Wpływ 2,4 D na niektóre enzymy komórek szparkowych

The Action of 2,4 D on Some of the Enzymes of the Stomatal Cells

W. MACIEJEWSKA-POTAPCZYK

Jednym z przejawów porażenia roślin przez 2,4 D zastosowanym w stężeniach większych jest zamknięcie się szparek.

Jeżeli poddać obserwacji mikroskopowej preparaty z epidermy liści potraktowanych tym związkiem, to przekonać się można, że po spryskaniu liści hormonem w dużym (0,05 — 0,1%) stężeniu następuje dość szybko, bo po upływie 1/2 — 1 godziny zamknięcie szparek.

Jeżeli wycinki epidermy liścia umieścić bezpośrednio w 0,1% roztworze 2,4 D, to już po kilku minutach, a niekiedy nawet natychmiast można zauważyć zamknięcie się szparek.

Obserwacje te znajdują potwierdzenie w pracach M. Ferri i A. Lex, którzy stwierdzili u szeregu roślin zamykanie się szparek pod wpływem większych stężeń heteroauksyn.

Cytowany przez tych autorów Boysen-Jensen na podstawie obserwacji zamykania się szparek pod wpływem 2,4 D wyprowadza wniosek, że traktowanie liści większymi stężeniami tego związku musi powodować zmiany w zawartości skrobi w komórkach szparkowych, ale obserwacje tego rodzaju nie były w ogóle przeprowadzane.

Procesy wpływające na zmiany turgoru w komórkach zamykających szparki i kierujące ich ruchami nie są jeszcze dostatecznie wyjaśnione.

Do niedawna uważało się dość powszechnie, że istotę ich stanowi przemiana skrobi w cukier i cukru w skrobię i w związku z tym odpowiednie zmiany w ciśnieniu osmotycznym w komórkach szparkowych.

Te procesy są jednak zbyt powolne, aby mogły tłumaczyć szybkie niekiedy zamykanie się szparek pod wpływem czynników zewnętrznych.

Niektórzy autorzy, jak Williams i cytowani przez niego: Gregory, Heath, Kiselew i inni, nie stwierdziwszy korelacji między zamykaniem i otwieraniem się szparek i przemianami skrobi $\longleftrightarrow$ cukier, są zdania, że procesy enzymatyczne nie leżą u podstaw zmian turgoru w komórkach zamykających, mających wpływ na mechanizm ruchów szparek.

W nowszych pracach dotyczących tego zagadnienia uwzględnia się takie czynniki, jak zmiany kwasowości aktualnej w komórkach zamykających szparkę, w związku z gromadzeniem się tam lub zanikaniem CO_2 ; kiedy kwasowość ta leży poza punktem izoelektrycznym zarodzi, wtedy wzrasta zdolność jej pęcznienia, co powoduje rozwarcie szparki; w punkcie izoelektrycznym zdolność pęcznienia zarodzi jest najmniejsza, wtedy następuje zamknięcie szparki.

Obok czynnika zmian kwasowości w komórkach szparkowych uznaje się w mechanizmie ruchów szparek za istotną aktualną równowagę między jonami K^+ i Ca^{++} w komórkach zamykających, mającą znaczenie dla przepuszczalności i uwodnienia komórek (Imamura 1951).

W pracy niniejszej poddano badaniom wpływ 2,4 D na działalność enzymów występujących w komórkach szparkowych, a pozostających w związku z syntezą i rozpadem skrobi, mianowicie amylazy i fosforylasy.

AMYLaza

Nelly i współpracownicy, cytowani przez Wortha (1953), badając wpływ 2,4 D na działalność α i β -amylazy u fasoli stwierdzili, że związek ten znacznie obniża aktywność tych enzymów w łodygach fasoli.

W pracy niniejszej badania nad wpływem 2,4 D na działalność amylazy w komórkach szparkowych przeprowadzono w sposób następujący:

Wycinki z epidermy liści badanych roślin umieszczano w płynie Lugola: stwierdzano w chloroplastach komórek szparkowych obecność skrobi. Następnie kilka ściętych liści tejże rośliny spryskiwano 0,1% roztworem 2,4 D, kilka zaś dla kontroli wodą. Liście wstawiano do wody i umieszczano w ciemności. Po pewnym czasie zarówno z epidermy liści kontrolnych, jak i spryskiwanych 2,4 D przygotowano preparaty, które umieszczono w płynie Lugola. Okazało się, że w komórkach szparkowych u liści kontrolnych niekiedy po 24 godzinach, a niekiedy dopiero po 3—4 dobach skrobia ulegała zanikowi (ujemna reakcja z płynem Lugola), co świadczy o działalności amylaz w tych komórkach. W preparatach zaś z roślin potraktowanych 2,4 D, na których szparki były zamknięte, wykryto nierozłożoną skrobię w chloroplastach komórek szparkowych (dającą dodatnią reakcję z odczynnikiem Lugola).

Skrobia ta utrzymywała się w ciągu szeregu dni.

Doświadczenie tego rodzaju przeprowadzono na kilku roślinach: *Cirsium* sp., *Chenopodium* sp. i *Pelargonium* sp. zawsze z tym samym wynikiem.

Załączone fotografie ilustrują ten wynik.

