). Różne litery nad słupkami oznaczają różnice istotne statystycznie pomiędzy średnimi na podstawie testu Tukey'a HSD

Stosowanie fungicydów nie miało wpływu na zawartość oleju w roślinach. Zarówno dla roślin kontrolnych jak i poddanych działaniu preparatów, parametr ten był na poziomie 48,5% suchej masy.

Fungicydy wpłynęły za to na jeden z głównych parametrów określających jakość nasion – masę tysiąca ziaren. Największy wzrost tego parametru obserwowano u roślin poddanych działaniu Propulse 250 SE i Pictor 400 SC na etapie wzrostu BBCH 63-65 i 67-69 (ponad 5 g). W literaturze znany jest podobny efekt fungicydu zawierającego strobilurynę na pszenicę. Rośliny poddane działaniu fungicydu charakteryzowały się lepszym wykorzystaniem wody i przedłużoną żywotnością zielonych liści, a ziarna wykazywały wyższą masę tysiąca ziaren<sup>258,259</sup>.

Przeprowadzone badania udowodniły, że korzystny wpływ fungicydów na uprawę rzepaku, wynika nie tylko z przedstawianych dotąd w literaturze mechanizmów, ale jest również efektem intensyfikacji ekspresji genów kodujących aminopeptydazy, a tym samym wzrostu ich aktywności. To z kolei przekłada się na akumulację związków powodujących m.in. wzrost odporności rośliny oraz przedłużenie okresu wegetacji.

## PODSUMOWANIE I WNIOSKI

Celem niniejszej pracy była charakterystyka aminopeptydaz rzepaku na różnych etapach wzrostu, a także określenie wpływu czynników stresowych (abiotycznych i biotycznych) na aktywność tych enzymów w rzepaku ozimym. Poznanie roli aminopeptydaz w różnych procesach fizjologicznych zachodzących w rzepaku jest niezwykle ważne, ze względu na wysokość upraw tej rośliny w Polsce i w Europie oraz szerokie zastosowanie oleju rzepakowego. Wiedza ta może pozwolić na opracowanie optymalnych warunków dla wydajnej i opłacalnej produkcji oleju, w różnych warunkach środowiska i klimatu. Dodatkowym uzasadnieniem prowadzonych badań jest fakt, że czynniki wpływające na aktywność tych enzymów w roślinach, mogą również oddziaływać na podobne aminopeptydazy szeroko występujące w innych organizmach zwłaszcza u ludzi i innych ssaków.

Jednym z celów prowadzonych badań była charakterystyka aminopeptydazy w suchych nasionach rzepaku. W wyniku przeprowadzonego procesu kilkietapowej izolacji, otrzymano częściowo oczyszczone białko o masie molekularnej około 60 kDa. Białko charakteryzowało się szeroką specyficznością substratową (badania prowadzono stosując jako substraty: Ala-*p*NA, Gly-*p*NA, Leu-*p*NA, Met-*p*NA, Phe-*p*NA i Pro-*p*NA). Preferencyjnie katalizowana była hydroliza substratu z *N*-końcową fenyloalaniną (dla Phe-*p*NA  $K_m=247,8\pm 42 \mu\text{M}$ ,  $V_{\max}=401,8\pm 45 \mu\text{M/s}$ ). Optimum pH wynosiło 6,5, a optimum temperaturowe 40°C dla tego substratu. Badania z użyciem selektywnych inhibitorów proteaz wykazały, że enzym posiada cechy metaloproteazy z resztami serynowymi w centrum aktywnym. Szeroka specyficzność substratowa, obecność kilku prążków w żelu po ogniskowaniu izoelektrycznym (w zakresie 6,7-5,3) oraz analiza dostępnych danych literaturowych wskazywały na obecność w preparacie białkowym więcej niż jednej aminopeptydazy, bądź więcej niż jednej izoformy enzymu. W oparciu o wyniki uzyskane w tej części badań oraz dane literaturowe wskazujące na obecność kilku aminopeptydaz w podobnych roślinach, w dalszej części dyskutowano już grupę aminopeptydaz, a nie jeden enzym.

Analiza aktywności aminopeptydaz w ekstraktach z siewek rzepaku na różnych etapach kiełkowania, wykazała, że wraz ze wzrostem rośliny dochodzi do istotnych zmian w profilu działania tych enzymów. Niezależnie od etapu wzrostu rośliny, największą aktywność obserwowano zawsze dla substratu z *N*-końcową fenyloalaniną. Porównanie wydajności hydrolizy prowadzonej przez aminopeptydazy w ekstraktach białkowych z rzepaku podczas pierwszych godzin kiełkowania wykazało, że maksymalny wzrost aktywności tych enzymów następuje w 120 godzinie wzrostu. W zależności od użytego substratu, aminopeptydazy z 120 h siewek rzepaku charakteryzowały się różnym optimum pH (Ala-*p*NA – 8,0, Leu-*p*NA – 7,0, Phe-*p*NA – 6,5) oraz temperatury (Ala-*p*NA – 50°C, Leu-*p*NA – 37°C, Phe-*p*NA – 40°C, Pro-*p*NA - 45°C). Otrzymane w wyniku filtracji żelowej

piki aktywności aminopeptydaz (68,5, 59,5 i 45 kDa) oraz dwa prążki obecne w żelu po elektroforezie SDS-PAGE (60 i 50 kDa) potwierdzały obecność 2-3 aminopeptydaz różniących się od siebie masą molekularną i prawdopodobnie specyficznością substratową.

Dużą część pracy stanowiły badania wpływu różnych czynników stresowych na aminopeptydazy z siewek rzepaku. Czynniki te stosowano podczas uprawy siewek, więc uzyskane wyniki odzwierciedlają odpowiedź roślin na dany stresor, przejawiającą się zmianą w ekspresji genów kodujących aminopeptydazy. Obserwowany wzrost lub spadek aktywności aminopeptydaz jest zatem konsekwencją zmian w stężeniu enzymów w roślinie, nie zaś wynikiem inhibicji/aktywacji samych aminopeptydaz. Większość badanych czynników wpływało znacząco na aktywność/ekspresję aminopeptydaz rzepaku ozimego. Podsumowanie otrzymanych wyników przedstawiono w tabeli nr 28.

Tab.28. Obserwowane zmiany w aktywności aminopeptydaz rzepaku ozimego wywołane stosowanymi czynnikami

|  |                                 | Wpływ czynnika na aktywność aminopeptydaz wobec wybranego substratu |     |     |     |     |     |
|--|---------------------------------|---|-----|-----|-----|-----|-----|
| Rodzaj czynnika  | Czynnik                         | Ala   | Gly | Leu | Met | Phe | Pro |
| Czynniki abiotyczne  | Niska temperatura               | –   | –   | –   | –   | –   | –   |
|  | Ograniczenie dostępu do światła | ↑   | ↑   | ↑   | ↑   | ↑   | ↑   |
|  | Azot                            | –   | ↑   | –   | –   | –   | –   |
|  | Fosfor                          | ↓   | ↓   | ↓   | ↓   | ↓   | ↓   |
|  | Potas                           | ↑   | ↑↑↑ | ↑   | ↑   | ↑   | ↑   |
|  | Siarka                          | ↓   | ↓   | ↓   | ↓   | ↓   | ↓   |
|  | Magnez                          | ↑   | ↑↑↑ | ↑   | ↑   | ↑   | ↑   |
|  | Wapń                            | ↑   | ↑   | ↑   | ↑   | ↑   | ↑   |
|  | Żelazo                          | ↑/↓   | ↓   | –   | –   | –   | ↓   |
|  | Bor                             | –   | –   | –   | –   | –   | –   |
|  | Mangan                          | ↑↑↑   | ↑↑↑ | ↑   | ↑   | ↑   | ↑↑↑ |
|  | Cynk                            | ↑↑↑   | ↑↑↑ | ↑↑↑ | ↑↑↑ | ↑↑↑ | ↑↑↑ |
|  | Miedź                           | ↑   | ↑/↓ | ↑   | ↑   | ↑/↓ | ↑/↓ |
|  | Molibden                        | –   | ↓   | –   | –   | –   | –   |
|  | Nikiel                          | –   | ↓   | ↑   | –   | –   | –   |
|  | Kadm                            | ↑   | ↑↑↑ | –   | –   | –   | ↑↑↑ |
|  | Ołów                            | –   | ↑↑↑ | –   | –   | –   | ↑↑↑ |
|  | Rtęć                            | ↓   | ↓   | ↓   | ↓   | ↓   | –   |
| Czynniki biotyczne   | Kwas abscysynowy                | –   | –   | –   | ↑   | –   | ↑   |
|  | Jasmonian metylu                | ↓   | –   | ↓   | ↑/↓ | ↓   | ↑/↓ |
| Czynniki abiotyczne pochodzenia antropogenicznego (zanieczyszczenia) | Benzen                          | ↓   | ↓   | ↓   | ↓   | –   | ↑   |
|  | Naftalen                        | –   | ↑   | ↑   | ↑   | ↑   | ↑↑↑ |
|  | Antracen                        | –   | –   | –   | ↓   | ↑   | ↑↑↑ |
|  | Fenantren                       | –   | –   | –   | ↑↑↑ | ↑   | ↑   |
|  | Benzyna <del>PB-95</del>        | –   | ↑   | –   | ↓   | ↑   | ↑↑↑ |
|  | Olej napędowy                   | ↑   | –   | ↑/↓ | ↑   | ↑   | ↑↑↑ |

↑ - wzrost aktywności; ↓ - spadek aktywności; – - brak znaczących zmian w aktywności (do ± 20%); ↑↑↑ - ponad 3-krotny wzrost aktywności ; ↑/↓ - spadek lub wzrost aktywności w zależności od stosowanego stężenia czynnika

Pod wpływem stosowanych czynników częściej obserwowano wzrost aktywności badanych enzymów, niż spadek. Szczególne zwiększenie aktywności miało miejsce wobec substratów z *N*-końcową proliną oraz glicyną, w wyniku stosowania czynników takich jak: potas, magnez, mangan, cynk, kadm, ołów, naftalen, antracen, benzyna i olej napędowy. Substancje te powodowały zasolenie podłoża, na którym uprawiano rzepak albo upośledzały pobieranie wody przez system

korzeniowy. Można przypuszczać, że odpowiedź aminopeptydaz w tych przypadkach jest związana z osmoprotekcyjną funkcją jaką pełnią prolina i glicyna w roślinach. W odpowiedzi na suszę fizjologiczną w roślinach dochodzi do zwiększonej akumulacji tych aminokwasów. Część wymaganej do ochrony rośliny przed suszą fizjologiczną prolina i glicyna, dostarczana jest w wyniku hydrolizy peptydów katalizowanej przez aminopeptydazy.

