

ROZDZIAŁ XV. **TEST TOLERANCJI
KOMÓREK ROŚLINNYCH
NA ABIOTYCZNE CZYNNIKI
STRESOWE**

CZĘŚĆ TEORETYCZNA

Rośliny w środowisku naturalnym nieustannie narażone są na działanie różnego typu stresów. Terminem **stres** określa się zarówno niekorzystny czynnik działający na organizm, jak i stan organizmu wywołany działaniem tego czynnika. **Czynnik stresowy** (stresor) oznacza każdy bodziec środowiska, który działając na organizm, może prowadzić do zaburzeń jego funkcji i struktury. **Reakcja stresowa** oznacza odpowiedź na ten bodziec oraz wynikający z niej stan dostosowania organizmu. Stresowe czynniki środowiska można podzielić na **abiotyczne** i **biotyczne**.

Odpowiedź organizmu na czynnik stresowy obejmuje kolejno **fazy: alarmu, restytucji i odporności**; po ustąpieniu czynnika stresowego następuje faza regeneracji. W przypadku zbyt wysokiej intensywności stresu pojawia się faza wyczerpania, dochodzi do nieodwracalnych uszkodzeń, prowadzących nawet do śmierci organizmu. Odpowiedź na czynnik stresowy może być **lokalna** (w miejscu działania stresora) lub **systemiczna**, gdy sygnał z miejsca działania stresora rozprzestrzenia się i prowadzi do zwiększenia odporności całego organizmu. Dostosowanie się roślin do stresowych czynników środowiska może zachodzić w wyniku **adaptacji**, czyli procesów odbywających się w toku ewolucji, zabiegów hodowlanych – powodujących trwałe zmiany w genomie, lub w wyniku **aklimatyzacji**, polegającej na niedziedzicznych zmianach struktury i funkcji, które ograniczają niekorzystne skutki działania stresu. Reakcja stresowa może być **specyficzna** dla stresora lub **niespecyficzna**, gdy odpowiedzi na różne stresory są podobne.

Na poziomie komórkowym większość czynników stresowych oddziałuje na wiele ważnych procesów metabolicznych roślin, takich jak fotosynteza i oddychanie mitochondrialne.

W konsekwencji może dojść do ograniczenia wzrostu i plonowania, a nawet do śmierci rośliny. Zaburzenie procesów oddechowych komórki prowadzi zarówno do obniżenia podaży energii, jak i wzmożonego generowania reaktywnych form tlenu i stresu oksydacyjnego. W efekcie tych zmian dochodzi do zaburzeń metabolizmu i uszkodzeń obniżających żywotność komórek. Zaburzenie procesów oddechowych komórki jest niespecyficzną reakcją na czynniki stresowe.

CZĘŚĆ PRAKTYCZNA

Cel ćwiczenia

Zbadanie reakcji komórek roślinnych (korzeni siewek) na abiotyczne czynniki stresowe: zasolenie – NaCl, metal ciężki – Cd²⁺, chłód – temperatura 8°C, ksenobiotyk organiczny – fenol, przeprowadzone na podstawie testu żywotności komórek.

Zasada metody

W obecności żywych komórek bezbarwny w stanie utlenionym chlorek 2,3,5-trifenyloetrazoliowy (TTC) (por. rozdział XII) staje się akceptorem elektronów pochodzących z łańcucha transportu elektronów w mitochondriach (uwolnionych z NADP, głównie przez dehydrogenazy kompleksu I). Przyłączenie elektronów do TTC prowadzi do powstania inicjalnego produktu redukcji TTC, który jest niestabilny i może szybko ulec ponownemu utlenieniu przez tlen cząsteczkowy (O₂). Formowanie stabilnego produktu redukcji TTC, czyli nierozpuszczalnego, czerwonego trifenyloformazanu (TTC-H), uwarunkowane jest prawidłową aktywnością kompleksu IV łańcucha oddechowego, czyli oksydazy cytochromowej (tzw. oksydaza terminalna), która warunkuje środowisko anaerobowe dzięki czteroelektronowej redukcji O₂ do wody. Żywotność komórek poddanych działaniu stresu abiotycznego ocenia się w oparciu o formowanie barwnego TTC-H, które zależy od prawidłowego funkcjonowania mitochondrialnego łańcucha transportu elektronów.

Materiał

trzydniowe kultury hydroponiczne pszenicy zwyczajnej hodowane w 300 cm³ pożywki ¼ Hoagland (por. załącznik 3), na świetle, w temperaturze 24°C

Sposób wywołania stresu

1. Rośliny pszenicy przenieść do 300 cm³ świeżej pożywki ¼ Hoagland, zawierającej:
 - a) NaCl 100 mM – stres solny,
 - b) CdCl₂ 100 µM – stres wywołany przez metal ciężki,
 - c) Fenol 100 µM – stres wywołany przez ksenobiotyk organiczny.
2. Rośliny pszenicy przenieść do 300 cm³ świeżej pożywki ¼ Hoagland i umieścić kultury w chłodni w temperaturze 8°C (pozostawić zapalone światło!) – stres chłodu.

Kontrolę stanowią kultury hydroponiczne przeniesione do 300 cm³ świeżej pożywki ¼ Hoagland niepoddane działaniu powyższych stresorów.