W tabeli 28 nie ujęto czynników biotycznych w postaci zakażenia grzybami chorobotwórczymi (*Pythium Aristosporum*, *Rhizoctonia cerealis*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium culmorum*). Mimo, że zakażenie rzepaku wybranymi patogenami w sposób znaczący wpływało na ograniczenie wzrostu siewek oraz ich kondycję, to nie zaobserwowano jednoznacznego ich wpływu na aktywność aminopeptydaz. Zmiany w ekspresji/aktywności badanych enzymów były zależne zarówno od stopnia rozwoju jak i od rozpatrywanej części rośliny oraz stosowanego gatunku grzyba. Szczególnie wysoki wzrost aktywności obserwowano wobec substratów z *N*-końcową leucyną, fenyloalaniną i metioniną. Wzrost aktywności wobec tych substratów może być spowodowany zranieniem do jakiego dochodzi podczas infekcji. Ponieważ grzyby chorobotwórcze atakują w pierwszej kolejności system korzeniowy rośliny (z naruszeniem ciągłości ścian i błon komórkowych) to właśnie w tej części rośliny odnotowano najwyższą aktywność badanych enzymów.

W uprawie rzepaku często stosuje się pestycydy, w tym fungicydy. Producenci poszczególnych preparatów rekomendują nie tylko odpowiednie dawki ale też terminy ich aplikacji, uwzględniając przede wszystkim etap rozwoju danej rośliny. Stosowanie pestycydów zalicza się do czynników stresowych abiotycznych pochodzenia antropogenicznego. W eksperymentach polowych badano wpływ trzech najczęściej stosowanych fungicydów (Pictor 400 SC, Propulse 250 SE, Symetra 325 SC) na aktywność aminopeptydaz w rzepaku, na etapie formowania się łuszczyń. Stwierdzono, że wpływ ten był przede wszystkim zależny od terminu aplikacji fungicydu, jak i od rozpatrywanej części roślinnej czy stosowanego substratu. Zdecydowanie mniejsze znaczenie miał rodzaj stosowanego fungicydu. Największy wzrost aktywności obserwowano w kwiatach i liściach, wobec substratów zawierających aminokwasy o małej grupie bocznej (Gly-, Ala- i Pro-*p*NA). Tego typu aminokwasy odgrywają ważną rolę w procesach związanych z ochroną rośliny przed starzeniem się, mechanizmach obronnych oraz zwiększających odporność rośliny na czynniki stresowe. Można zatem wysnuć wniosek, że stosowanie badanych fungicydów wzmacnia wymienione mechanizmy, przez aktywację ekspresji genów kodujących aminopeptydazy, które następnie katalizują hydrolizę tych niezbędnych *N*-końcowych aminokwasów. Warto nadmienić, że na tym etapie wzrostu dochodzi do więdnienia kwiatów i powolnego starzenia się części zielonych rzepaku. Zatem wysoka aktywność aminopeptydaz w tych organach wynikała również z intensyfikacji naturalnych mechanizmów roślinnych, wykorzystujących aktywność aminopeptydaz w usuwaniu niepoprawnie sfałdowanych i uszkodzonych białek, mających na celu przeciwdziałanie starzeniu się i przedłużeniu okresu wegetacji.

W niniejszej pracy dokonano wnikliwej charakterystyki aminopeptydaz występujących w rzepaku ozimym na różnych etapach wzrostu. Dowiedziono, że profil aktywności tych enzymów zmienia się w zależności od stadium rozwoju rośliny i może się różnić w poszczególnych organach roślinnych. Co najistotniejsze, potwierdzono kluczową rolę aminopeptydaz w wielu procesach fizjologicznych, a szczególnie w odpowiedzi na szereg czynników stresowych środowiska. Udowodniono istotną rolę tych enzymów w procesach związanych z ochroną rośliny przed czynnikami stresowymi, w szczególności takimi, które powodują suszę fizjologiczną. Ponadto potwierdzono udział aminopeptydaz rzepaku w przeciwdziałaniu procesom wędnięcia i starzenia oraz w ochronie przed atakiem patogenów. Przeprowadzone badania pozwalają na nowo spojrzeć na metodykę uprawy rzepaku ozimego oraz stosowanych zabiegów ochronnych. Nie można wykluczyć, że wzrost aktywności aminopeptydaz rzepaku obserwowany w następstwie występowania niektórych zanieczyszczeń czy stosowania pestycydów, może występować również dla aminopeptydaz w innych organizmach żywych (także u ludzi). Obserwacje te powinny być szczególnie brane pod uwagę przy wprowadzaniu na rynek nowych środków ochrony roślin.

## DOROBEK NAUKOWY

### Publikacje:

1. Joanna Kania, Agnieszka Mączyńska, Mariola Głazek, Tomasz Krawczyk, Danuta M. Gillner; *The influence of chosen fungicides on the activity of aminopeptidases in winter oilseed rape during pods development*; Pesticide Biochemistry and Physiology **2018**, 148, str. 166-174, **5-Year IF 3,319, 30 pkt MSWiN**
2. Joanna Kania, Danuta Gillner; *Characterisation of the aminopeptidase from non-germinated winter rape (*Brassica napus L.*) seeds*; Food Chemistry **2016**, 207, str. 180-186, **5-Year IF 4,879, 40 pkt MSWiN**
3. Joanna Kania, Danuta Gillner; *Zmiany w aktywności i ekspresji roślinnych aminopeptydaz pod wpływem wybranych czynników*; rozdział w *Badania i Rozwój Młodych Naukowców w Polsce, Nauki przyrodnicze Część V*, **2016**, str. 61-65 Wydawca: Młodzi Naukowcy
4. Joanna Kania, Danuta Gillner; *Aminopeptydazy pozyskane z roślin o dużym znaczeniu ekonomicznym – rola i charakterystyka*; CHEMIK **2015**, 69, 8, str. 463-468, **8 pkt MSWiN**
5. Joanna Tolarczyk, Danuta Gillner, Jan Zawadiak; *Aminopeptydazy Leucynowe z wybranych organizmów-znaczenie i zastosowania terapeutyczne*, rozdział w: *Postępy Inżynierii Biomedycznej*. Red. Lucyna Leniowska, Zbigniew Nawrat, **2013**, str. 169-181, ISBN 978-83-63151-02-7 Wydawca: Uniwersytet Rzeszowski

### Projekty:

1. „Hydroliza skrobi pochodzącej z mąk – optymalizacja procesu produkcyjnego”, projekt realizowany we współpracy z firmą NUTRICIA Zakłady Produkcyjne Sp. z o.o

### Stypendia i nagrody:

1. 2016 (październik) **I nagroda** w konkursie Nowoczesne Technologie Konstrukcje Materiały dla Chemii i Energetyki za: FungiDetektorA - detektor zakażenia fungicydami roślin uprawnych oparty o aktywność aminopeptydaz



2. 2016 (październik) – 2017 (czerwiec) - Stypendium Rektora Politechniki Śląskiej dla najlepszych doktorantów
3. 2015 (marzec) Grant konferencyjny przyznany przez „Verband der chemischen Industrie” na częściową refundację kosztów konferencji naukowej 17. JCF-Frühjahrssymposium 2015
4. 2014 (wrzesień) Grant konferencyjny na częściową refundację kosztów uczestnictwa w 7th Central European Conference „Chemistry Towards Biology”
5. 2010 (marzec) - 2011 (wrzesień) Stypendium Rektora Politechniki Śląskiej dla najlepszych studentów

Udział w konferencjach:

1. VI Ogólnopolska Konferencja Pomędzy Naukami, *Wpływ węglowodorów aromatycznych i zanieczyszczeń ropopochodnych na aktywność aminopeptydaz w rzepaku na wczesnych etapach wzrostu* (poster); 15.09.2017; Chorzów
2. II Międzynarodowa Konferencja Nowoczesne Technologie, Konstrukcje, Materiały dla Chemii i Energetyki, *FungiDetektorA - detektor zakażenia fungicydami roślin uprawnych, oparty o aktywność aminopeptydaz* (prezentacja ustna); 27-28.10.2016; Opole
3. III Ogólnokrajowa Konferencja Naukowa: Badania i Rozwój Młodych Naukowców w Polsce 2016, *Wpływ wybranych czynników na aktywność aminopeptydaz z rzepaku* (poster); 13.04.2016; Wrocław
4. 4th International Conference and Workshop “Plant – the source of research material”, *Oilseed Rape Aminopeptidases –Changes In Activity At Different Growth Stages And In Different Parts Of Plant, Interactions With Chosen Pesticides* (prezentacja ustna); 20-23.09.2015; Lublin
5. 17. JCF-Frühjahrssymposium 2015, *Rape aminopeptidases at different growth stages – characterization, interactions with metal ions and herbicides* (poster); 25-28.03.2015; Münster (Niemcy)
6. YoungChem 2014, *Rapeseed Aminopeptidases- Substrate Specificity And Effect Of Standard Protease Inhibitors* (prezentacja ustna); 08-12.10.2014; Szczecin

7. 7th Central European Conference „Chemistry Towards Biology”, *Rapeseed Aminopeptidases- Isolation And Partial Characterization* (poster); 08-12.09.2014; Chorzów
8. YoungChem 2013, *Rapeseed And Weeds Aminopeptidases – Comparison And Searching For The Potential Inhibitors* (poster); 27.09.2013; Chorzów
9. Pomędzy Naukami – Zjazd Fizyków I Chemików, *Aminopeptydazy Z Roślin O Dużym Znaczeniu Ekonomicznym* (poster); 27.09.2013; Chorzów
10. EthOx 5 – Polyethylene Oxidation Process, *Production Of Biodegradable Polymers From Polyolefin Waste* (prezentacja ustna); 04-07.09.2013; Losheim Am See (Niemcy)
11. "BioMedTech Silesia 2013", *Aminopeptydzy Leucynowe Z Wybranych Organizmów-Znaczenie I Zastosowania Terapeutyczne* (prezentacja ustna); 08.03.2013; Zabrze

## LITERATURA

1. Food and Agriculture Organization of the United Nations <http://www.fao.org/home/en> (accessed Feb 21, 2019).
2. Integrowana produkcja rzepaku ozimego i jarego; Mrówczyński, M., Pruszyński, S., Eds.; Instytut Ochrony Roślin, Poznań, **2008**.
3. T. Rudko, Polska Akademia Nauk, Instytut Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego, et al. Uprawa rzepaku ozimego, rzepak - zasady uprawy - zdrowa żywność: poradnik dla producentów; Wydawnictwo Instytutu Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego PAN, Lublin, **2011**.
4. J. Kopcewicz, S. Lewak. Fizjologia roślin; Wydawnictwo Naukowe PWN, **2005**.
5. C. Giglione, A. Boularot, T. Meinel. Protein N-terminal methionine excision. *Cellular and Molecular Life Sciences* **2004**, 61 (12).
6. A.L. Tan-Wilson, K.A. Wilson. Mobilization of seed protein reserves. *Physiologia Plantarum* **2012**, 145 (1), 140–153.
7. R. Waditee-Sirisattha, J. Shibato, R. Rakwal, et al. The Arabidopsis aminopeptidase LAP2 regulates plant growth, leaf longevity and stress response. *New Phytologist* **2011**, 191 (4), 958–969.
8. Y.-Q. Gu, F.M. Holzer, L.L. Walling. Overexpression, purification and biochemical characterization of the wound-induced leucine aminopeptidase of tomato. *European Journal of Biochemistry* **1999**, 263 (3), 726–735.
9. P.R. Lomate, V.K. Hivrale. Induction of leucine aminopeptidase (LAP) like activity with wounding and methyl jasmonate in pigeonpea (*Cajanas cajan*) suggests the role of these enzymes in plant defense in leguminosae. *Plant Physiology and Biochemistry* **2011**, 49 (6), 609–616.
10. B. Tesa, J.M. Mayer. Classification, Localization, and Some Physiological Roles of Hydrolytic Enzymes. In *Hydrolysis in Drug and Prodrug Metabolism*; Wiley-Blackwell, **2006**; pp 11–46.
11. S. Nomura, T. Ito, E. Yamamoto, et al. Gene regulation and physiological function of placental leucine aminopeptidase/oxytocinase during pregnancy. *Biochim. Biophys. Acta* **2005**, 1751 (1), 19–25.
12. T. Mitsui, S. Nomura, A. Itakura, S. Mizutani. Role of aminopeptidases in the blood pressure regulation. *Biol. Pharm. Bull.* **2004**, 27 (6), 768–771.
13. H. Matsumoto, T. Nagasaka, A. Hattori, et al. Expression of placental leucine aminopeptidase/oxytocinase in neuronal cells and its action on neuronal peptides. *Eur. J. Biochem.* **2001**, 268 (11), 3259–3266.
14. T. Aoyagi. Physiological roles of ectoenzymes indicated by the use of aminopeptidase inhibitors. In *Aminopeptidases*; Molecular Biology Intelligence Unit; Springer, Berlin, Heidelberg, Boston, Massachusetts, U.S.A., **1996**; pp 155–172.
15. G.J. Spector. The role of aminopeptidases in inflammatory and neoplastic tissues. *Laryngoscope* **1976**, 86 (8), 1218–1240.
16. R. Chaerkady, K.K. Sharma. Characterization of a bradykinin-hydrolyzing protease from the bovine lens. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2004**, 45 (4), 1214–1223.
17. J. Behari, L. Stagon, S.B. Calderwood. PepA, a gene mediating pH regulation of virulence genes in *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* **2001**, 183 (1), 178–188.
18. D. Charlier, A. Kholti, N. Huysveld, et al. Mutational analysis of *Escherichia coli* PepA, a multifunctional DNA-binding aminopeptidase. *Journal of Molecular Biology* **2000**, 302 (2), 409–424.
19. T. Gonzales, J. Robert-Baudouy. Bacterial aminopeptidases: Properties and functions. *FEMS Microbiology Reviews* **1996**, 18 (4), 319–344.
20. C.M. Stack, J. Lowther, E. Cunningham, et al. Characterization of the *Plasmodium falciparum* M17 leucyl aminopeptidase. A protease involved in amino acid regulation with potential for antimalarial drug development. *J. Biol. Chem.* **2007**, 282 (3), 2069–2080.

21. N. Changklungmoa, K. Chaithirayanon, P. Kueakhai, et al. Molecular cloning and characterization of leucine aminopeptidase from *Fasciola gigantica*. *Exp. Parasitol.* **2012**, 131 (3), 283–291.
22. S.-M. Song, J.-H. Park, J. Kim, et al. Identification and characterization of *Paragonimus westermani* leucine aminopeptidase. *Parasitol. Int.* **2008**, 57 (3), 334–341.
23. M. Wu, M. Yan, J. Xu, et al. Expression, tissue localization and serodiagnostic potential of *Echinococcus granulosus* leucine aminopeptidase. *Int J Mol Sci* **2018**, 19 (4), 1–13.
24. G. Pulido-Cejudo, B. Conway, P. Proulx, R. Brown, C.A. Izaguirre. Bestatin-mediated inhibition of leucine aminopeptidase may hinder HIV infection. *Antiviral Research* **1997**, 36 (3), 167–177.
25. S. Maric, S.M. Donnelly, M.W. Robinson, et al. The M17 leucine aminopeptidase of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*: Importance of active site metal ions in the binding of substrates and inhibitors. *Biochemistry* **2009**, 48 (23), 5435–5439.
26. S. McGowan, C.J. Porter, J. Lowther, et al. Structural basis for the inhibition of the essential *Plasmodium falciparum* M1 neutral aminopeptidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2009**, 106 (8), 2537–2542.
27. A. Addlagatta, B.W. Matthews. Structure of the angiogenesis inhibitor ovalicin bound to its noncognate target, human Type 1 methionine aminopeptidase. *Protein Sci.* **2006**, 15 (8), 1842–1848.
28. M.S. Ghadge, A.V. Sirsat, M.S. Bhansali, L.J. Desouza, P. Jagannath. Leucine amino peptidase a better indicator of carcinoma of liver, biliary tract and pancreas. *Indian J Clin Biochem* **2001**, 16 (1), 60–64.
29. N.D. Rawlings, A.J. Barrett. Evolutionary families of peptidases. *Biochem J* **1993**, 290 (Pt 1), 205–218.
30. L. Polgár. The catalytic triad of serine peptidases. *Cell. Mol. Life Sci.* **2005**, 62 (19–20), 2161–2172.
31. B. Testa, J.M. Mayer. Catalytic Mechanisms of Hydrolytic Enzymes. In *Hydrolysis in Drug and Prodrug Metabolism*; John Wiley & Sons, Ltd, **2006**; pp 47–79.
32. P. Młudzik, M. Mirowski. Charakterystyka i znaczenie proteinaz cysteinowych w procesie nowotworzenia. *Folia Medica Lodziensia* **2015**, 42 (2), 93–106.
33. H.-H. Otto, T. Schirmeister. Cysteine Proteases and Their Inhibitors. *Chem. Rev.* **1997**, 97 (1), 133–172.
34. R.A.L. van der Hoorn. Plant proteases: from phenotypes to molecular mechanisms. *Annual Review of Plant Biology* **2008**, 59 (1), 191–223.
35. L.L. Walling, Y.-Q. Gu. Plant Aminopeptidases: Occurrence, Function and Characterization. In *Aminopeptidases*; Taylor, A., Ed.; Molecular Biology Intelligence Unit; Springer, Berlin, Heidelberg, Boston, **1996**; pp 173–218.
36. B. Oszywa, M. Makowski, M. Pawełczak. Purification and partial characterization of aminopeptidase from barley (*Hordeum vulgare* L.) seeds. *Plant Physiology and Biochemistry* **2013**, 65, 75–80.
37. A.A.A. Premarathne, D.W.M. Leung. Characterization of activity of a potential food-grade leucine aminopeptidase from kiwifruit. *Enzyme Research* **2010**, 1–5.
38. S.P. Waters, M.J. Dalling. Isolation and Some Properties of an Aminopeptidase from the Primary Leaf of Wheat (*Triticum aestivum* L.). **1984**, No. 75, 118–124.
39. L.M. Casano, M. Desimone, V.S. Trippi. Proteolytic activity at alkaline pH in oat leaves, isolation of an aminopeptidase. *Plant Physiology* **1989**, 91 (4), 1414–1418.
40. Y. Moriyasu, Y. Miyoshi. Partial purification and characterization of aminopeptidase II from *Chara australis*. *Plant physiology* **1989**, 89 (2), 687–691.
41. L. Hedstrom. Serine protease mechanism and specificity. *Chem. Rev.* **2002**, 102 (12), 4501–4524.
42. A. Tsuji, Y. Fujisawa, T. Mino, K. Yuasa. Identification of a plant aminopeptidase with preference for aromatic amino acid residues as a novel member of the prolyl oligopeptidase family of serine proteases. *Journal of Biochemistry* **2011**, 150 (5), 525–534.
43. C.M. Antão, F.X. Malcata. Plant serine proteases: biochemical, physiological and molecular features. *Plant Physiology and Biochemistry* **2005**, 43 (7), 637–650.