Na każdy wariant przygotować dwie niezależne próby po 15 roślin, w czasie siedmiodniowej hodowli dwukrotnie wymienić pożywkę na świeżo przygotowane zgodnie z opisem powyżej.

Odczynniki

- a) pożywka ¼ Hoagland (por. załącznik 3)
- b) NaCl, CdCl₂, fenol
- c) bufor do płukania (P): 350 cm³ 50 mM buforu fosforanowego pH 7,4 z dodatkiem 12 kropli detergentu Tween 20
- d) bufor inkubacyjny (I): 150 cm³ 50 mM buforu fosforanowego pH 7,4 z dodatkiem 3 kropli detergentu Tween 20 i 10 mM chlorku 2,3,5-trifenylo-tetrazoliowego (TTC)
- e) 96% C₂H₅OH

Sprzęt laboratoryjny

naczynia 500 cm³ do hydroponicznej hodowli pszenicy, skalpele, pęsety, gaza, bibuła, lignina, 10 schłodzonych móżdżerzy porcelanowych, bagietki, pipety (1–10 cm³), cylinder miarowy 25 cm³, 10 zlewek 50 cm³, 10 probówek szklanych, 10 lejeków, waga laboratoryjna, minutnik, ciepłarka (25°C), wirówka, spektrofotometr, kuwety spektrofotometryczne, 10 probówek z korkiem typu

Falcon (15–25 cm³), 10 probówek wirowniczych bez korka 10 cm³, statywy do probówek, markery

Wykonanie doświadczenia

I.A. PRZYGOTOWANIE MATERIAŁU

1. Wiązki korzeni z poszczególnych wariantów umieścić w zlewkach o pojemności 50 cm³ i dwukrotnie przepłukać buforem – korzenie zalać 15 cm³ buforu P, delikatnie kilkakrotnie przemieszczać bagietką, wylać bufor ze zlewki, czynność płukania powtórzyć. Przepłukane wiązki korzeni przenieść za pomocą pęsety na bibułę, delikatnie osuszyć.
2. Przygotować 5 par probówek z korkiem, pary probówek opisać odpowiednio nazwą czynnika stresowego (NaCl, CdCl₂, fenol, chłód) i „kontrola” (materiał niepoddany działaniu stresu).
3. Posługując się skalpelem i pęsetą, pobrać i odważyć dwie porcje po 200 mg korzeni z każdego wariantu. Materiał przenieść do odpowiednio opisanych probówek.

I.B. WYKONANIE OZNACZENIA

1. Nastawienie inkubacji: fragmenty korzeni zalać 10 cm³ buforu I, probówki zakręcić korkiem, przez chwilę wytrząsać, zapewniając dokładne zanurzenie materiału w buforze.
2. Inkubacja: probówki umieścić w cieplarni o temperaturze 25°C na 1 godzinę. W czasie inkubacji co 15 minut wytrząsnąć zawartość probówek.
3. Po upływie 1 godziny inkubacji dokładnie odsączyć bufor I od korzeni, posługując się lejkami z warstwą gazy.
4. Ekstrakcja barwnego formazanu (TTC-H) z korzeni:
 - a) odsączone korzenie przenieść pęsetą z gazy do schłodzonego moździerza i zalać 5 cm³ 96% C₂H₅OH;
 - b) korzenie dokładnie zhomogenizować, homogenaty przelać do opisanych probówek wirowniczych, moździerz dodatkowo przepłukać 2 cm³ 96% C₂H₅OH i dołączyć do głównej puli homogenatu;
 - c) homogenaty odwirować (20 000 × g, 10 min), supernatanty zlać do opisanych szklanych probówek;

- d) zmierzyć absorbancję etanolowych ekstraktów formazanu wszystkich prób w kuwetach spektrofotometrycznych na spektrofotometrze przy długości fali 485 nm względem 96% C₂H₅OH. Wyniki (średni pomiar z 2 prób z każdego wariantu) wpisać do tabeli 15.1.

Opracowanie wyników

Określić żywotność komórek poddanych działaniu abiotycznych czynników stresowych jako % kontroli, przyjmując za 100% wartość absorbancji A₄₈₅ korzeni kontrolnych. Wyniki zebrać w tabeli 15.1.

Wariant hodowli	A ₄₈₅	Żywotność [% kontroli]
Kontrola		100
NaCl		
CdCl ₂		
Fenol		
Chlód		

Tabela 15.1. Wpływ stresu abiotycznego na żywotność komórek roślinnych

Wyciągnąć wnioski dotyczące wpływu zastosowanych czynników stresowych na żywotność komórek roślinnych. W oparciu o dane literaturowe wyjaśnić negatywny skutek działania badanych czynników stresowych na procesy oddechowe i żywotność komórek.

Literatura

- Kopcewicz J., Lewak S. (red.), *Fizjologia roślin*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2019.
- Kozłowska M. (red.), *Fizjologia roślin. Od teorii do nauk stosowanych*, PWRiL, Warszawa 2007.
- Szweykowska A., *Fizjologia roślin*, Wydawnictwo UAM, Poznań 2002.
- Woźny A., Przybył K. (red.), *Komórki roślinne w warunkach stresu*, t. 1: *Komórki in vivo*, Wydawnictwo UAM, Poznań 2004.