44. U. Szawłowska, A. Grabowska, E. Zdunek-Zastocka, W. Bielawski. TsPAP1 encodes a novel plant prolyl aminopeptidase whose expression is induced in response to suboptimal growth conditions. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2012**, 419 (1), 104–109.
45. U. Szawłowska, E. Zdunek-Zastocka, W. Bielawski. Biochemical characterisation of prolyl aminopeptidase from shoots of triticale seedlings and its activity changes in response to suboptimal growth conditions. *Plant Physiology and Biochemistry* **2011**, 49 (11), 1342–1349.
46. A. Brik, C.-H. Wong. HIV-1 protease: mechanism and drug discovery. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2003**, 1 (1), 5–14.
47. M. Darabi, S. Seddigh. Bioinformatic characterization of aspartic protease (AP) enzyme in seed plants. *Plant Syst Evol* **2015**, 301 (10), 2399–2417.
48. A. Tokarzewicz, E. Gorodkiewicz. Proteazy: znaczenie, rola i oznaczanie. *Chemik* **2015**, 69 (2), 81–88.
49. M.G. Guevara, C.R. Oliva, M. Huarte, G.R. Daleo. An aspartic protease with antimicrobial activity is induced after infection and sounding in intercellular fluids of potato tubers. *European Journal of Plant Pathology* **2002**, 108 (2), 131–137.
50. A. Schaller. A cut above the rest: the regulatory function of plant proteases. *Planta* **2004**, 220 (2), 183–197.
51. J. Polaina, A.P. MacCabe. *Industrial Enzymes: Structure, Function and Applications*; Springer Science & Business Media, **2007**.
52. E. Erez, D. Fass, E. Bibi. How intramembrane proteases bury hydrolytic reactions in the membrane. *Nature* **2009**, 459 (7245), 371–378.
53. A. Mucha, M. Drag, J.P. Dalton, P. Kafarski. Metallo-aminopeptidase inhibitors. *Biochimie* **2010**, 92 (11), 1509–1529.
54. L.L. Walling. Leucyl aminopeptidase (plant). In *Handbook of Proteolytic Enzymes (Second Edition)*; Barrett, A. J., Rawlings, N. D., Woessner, J. F., Eds.; Academic Press, London, **2004**; pp 901–905.
55. Y. Yamauchi, Y. Ejiri, K. Tanaka. Purification of an aminopeptidase preferentially releasing N-terminal alanine from cucumber leaves and its identification as a plant aminopeptidase N. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **2001**, 65 (12), 2802–2805.
56. C. Giglione, A. Serero, M. Pierre, B. Boisson, T. Meinnel. Identification of eukaryotic peptide deformylases reveals universality of N-terminal protein processing mechanisms. *EMBO J* **2000**, 19 (21), 5916–5929.
57. A.S. Murphy, K.R. Hoogner, W.A. Peer, L. Taiz. Identification, purification, and molecular cloning of N-1-naphthylphthalamic acid-binding plasma membrane-associated aminopeptidases from *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **2002**, 128 (3), 935–950.
58. E. Sanchez-Moran. A Puromycin-Sensitive Aminopeptidase Is Essential for Meiosis in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell* **2004**, 16 (11), 2895–2909.
59. L.L. Walling. Recycling or regulation? The role of amino-terminal modifying enzymes. *Current Opinion in Plant Biology* **2006**, 9 (3), 227–233.
60. P. Siekel, P. Nemeč, J. Stano. Identification and determination of the intra- and extracellular aminopeptidase activity by synthetic L-Ala-, L-Tyr-, and L-Phe- $\beta$ -naphthylamide. **2008**, No. 12, 909–912.
61. J. Stano, K. Neubert, K. Mičičeta, V. Blanáriková. Demonstration of aminopeptidase activities secreted by *Amsonia tabernaemontana* Walt. Cells. *Engineering in Life Sciences* 5 (4), 375–377.
62. M. Marinova, A. Dolashki, F. Altenberend, et al. Characterization of an aminopeptidase and a proline iminopeptidase from cabbage leaves. *Z. Naturforsch., C, J. Biosci.* **2008**, 63 (1–2), 105–112.
63. K. Arima, T. Uchikoba, M. Shimada, H. Yonezawa, M. Kaneda. Purification and some properties of an aminopeptidase from the seeds of *Cannabis sativa*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **2000**, 64 (5), 1055–1057.
64. C.J. Tu. Isolation and Characterization of the Neutral Leucine Aminopeptidase (LapN) of Tomato. *Plant Physiology* **2003**, 132 (1), 243–255.

65. M.A. Scranton, A. Yee, S.-Y. Park, L.L. Walling. Plant leucine aminopeptidases moonlight as molecular chaperones to alleviate stress-induced damage. *Journal of Biological Chemistry* **2012**, 287 (22), 18408–18417.
66. W.S. Chao, Y.-Q. Gu, V. Pautot, E.A. Bray, L.L. Walling. Leucine Aminopeptidase RNAs, Proteins, and Activities Increase in Response to Water Deficit, Salinity, and the Wound Signals Systemin, Methyl Jasmonate, and Abscisic Acid. *Plant Physiol* **1999**, 120 (4), 979–992.
67. P.R. Lomate, V.K. Hivrale. Induction of leucine aminopeptidase (LAP) like activity with wounding and methyl jasmonate in pigeonpea (*Cajanus cajan*) suggests the role of these enzymes in plant defense in leguminosae. *Plant Physiology and Biochemistry* **2011**, 49 (6), 609–616.
68. H.-J. Jeong, J.S. Shin, S.H. Ok. Barley DNA-binding methionine aminopeptidase, which changes the localization from the nucleus to the cytoplasm by low temperature, is involved in freezing tolerance. *Plant Science* **2011**, 180 (1), 53–60.
69. S. Ross. Functional and Developmental Impact of Cytosolic Protein N-Terminal Methionine Excision in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **2005**, 137 (2), 623–637.
70. X. Sun, F. Wang, H. Cai, et al. Functional characterization of an *Arabidopsis* prolyl aminopeptidase AtPAP1 in response to salt and drought stresses. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* **2013**, 114 (3), 325–338.
71. E. Zdunek-Zastocka, A. Grabowska, T. Branicki, B. Michniewska. Biochemical characterization of the triticale TsPAP1, a new type of plant prolyl aminopeptidase, and its impact on proline content and flowering time in transgenic *Arabidopsis* plants. *Plant Physiology and Biochemistry* **2017**, 116, 18–26.
72. S.P. Waters, E.R. Noble, M.J. Dalling. Intracellular Localization of Peptide Hydrolases in Wheat (*Triticum aestivum* L.) Leaves 1. *Plant Physiol* **1982**, 69 (3), 575–579.
73. K. Tishinov, N. Stambolieva, S. Petrova, B. Galunsky, P. Nedkov. Purification and characterization of the sunflower seed *Helianthus annuus* major aminopeptidase. *Acta Physiol Plant* **2009**, 31 (1), 199–205.
74. K. Herbers, S. Prat, L. Willmitzer. Functional analysis of a leucine aminopeptidase from *Solatum tuberosum* L. *Planta* **1994**, 194 (2), 230–240.
75. E. Pesquet. Plant proteases – from detection to function. *Physiologia Plantarum* **2012**, 145 (1), 1–4.
76. W.A. Peer, F.N. Hosein, A. Bandyopadhyay, et al. Mutation of the Membrane-Associated M1 Protease APM1 Results in Distinct Embryonic and Seedling Developmental Defects in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **2009**, 21 (6), 1693–1721.
77. M.G.P. Mahagamasekera, D.W.M. Leung. Development of leucine aminopeptidase activity during daylily flower growth and senescence. *Acta Physiol Plant* **2001**, 23 (2), 181–186.
78. E.P. Solomon, L.R. Berg, D.M. Martin, C.A. Ville. Biologia, wydanie drugie poprawione.; MULTICO Oficyna Wydawnicza, Warszawa, **2000**.
79. M.B. Singh, P.L. Bhalla, C.P. Malik. Physiology of sexual reproduction VII. Localization and activity of aminopeptidases during early embryogenesis in, *Tropaeolum majus* L. *Biochemie und Physiologie der Pflanzen* **1980**, 175 (5), 389–395.
80. A.D. Gajda, M. Pawelczak, M. Drag. Substrate specificity screening of oat (*Avena sativa*) seeds aminopeptidase demonstrate unusually broad tolerance in S1 pocket. *Plant Physiology and Biochemistry* **2012**, 54, 6–9.
81. J. Kania, D.M. Gillner. Characterisation of the aminopeptidase from non-germinated winter rape (*Brassica napus* L.) seeds. *Food Chem* **2016**, 207, 180–186.
82. J. Citharel, C. Garreau. Aminopeptidase from the cotyledons of *Vicia faba* l. var. minor seeds: partial purification and some properties. *New Phytologist* **1987**, 107 (3), 499–506.
83. Tan-Wilson Anna L., Wilson Karl A. Mobilization of seed protein reserves. *Physiologia Plantarum* **2012**, 145 (1), 140–153.
84. K. Müntz, M.A. Belozersky, Y.E. Dunaevsky, A. Schlereth, J. Tiedemann. Stored proteinases and the initiation of storage protein mobilization in seeds during germination and seedling growth. *J Exp Bot* **2001**, 52 (362), 1741–1752.

85. D.W.M. Leung, J.D. Bewley. Increased activity of aminopeptidase in the cotyledons of red light-promoted lettuce seeds is controlled by the axis. *Physiologia Plantarum* **1983**, 59 (1), 127–133.
86. M. Budič, B. Cigić, M. Šoštarič, et al. The response of aminopeptidases of *Phaseolus vulgaris* to drought depends on the developmental stage of the leaves. *Plant Physiology and Biochemistry* **2016**, 109, 326–336.
87. R. Jinka, P.R. Rao. Storage protein degradation in germinating horse gram seeds. *Indian Journal of Plant Physiology (India)* **2002**, 7 (4), 314–320.
88. Salmia M. Aulikki, Mikola Juhani J. Localization and Activity of Naphthylamidases in Germinating Seeds of Scots Pine, *Pinus sylvestris*. *Physiologia Plantarum* **2006**, 38 (2), 73–77.
89. E. Wilmowicz, K. Frankowski, P. Glazińska, et al. Rola giberelin w regulacji kwitnienia roślin. *Kosmos* **2011**, 60 (1–2), 129–140.
90. R. Mattioli, D. Marchese, S. D'Angeli, et al. Modulation of intracellular proline levels affects flowering time and inflorescence architecture in *Arabidopsis*. *Plant Mol. Biol.* **2008**, 66 (3), 277–288.
91. O.J. Ruiz-Rivero, S. Prat. A –308 deletion of the tomato LAP promoters is able to direct flower-specific and MeJA-induced expression in transgenic plants. *Plant Mol Biol* **1998**, 36 (5), 639–648.
92. H.R. Woo, H.J. Kim, H.G. Nam, P.O. Lim. Plant leaf senescence and death - regulation by multiple layers of control and implications for aging in general. *Journal of Cell Science* **2013**, 126 (21), 4823–4833.
93. A.B. Dal Peruffo, C. Pallavicini. Enzymatic changes associated with ripening of grape berries. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **1975**, 26 (5), 559–566.
94. R. Waditee-Sirisattha, A. Hattori, J. Shibato, et al. Role of the *Arabidopsis* leucine aminopeptidase 2. *Plant Signaling & Behavior* **2011**, 6 (10), 1581–1583.
95. C. Giglione, T. Meinel. Organellar peptide deformylases: universality of the N-terminal methionine cleavage mechanism. *Trends in Plant Science* **2001**, 6 (12), 566–572.
96. W. Wang, B. Vinocur, O. Shoseyov, A. Altman. Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends in Plant Science* **2004**, 9 (5), 244–252.
97. B.Y. Chen, W.K. Heneen, V. Simonsen. Comparative and genetic studies of isozymes in resynthesized and cultivated *Brassica napus* L., *B. campestris* L. and *B. alboglabra* Bailey. *Theoret. Appl. Genetics* **1989**, 77 (5), 673–679.
98. V. Čurn. Acid phosphatase and leucine aminopeptidase isozymes as biochemical markers of homogeneity in oil seed rape androgenetic lines. *Plant growth regulation* **1995**, 16 (1), 59–63.
99. M. Hartl, H. Merker, D.D. Schmidt, I.T. Baldwin. Optimized virus-induced gene silencing in *Solanum nigrum* reveals the defensive function of leucine aminopeptidase against herbivores and the shortcomings of empty vector controls. *New Phytologist* **2008**, 179 (2), 356–365.
100. W. Zhang, H. Zhang, L. Ning, B. Li, M. Bao. Quantitative proteomic analysis provides novel insights into cold stress responses in *Petunia* seedlings. *Front Plant Sci* **2016**, 7, 136.
101. L. Simova Stoilova, E. Kirova, G. Zehirov, I. Vaseva, U. Feller. Aminopeptidase activities in roots and leaves of drought stressed winter wheat seedlings. *Genetics and plant physiology* **2016**, 6 (3–4), 116–134.
102. D.W. Lv, G.R. Zhu, D. Zhu, et al. Proteomic and phosphoproteomic analysis reveals the response and defense mechanism in leaves of diploid wheat *T. monococcum* under salt stress and recovery. *Journal of Proteomics* **2016**, 143, 93–105.
103. A. Ociepa-Kubicka, E. Ociepa. Toksyczne oddziaływanie metali ciężkich na rośliny, zwierzęta i ludzi. *Inżynieria i ochrona środowiska* **2012**, 15 (2), 169–180.
104. I. McCarthy, M.C. Romero-Puertas, J.M. Palma, et al. Cadmium induces senescence symptoms in leaf peroxisomes of pea plants. *Plant, Cell and Environment* **2001**, 24 (10), 1065–1073.
105. L. Boulila-Zoghلامي, P. Gallusci, F.M. Holzer, et al. Up-regulation of leucine aminopeptidase-A in cadmium-treated tomato roots. *Planta* **2011**, 234 (4), 857–863.
106. J. Zuziak, M. Jakubowska. Glin w otoczeniu i jego wpływ na organizmy żywe. **2016**, No. 2, 110–120.

107. Y. Wang, H. Liu, S. Wang, H. Li, Q. Xin. Overexpressing of a novel wheat prolyl aminopeptidase gene enhances zinc stress tolerance in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* **2015**, 121 (2), 489–499.
108. E. Kucharczak-Moryl, A. Moryl, R. Żmuda. Influence of the environment on the content of arsenic in cultivated soils in Zgorzelec-Bogatynia region. *Inż. Ekolog.* **2014**, 2014 (37), 107–116.
109. P. Lis, I. Litwin, E. Maciaszczyk-Dziubinska. Mechanizmy transport nieorganicznych związków arsenu do komórek prokariotycznych i eukariotycznych. *Postępy Biochemii* **2010**, 56 (4), 400–408.
110. S. Mishra, R.S. Dubey. Inhibition of ribonuclease and protease activities in arsenic exposed rice seedlings: Role of proline as enzyme protectant. *Journal of Plant Physiology* **2006**, 163 (9), 927–936.
111. G.Y. Rinkis. Optimisation of Mineral Nutrition of Plants. *Riga, USSR* **1972**.
112. A. Osvalde. Optimization of plant mineral nutrition revisited: the roles of plant requirements , nutrient interactions, and soil properties in fertilization management. *Environmental and Experimental Biology* **2011**, No. 9, 1–8.
113. K.S. Dhillon, B.A. Yagodeen, A.C. Pleshkov. Micronutrients and nitrogen metabolism: I. Effects of different levels of micronutrients on nitrogen constituents in maize plants. *Plant and Soil* **1983**, 73 (3), 355–363.
114. A. Berchtold, J.-M. Besson, U. Feller. Effects of fertilization levels in two farming systems on senescence and nutrient contents in potato leaves. *Plant and Soil* **1993**, 154 (1), 81–88.
115. R. Vankova. Plant hormone functions in abiotic and biotic stress responses. In *Handbook of plant and crop stress*; CRC Press; Taylor & Francis Group, Boca Raton, **2011**; pp 191–212.
116. J. Narváez-Vásquez, G. Pearce, M.L. Orozco-Cardenas, V.R. Franceschi, C.A. Ryan. Autoradiographic and biochemical evidence for the systemic translocation of systemin in tomato plants. *Planta* **1995**, 195 (4), 593–600.
117. Y.Q. Gu, W.S. Chao, L.L. Walling. Localization and post-translational processing of the wound-induced leucine aminopeptidase proteins of tomato. *J. Biol. Chem.* **1996**, 271 (42), 25880–25887.
118. O.J. Ruiz-Rivero, S. Prat. A –308 deletion of the tomato LAP promoters is able to direct flower-specific and MeJA-induced expression in transgenic plants. *Plant Molecular Biology* **1998**, 36, 639–648.
119. J. Szczegieliński. Szlaki przekazywania sygnału w reakcji roślin na zranienie. *Post. Biochem* **2007**, 53, 121–132.
120. P. Sharma, R.S. Dubey. Protein synthesis by plants under stressful conditions. In *Handbook of plant and crop stress*; CRC Press; Taylor & Francis Group, Boca Raton, **2011**; pp 499–500.
121. S. Kryczyński, Z. Weber. Fitopatologia Tom 2 Choroby roślin uprawnych; Państwowe Wydawnictwo Rolnicze i Leśne, **2011**; Vol. 2.
122. V. Pautot, F.M. Holzer, B. Reisch, L.L. Walling. Leucine aminopeptidase: an inducible component of the defense response in *Lycopersicon esculentum* (tomato). *Proc Natl Acad Sci U S A* **1993**, 90 (21), 9906–9910.
123. V. Pautot, F.M. Holzer, J. Chauvaux, L.L. Walling. The induction of tomato leucine aminopeptidase genes (LapA) after *Pseudomonas syringae* pv. tomato infection is primarily a wound response triggered by coronatine. *Mol. Plant Microbe Interact.* **2001**, 14 (2), 214–224.
124. C. Bae, S. Kim, D.J. Lee, D. Choi. Multiple Classes of Immune-Related Proteases Associated with the Cell Death Response in Pepper Plants. *PLoS ONE* **2013**, 8 (5), e63533.
125. W. Knogge. Fungal infection of plants. *The Plant Cell* **1996**, 8 (10), 1711.
126. R. Asis, V. Muller, D.L. Barrionuevo, S.A. Araujo, M.A. Aldao. Analysis of protease activity in *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* on peanut seed infection and aflatoxin contamination. *European journal of plant pathology* **2009**, 124 (3), 391–403.
127. M.J. Cordero, D. Raventos, B. San Segundo. Induction of PR proteins in germinating maize seeds infected with the fungus *Fusarium moniliforme*. *Physiological and molecular plant pathology* **1992**, 41 (3), 189–200.



128. C. Caruso, G. Chilosi, C. Caporale, et al. Induction of pathogenesis-related proteins in germinating wheat seeds infected with *Fusarium culmorum*. *Plant Science* **1999**, 140 (1), 87–97.
129. A.P. Giri, A.M. Harsulkar, A.G. Patankar, et al. Association of induction of protease and chitinase in chickpea roots with resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. ciceri. *Plant Pathology* **1998**, 47 (6), 693–699.
130. P.R. Lomate, V.K. Hivrare. Changes and induction of aminopeptidase activities in response to pathogen infection during germination of pigeonpea (*Cajanus cajan*) seeds. *Journal of Plant Physiology* **2011**, 168 (15), 1735–1742.
131. L. Tamas, J. Huttova, I. Mistrik, G. Kogan. Effect of Carboxymethyl Chitin-Glucan on the Activity of Some Hydrolytic Enzymes in Maize Plants. *Chemical Papers- Slovak Academy Of Sciences* **2003**, 56, 326–329.
132. J. Rakowska, K. Radwan, Z. Ślosorz, et al. Usuwanie substancji ropopochodnych z dróg i gruntów; Rakowska, J., Ed.; Centrum Naukowo-Badawcze Ochrony Przeciwpożarowej - Państwowy Instytut Badawczy, Józefów, **2012**.
133. L.E. Sverdrup, P.H. Krogh, T. Nielsen, C. Kjær, J. Stenersen. Toxicity of eight polycyclic aromatic compounds to red clover (*Trifolium pratense*), ryegrass (*Lolium perenne*), and mustard (*Sinapsis alba*). *Chemosphere* **2003**, 53 (8), 993–1003.
134. M.R.T. Palmroth, U. Münster, J. Pichtel, J.A. Puhakka. Metabolic responses of microbiota to diesel fuel addition in vegetated soil. *Biodegradation* **2005**, 16 (1), 91–101.
135. Y. Zhang, J.L. Li, T.L. Miu, Z.W. Luo. Detection of Fenton's reagent with carbamide peroxide on *Heterobasidion insulare* negative influence and degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in contaminated soil relocation of petrochemical works. *Asian Journal of Chemistry* **2013**, 25 (12), 6521–6527.
136. M. Rusin, J. Gospodarek. Wpływ związków ropopochodnych na zawartość wybranych makroelementów w roślinach bobu (*Vicia faba* L.). *Proceedings of ECOpole* **2015**, 9 (2).
137. L. Gianfreda. Enzymes of importance to rhizosphere processes. *Journal of soil science and plant nutrition* **2015**, 15 (2), 283–306.
138. M. Pawełczak, B. Dawidowska-Marynowicz, B. Oszywa, et al. Influence of bioremediation stimulators in soil on development of oat seedlings (*Avena sativa*) and their aminopeptidase activity / Wpływ pozostałości substancji ropopochodnych w glebie na rozwój owsa i aktywność aminopeptydazową. *Archives of Environmental Protection* **2015**, 41 (1), 24–28.
139. R. Nowak, M. Włodarczyk-Makuła, E. Mamzer. Ryzyko środowiskowe i zdrowotne wynikające ze stosowania środków ochrony roślin. *Zeszyty Naukowe Wyższej Szkoły Zarządzania Ochroną Pracy w Katowicach* **2015**, 11 (1), 51–63.
140. R.M. Wilkins. Insecticide resistance and intracellular proteases. *Pest Management Science* **2017**, 73 (12), 2403–2412.
141. P.A. Karas, C. Baguelin, G. Pertile, et al. Assessment of the impact of three pesticides on microbial dynamics and functions in a lab-to-field experimental approach. *Science of The Total Environment* **2018**, 637–638, 636–646.
142. Z. Jasińska, A. Kotecki. Szczegółowa uprawa roślin; Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego, Wrocław, **2003**; Vol. 2.
143. GUS. Wyniki produkcji roślinnej w 2016 roku; Informacje i opracowania statystyczne; Departament Rolnictwa, Warszawa, **2017**.
144. D. Murawa, K. Warminski. Wpływ zróżnicowanej ochrony roślin na skład chemiczny nasion rzepaku jarego. *Acta Scientiarum Polonorum. Agricultura* **2005**, 4 (1), 77–87.
145. Food and Agriculture Organization of the United Nations <http://www.fao.org/home/en/> (accessed May 31, 2018).
146. RAPOOL POLSKA: Agrotechnika <http://www.rapool.pl/agrotechnika.html> (accessed May 23, 2018).
147. M. Mrówczyński, H. Wachowiak, G. Pruszyński, Plantpress. Atlas szkodników, owadów pożytecznych i zapyłających: szkodniki rzepaku; Plantpress, Kraków, **2014**.
148. A. Żelechowska, M. Bziuk, M. Wiergowski. Charakterystyka pestycydów. In *Pestycydy występowanie, oznaczanie i unieszkodliwianie*; Wydawnictwo Naukowo-Techniczne, Warszawa, **2001**; pp 15–41.

149. J. Wrzosek, B. Gworek, D. Maciaszek. Środki ochrony roślin w aspekcie ochrony środowiska. *Ochrona Środowiska i Zasobów Naturalnych* **2009**, No. 39.
150. R. Kierzak. Adiuwanty i ich wpływ na działanie środków ochrony roślin. *Rolnicze ABC* **2017**, 323 (8), 8–10.
151. Kody form użytkowych ŚOR <http://www.notatnikrolnika.pl/index.php/informacje/srodki-ochrony-roslin/kody-form-uzytkowych-sor.html> (accessed Jun 6, 2018).
152. E. Adamiak, I. Bartkowiak-Broda, J. Broniarz, et al. Integrowana ochrona i bezpieczeństwo zdrowotne rzepaku: monografia, VI.; Polskie Stowarzyszenie Producentów Oleju, Warszawa, **2013**.
153. M.M. Amer, M.A. Shehata, H.M. Lotfy, H.H. Monir. Determination of tetraconazole and diniconazole fungicide residues in tomatoes and green beans by capillary gas chromatography. *Yakugaku Zasshi* **2007**, 127 (6), 993–999.
154. IUPAC PPDB - Pesticides Properties DataBase <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/iupac/index.htm> (accessed May 31, 2018).
155. U. Wachowska, A. Duba, K. Goriewa. Charakterystyka grup fungicydów i induktorów odporności stosowanych w ograniczaniu występowania patogenów zbóż. *Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych* **2017**, No. 589, 109–121.
156. M. Kwiatkowska, P. Jarosiewicz, B. Bukowska. Glyphosate and its formulations - toxicity, occupational and environmental exposure. *Medycyna Pracy* **2013**, 65 (5), 717–729.
157. ZwalczamyChwasty.pl - Szkodliwość i możliwości zwalczania chwastów w roślinach uprawnych. <http://zwalczamychwasty.pl/> (accessed May 31, 2018).
158. W. Appel. Aminopeptidases and Amino Acid Arylamidases “Leucine aminopeptidase”, Oxytocinase, Angiotensinase General Information. In *Methods of Enzymatic Analysis (Second Edition)*; Bergmeyer, H. U., Ed.; Academic Press, Nowy Jork, **1974**; Vol. 2, pp 950–954.
159. M.M. Bradford. A 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.
160. M. Asano, N. Nakamura, M. Kawai, T. Miwa, N. Nio. Purification and characterization of an N-terminal acidic amino acid-specific aminopeptidase from Soybean Cotyledons (*Glycine max*). *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **2010**, 74 (1), 113–118.
161. I. Strelec, V. Ljubinka. Aminopeptidases of germinated and non-germinated barley grains. *Food Technol. Biotechnol.* **2009**, 47 (3), 296–303.
162. D.T.S. Rijkers, H.P.H.M. Adams, H.C. Hemker, G.I. Tesser. A convenient synthesis of amino acid p-nitroanilides; synthons in the synthesis of protease substrates. *Tetrahedron* **1995**, 51 (41), 11235–11250.
163. S.V. Pansare, R.L. Kirby. Secondary–secondary diamine catalysts for the enantioselective Michael addition of cyclic ketones to nitroalkenes. *Tetrahedron* **2009**, 65 (23), 4557–4561.
164. M. Marinova, N.T.K. Cuc, B. Tchorbanov. Enzymatic hydrolysis of soy protein isolate by food grade proteinases and aminopeptidases of plant origin. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* **2008**, 22 (3), 835–838.
165. K. Ninomiya, S. Tanaka, S. Kawata, S. Makisumi. Purification and properties of an aminopeptidase from seeds of japanese apricot. *J Biochem (Tokyo)* **1981**, 89 (1), 193–201.
166. A. Barth, G. Hermann. Aminopeptidasen in *Brassica napus*: I. Isolierung einer relativ alaninspezifischen Aminopeptidase. *Biochemie und Physiologie der Pflanzen* **1974**, 166 (1), 23–32.
167. G. Hermann, A. Barth. Aminopeptidasen in *Brassica napus* II. Untersuchungen zum Einfluß von Metallionen, über Aminosäure-Zusammensetzung und katalytische Eigenschaften der relativ alaninspezifischen Aminopeptidase. *Biochemie und Physiologie der Pflanzen* **1976**, 170 (2), 143–151.
168. M. Tyszka. Zalecenia odmianowe firm dla rzepaku - Produkcja roślinna <http://www.farmer.pl/produkcja-roslinna/zalecenia-odmianowe-firm-dla-rzepaku,58698.html> (accessed Jul 23, 2018).
169. M. Pyrzyna, U. Szawłowska, W. Bielawski, E. Zdunek-Zastocka. Purification, biochemical characterisation, and mass spectrometry analysis of phenylalanine aminopeptidase from the shoots of pea plants. *Acta Physiol Plant* **2011**, 33 (2), 609–617.

170. Z. Vujčić, N. Lončar, B. Dojnov, et al. Characterisation of leucyl aminopeptidase from *Solanum tuberosum* tuber. *Food Chemistry* **2010**, 121 (2), 418–423.
171. P. Walde, P.L. Luisi, S. Palmieri. Proteolytic activity in sunflower seeds (*Helianthus annuus* L.). *J. Agric. Food Chem.* **1984**, 32 (2), 322–329.
172. Sephacryl HR 300 <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/s300hr> (accessed Aug 11, 2018).
173. Macro-Prep® High Q Resin | Process Separations | Bio-Rad <http://www.bio-rad.com/en-pl/product/macro-prep-high-q-resin?ID=963aeae1-7233-47c2-bd22-88dda61a39b1> (accessed Aug 11, 2018).
174. L.O. Vodkin, J.G. Scandalios. Comparative properties of genetically defined peptidases in maize. *Biochemistry* **1980**, 19 (20), 4660–4667.
175. G. Müller-Starck, A. Hüttermann. Aminopeptidases in seeds of *Picea abies* (L.) Karst.: characterization of leucine aminopeptidase by molecular properties and inhibitors. *Biochem. Genet.* **1981**, 19 (11–12), 1247–1259.
176. J.P. Cherry, F.R.H. Katterman, J.E. Endrizzi. Seed esterases, leucine aminopeptidases and catalases of species of the genus *Gossypium*. *Theoretical and Applied Genetics* **1972**, 42 (5).
177. L. Kolehmainen, J. Mikola. Partial purification and enzymatic properties of an aminopeptidase from Barley. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1971**, 145 (2), 633–642.
178. T.C. Elleman. Aminopeptidases of pea. *Biochemical Journal* **1974**, 141 (1), 113–118.
179. K. Ikeda, H. Ohminami, T. Kusano. Purification and properties of an aminopeptidase from buckwheat seed. *Agricultural and Biological Chemistry* **1983**, 47 (8), 1799–1805.
180. A.P. Abdala, L.H. Takeda, J.O. Freitas Jr., K.B. Alves. Purification and partial characterization of *Phaseolus vulgaris* seed aminopeptidase. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* **1999**, 32 (12), 1489–1492.
181. T. Nakadai, S. Nasuno, N. Iguchi. Purification and Properties of Leucine Aminopeptidase I–III from *Aspergillus oryzae*. *Agricultural and Biological Chemistry* **1973**, 37 (4), 757–775.
182. E. Wiberg, N. Wiberg, A.F. Holleman. Inorganic chemistry, 1st English.; Wilberg, N., Ed.; San Diego : Academic Press ; Berlin ; New York : De Gruyter, **2001**.
183. M.E. Oviedo Ovando, M.C. Isola, A.M. Maldonado, L. Franzoni. Purification and properties of iminopeptidase from peanut seeds. *Plant Science* **2004**, 166 (5), 1143–1148.
184. W.T. Lowther, B.W. Matthews. Metalloaminopeptidases: common functional themes in disparate structural surroundings. *Chem. Rev.* **2002**, 102 (12), 4581–4608.
185. M.C. Isola, L. Franzoni. Aminopeptidase activities in peanut cotyledons. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal (Brazil)* **1996**, 8 (3), 167–173.
186. J. Caldwell, L. Sparrow. Purification and characterization of an unusual aminopeptidase from pea seeds. *Australian Journal of Plant Physiology* **1980**, 7 (2), 131.
187. A. Drzymala, B. Parabucka, W. Bielawski. Mobilizacja białek zapasowych ziarniaków zbóż. *Postępy Biochemii* **2009**, 55 (4), 447–455.
188. A. Capocchi, M. Cinollo, L. Galleschi, et al. Degradation of gluten by proteases from dry and germinating wheat (*Triticum durum*) seeds: An in vitro approach to storage protein mobilization. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, 48 (12), 6271–6279.
189. G. Stacey, S. Koh, C. Granger, J.M. Becker. Peptide transport in plants. *Trends Plant Sci.* **2002**, 7 (6), 257–263.
190. K. Brijs, W. Bleukx, J.A. Delcour. Proteolytic activities in dormant rye (*Secale cereale* L.) grain. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, 47 (9), 3572–3578.
191. A. Schaller. A cut above the rest: the regulatory function of plant proteases. *Planta* **2004**, 220 (2), 183–197.
192. T.M. Hildebrandt, A. Nunes Nesi, W.L. Araújo, H.-P. Braun. Amino Acid Catabolism in Plants. *Molecular Plant* **2015**, 8 (11), 1563–1579.
193. N. Verbruggen, C. Hermans. Proline accumulation in plants: a review. *Amino Acids* **2008**, 35 (4), 753–759.
194. L. Szabados, A. Saviouré. Proline: a multifunctional amino acid. *Trends Plant Sci.* **2010**, 15 (2), 89–97.
195. Y.-C. Li, H. Qian, X.-L. Sun, et al. The effects of germination on chemical composition of peanut seed. *Food Science and Technology Research* **2014**, 20 (4), 883–889.

196. C.K. Lee, R. Karunanithy. Effects of germination on the chemical composition of *Glycine* and *Phaseolus* beans. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **1990**, 51 (4), 437–445.
197. Leung David W. M., Bewley J. Derek. Increased activity of aminopeptidase in the cotyledons of red light-promoted lettuce seeds is controlled by the axis. *Physiologia Plantarum* **2006**, 59 (1), 127–133.
198. P. Hao, J. Zhu, A. Gu, et al. An integrative proteome analysis of different seedling organs in tolerant and sensitive wheat cultivars under drought stress and recovery. *Proteomics* **2015**, 15 (9), 1544–1563.
199. M.A. Salmia, J.J. Mikola. Localization and Activity of Naphthylamidases in Germinating Seeds of Scots Pine, *Pinus sylvestris*. *Physiologia Plantarum* **1976**, 38 (2), 73–77.
200. A.E. Amrani, C. Suire, B. Camara, J. Gaudillere, I. Couee. Purification and characterization of a novel aminopeptidase, plastidial alanine-aminopeptidase, from the cotyledons of etiolated sugar beet seedlings. *Plant Physiol.* **1995**, 109 (1), 87–94.
201. R. Johnson, R. Storey. Aminopeptidase Activity from Germinated Jojoba Cotyledons 1. *Plant Physiol* **1985**, 79 (3), 641–645.
202. U. Szawłowska, W. Prus, W. Bielawski. The molecular and biochemical characteristics of proline iminopeptidase from rye seedlings (*Secale cereale* L.). *Acta Physiol Plant* **2006**, 28 (6), 517.
203. Á.V. Domínguez-May, M. Carrillo-Pech, F.A. Barredo-Pool, et al. A Novel Effect for Glycine on Root System Growth of Habanero Pepper. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* **2013**, 138 (6), 433–442.
204. B. Brouwer, A. Ziolkowska, M. Bagard, O. Keech, P. Gardeström. The impact of light intensity on shade-induced leaf senescence. *Plant, Cell & Environment* **2012**, 35 (6), 1084–1098.
205. R. Gaj. Efektywne wykorzystanie składników mineralnych z nawozów we współczesnym rolnictwie; Centrum Doradztwa Rolniczego w Brwinowie, Oddział, Poznań, **2013**.
206. A. Grześkowiak. Agrotechnika. Vademecum nawożenia czyli zbiór podstawowych, praktycznych informacji o nawożeniu <http://www.agrotechnika.suwalki.pl/zasady.htm> (accessed Oct 3, 2018).
207. T. Jadczyzyn, J. Kowalczyk, W. Lipiński. Zalecenia nawozowe dla roślin uprawy polowej i trwałych użytków zielonych; Wydawnictwo IUNG-PIB, Puławy, **2010**.
208. R.L. Sinsabaugh, M.E. Gallo, C. Lauber, M.P. Waldrop, D.R. Zak. Extracellular Enzyme Activities and Soil Organic Matter Dynamics for Northern Hardwood Forests receiving Simulated Nitrogen Deposition. *Biogeochemistry* **2005**, 75 (2), 201–215.
209. M. Razaq, P. Zhang, H. Shen, Salahuddin. Influence of nitrogen and phosphorous on the growth and root morphology of *Acer mono*. *PLOS ONE* **2017**, 12 (2), e0171321.
210. B.P.R. Subudhi, P.K. Singh. Effect of phosphorus and nitrogen on growth, chlorophyll, amino nitrogen, soluble sugar contents and algal heterocysts of water fern *Azolla pinnata*. *Biol Plant* **1979**, 21 (6), 401–406.
211. M. Wang, Q. Zheng, Q. Shen, S. Guo. The critical role of potassium in plant stress response. *Int J Mol Sci* **2013**, 14 (4), 7370–7390.
212. A. Sirko, L.J.D. Kok, S. Haneklaus, et al. Sulfur metabolism in plants: Regulatory aspects, significance of sulfur in the food chain, agriculture and the environment; Backhuys Publishers, Weikersheim, **2009**.
213. B. Filipek-Mazur, O. Gorczyca, M. Tabak. Wpływ nawozów mineralnych zawierających siarkę na zawartość azotu i siarki oraz aminokwasów siarkowych w nasionach rzepaku jarego i ziarnie pszenicy ozimej. *Fragm. Agron.* **2017**, 34 (3), 33–43.
214. Nawożenie siarką <http://rolnictwo.com.pl/nawozenie-siarka,n8377.html> (accessed Nov 3, 2018).
215. I. Cakmak, A.M. Yazici. Magnesium: A forgotten element in crop production. **2010**, 94 (2), 3.
216. R. Douce, J. Bourguignon, M. Neuburger, F. Rébeillé. The glycine decarboxylase system: a fascinating complex. *Trends in Plant Science* **2001**, 6 (4), 167–176.
217. N.L. Taylor, D.A. Day, A.H. Millar. Environmental Stress Causes Oxidative Damage to Plant Mitochondria Leading to Inhibition of Glycine Decarboxylase. *Journal of Biological Chemistry* **2002**, 277 (45), 42663–42668.
218. M. Tyszką. Mikroelementy ważne dla rzepaku - Rośliny oleiste. *Farmer* **2016**, No. 3.

219. J.J. Camacho-Cristóbal, J. Rexach, A. González-Fontes. Boron in Plants: Deficiency and Toxicity. *Journal of Integrative Plant Biology* **2008**, 50 (10), 1247–1255.
220. I. Kasajima, T. Fujiwara. Identification of novel *Arabidopsis thaliana* genes which are induced by high levels of boron. *Plant Biotechnology* **2007**, 24 (3), 355–360.
221. K. Szulc. Prawidłowe nawożenie rzepaku borem i manganem - Nawozy <http://www.farmer.pl/produkcja-roslinna/nawozy/prawidlowe-nawozenie-rzepaku-borem-i-manganem,67322.html> (accessed Nov 7, 2018).
222. I. Karmous, A. Chaoui, K. Jaouani, et al. Role of the ubiquitin-proteasome pathway and some peptidases during seed germination and copper stress in bean cotyledons. *Plant Physiol. Biochem.* **2014**, 76, 77–85.
223. I. Karmous, K. Jaouani, E. El Ferjani, A. Chaoui. Responses of proteolytic enzymes in embryonic axes of germinating bean seeds under copper stress. *Biol Trace Elem Res* **2014**, 160 (1), 108–115.
224. U. Sienkiewicz-Cholewa. Jakie uprawy warto zasilać molibdenem <http://nawozy.eu/wiedza/porady-ekspertow/rosliny/jakie-uprawy-warto-zasilac-molibdenem.html> (accessed Nov 7, 2018).
225. K.L. Hale, H.A. Tufan, I.J. Pickering, et al. Anthocyanins facilitate tungsten accumulation in Brassica. *Physiologia Plantarum* **2002**, 116 (3), 351–358.
226. C.A. Kwiatkowski. Response of winter rape (*Brassica napus* L. ssp. *oleifera*) to foliar fertilization and different seeding rates. *Acta Agrobotanica* **2012**, 65 (2), 161–170.
227. L. Macomber, R.P. Hausinger. Mechanisms of nickel toxicity in microorganisms. *Metallomics* **2011**, 3 (11), 1153.
228. A. Kaczyńska, M. Zajączkowski, M. Grzybiak. Toksyczny wpływ kadmu na rośliny i człowieka. *Ann. Acad. Med. Gedan.* **2015**, No. 45, 65–70.
229. G. Dąbrowska, K. Hryniewicz, A. Mierek-Adamska. Wrażliwość odmian jarych i ozimych rzepaku na metale ciężkie i bakterie glebowe. *Rośliny Oleiste - Oilseed Crops* **2012**, 33 (2).
230. C. Xiaochuang, Z. Chu, Z. Lianfeng, et al. Glycine increases cold tolerance in rice via the regulation of N uptake, physiological characteristics, and photosynthesis. *Plant Physiology and Biochemistry* **2017**, 112, 251–260.
231. N. Verbruggen, C. Hermans. Proline accumulation in plants: a review. *Amino Acids* **2008**, 35 (4), 753–759.
232. K. Shah, R.S. Dubey. Cadmium elevates level of protein, amino acids and alters activity of proteolytic enzymes in germinating rice seeds. *Acta Physiologiae Plantarum* **1998**, 20 (2).
233. H. Küpper. 15. Lead Toxicity in Plants. In *Lead – Its Effects on Environment and Health*; Sigel, A., Sigel, H., Sigel, R. K. O., Eds.; De Gruyter, Berlin, Boston, **2017**.
234. M. Kopeć, K. Gondek. Zawartość rtęci w roślinach górskiego użytku zielonego (Czarny Potok) po 40 latach zróżnicowanego nawożenia mineralnego. *Inżynieria Ekologiczna* **2009**, No. 21, 7–14.
235. R. Azevedo, E. Rodriguez. Phytotoxicity of mercury in plants: A Review. *Journal of Botany* **2012**, 1–6.
236. B.P. Shaw. Effects of mercury and cadmium on the activities of antioxidative enzymes in the seedlings of *Phaseolus aureus*. *Biol Plant* **1995**, 37 (4), 587.
237. V. Verma, P. Ravindran, P.P. Kumar. Plant hormone-mediated regulation of stress responses. *BMC Plant Biol.* **2016**, 16, 86.
238. R.A. Creelman, J.E. Mullet. Biosynthesis and action of jasmonates in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **1997**, 48, 355–381.
239. Y.-S. Ku, M. Sintaha, M.-Y. Cheung, H.-M. Lam. Plant hormone signaling crosstalks between biotic and abiotic stress responses. *International Journal of Molecular Sciences* **2018**, 19 (10).
240. B. Kmieć, R. Drynda, M. Wołoszyńska. Molekularne podstawy odpowiedzi roślin na niską temperaturę. *Biotechnologia* **2005**, 70 (3), 184–200.
241. E. Grzyś. Wpływ wybranych substancji biologicznie czynnych na kukurydzę uprawianą w warunkach stresu; Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu, Wrocław, **2012**.
242. M.J. Dennis, R.C. Massey, D.J. McWeeny, M.E. Knowles, D. Watson. Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in UK total diets. *Food Chem. Toxicol.* **1983**, 21 (5), 569–574.

243. T. Steliga, D. Kluk. Ocena składu zanieczyszczeń gleb skażonych TPH i WWA pod kątem opracowania technologii ich bioremediacji; Instytut Nafty i Gazu – Państwowy Instytut Badawczy, Kraków, **2017**.
244. ROZPORZĄDZENIE MINISTRA ŚRODOWISKA z dnia 1 września 2016 r. w sprawie sposobu prowadzenia oceny zanieczyszczenia powierzchni ziemi.
245. D. Ugrekhelidze, F. Korte, G. Kvesitadze. Uptake and transformation of benzene and toluene by plant leaves. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **1997**, 37 (1), 24–29.
246. B. Smreczak. Wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (WWA) w układach gleba-roślina wyższa. *Roczniki gleboznawcze* **1997**, 158 (3/4), 37–47.
247. X.-H. Zhan, H.-L. Ma, L.-X. Zhou, et al. Accumulation of phenanthrene by roots of intact wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings: passive or active uptake? *BMC Plant Biology* **2010**, 10 (1), 52.
248. A. Frankiewicz. Dodatki uszlachetniające do benzyny silnikowej i oleju napędowego [https://nafta.wnp.pl/dodatki-uszlachetniajace-do-benzyny-silnikowej-i-oleju-napedowego,277961\\_2\\_0\\_0.html](https://nafta.wnp.pl/dodatki-uszlachetniajace-do-benzyny-silnikowej-i-oleju-napedowego,277961_2_0_0.html) (accessed Mar 1, 2019).
249. J. Markowski. Dodatki uszlachetniające do olejów napędowych. *Nafta-Gaz* **2017**, 73 (3), 208–213.
250. K. Słowiński. Promieniowanie ultrafioletowa w ograniczaniu zgorzeli siewek sosny zwyczajnej (*Pinus Sylvestris* L.). *Inżynieria Rolnicza* **2011**, 6 (131), 207–213.
251. J. Gorzelany, N. Matłok, M. Dziura, G. Witek, D. Migut. Impact of Dr Green Prime seed fertilizer on the germination energy and ability of wheat seeds. *ECONTECHMOD: An International Quarterly Journal on Economics of Technology and Modelling Processes* **2017**, 6 (4), 33–40.
252. Notatnik rolnika - zgorzel siewek zbóż <http://www.notatnikrolnika.pl/index.php/zgorzel-siewek-zboz.html> (accessed Jan 16, 2019).
253. A. Mehta, A.C.M. Brasileiro, D.S.L. Souza, et al. Plant–pathogen interactions: what is proteomics telling us? *The FEBS Journal* **2009**, 3731–3746.
254. P. Schweizer, A. Buchala, R. Dudler, J.-P. Métraux. Induced systemic resistance in wounded rice plants. *The Plant Journal* **1998**, 14 (4), 475–481.
255. L. Zhou, R. Thornburg. Wound-inducible genes in plants. *Inducible Gene Expr Plants* **1999**, 127–158.
256. Y.Q. Gu, L.L. Walling. Specificity of the wound-induced leucine aminopeptidase (LAP-A) of tomato activity on dipeptide and tripeptide substrates. *Eur. J. Biochem.* **2000**, 267 (4), 1178–1187.
257. B.C.P. Polska. Środki ochrony roślin <https://www.agro.basf.pl> (accessed Dec 2, 2018).
258. J. Wang, E. Pawelzik, J. Weinert, Q. Zhao, G.A. Wolf. Effect of Fungicide Treatment on the Quality of Wheat Flour and Breadmaking. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, 52 (25), 7593–7600.
259. M.J. Gerhard. Der Einfluß strobilurinhaltiger Fungizide auf physiologische Abläufe der Ertragsbildung an Winterweizensorten (praca doktorska); Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan, München, **2001**; p 170.