Zaznaczyć trzeba, że uzyskanie okazów roślin kontrolnych, w których nie znaleziono by śladów skrobi w chloroplastach komórek szparkowych,

A

B

Ryc. 1. Fotografie preparatów epidermy *Pelargonium* sp. w bardzo słabym odczynniku Lugola; A — liści kontrolnych (na chloroplastach nie widać skrobii), B — liści spryskanych 2, 4 D (na chloroplastach komórek zamkniętej szparki występuje obficie).

Photographs of sections of the epiderm of *Pelargonium* sp. in a weak solution of Lugol's reagent. A — control leaves (chloroplasts without starch), B — leaves sprayed with 2, 4 D (chloroplasts of the closed cells with numerous starch grains).

A

B

Ryc. 2. Fotografie preparatów epidermy (umieszczonych poprzednio w środowisku estru Corich) w b. słabym odczynniku Lugola; A — liści kontrolnych (w chloroplastach skrobia występuje), B — liści spryskanych 2, 4 D (skrobia występuje tylko na niektórych chloroplastach zamkniętej szparki)

Photos of sections of the epiderm (previously immersed in a solution of the Coriester (in a weak solution of Lugol's reagent; A — control leaves (chloroplasts with starch), B — leaves sprayed with 2, 4 D (starch only in a small number of chloroplasts of closed stomatal cells).

jest bardzo trudne. Np. u pelargonii w jednym z doświadczeń skrobia występowała w chloroplastach komórek szparkowych jeszcze po 8 dniach przetrzymywania w ciemności, kiedy liście uległy już żółknięciu.

Z doświadczeń tych wynika, że aktywność amylaz zawartych w komórkach szparkowych ulega pod wpływem 2,4 D obniżeniu lub nawet zahamowaniu (ilościowe stwierdzenie różnic w aktywności amylaz w komórkach szparkowych liści kontrolnych i spryskiwanych hormonem stosowaną w tych doświadczeniach metodą nie jest możliwe).

FOSFORYLAZA

Obecność fosforylasy katalizującej odwracalną reakcję skrobia + fosforan $\rightleftharpoons$ jednofosforan glukozy (ester Corich) może być wykryta w komórkach roślinnych za pomocą mikrometody opracowanej przez Yin a i Sun a.

Metoda ta polega na tym, że preparaty z odskrobionych (przez przetrzymywanie w ciemności) zielonych tkanek roślinnych umieszcza się w środowisku estru Corich (1% roztwór estru Corich w buforze najlepiej octanowym o pH około 6 nasyconym toluolem).

Pojawienie się skrobii (którą wykrywamy płynem Lugola) w chloroplastach badanych komórek świadczy o działaniu fosforylasy syntetyzującej skrobię z jednofosforanu glukozy.

Na odskrobionych preparatach z epidermy liści tytoniu i fasoli, umieszczonych w 1% estrze Corich, Yin i Tung stwierdzili bardzo intensywne tworzenie się skrobii w chloroplastach komórek szparek już po 4—5 godzinach.

Metodą powyżej opisaną przeprowadzono badania nad aktywnością fosforylasy w komórkach szparkowych epidermy liści spryskiwanych 2,4 D i liści kontrolnych.

Ester Corich do tego doświadczenia otrzymano metodą enzymatyczną, podaną między innymi przez Biełozjerskiego, a polegającą zasadniczo na otrzymaniu estru przez działanie na substrat zawierający skrobię rozpuszczalną oraz Na_2HPO_4 i KH_2PO_4 wyciągiem z ziemiaka jako źródłem fosforylasy.

Do doświadczeń użyto liści tych samych roślin, co przy doświadczeniach z amylazą.

Liście poddano odskrobieniu, to znaczy doprowadzono do momentu, gdy nie stwierdzano już skrobii wykrywalnej odczynnikiem Lugola w chloroplastach komórek szparkowych (trzeba zaznaczyć, że jednym z zasadniczych warunków zapoczątkowania procesu syntezy skrobii z estru Corich jest obecność śladów wielocukrowca, będącego jakby ośrodkiem zapoczątkowującym proces syntezy polegającej na wydłużeniu istniejącego już łańcucha cząsteczek glukozy).

Po odskrobieniu preparaty z epidermy badanych liści umieszczano jedno w wodzie, drugie w 0,1% roztworze 2,4 D na przeciąg 1/2 — 1 godziny, po czym przenoszono je do 1% roztworu estru Corich (w buforze octanowym o pH 6, nasyconym toluolem).

Po upływie 5—6 godzin preparaty przemywano wodą i umieszczano w płynie Lugola. Obserwacja mikroskopowa wykazywała, że w chloroplastach komórek szparkowych liści kontrolnych pojawiała się skrobia, wykrywająca się płynem Lugola, w chloroplastach zaś komórek szparkowych liści spryskanych 2,4 D skrobii nie stwierdzano.

Załączone fotografie ilustrują ten wynik.

Zaznaczyć trzeba, że w przypadku liści porażonych 2,4 D skrobia nie pojawiła się w chloroplastach komórek skórki nawet po 24 godzinach moczenia w estrze Corich.

Z doświadczenia powyższego wynika, że aktywność fosforylasy w komórkach szparkowych ulega pod wpływem 2,4 D obniżeniu względnie zahamowaniu.

Pomimo wyraźnie stwierdzonego hamującego działania 2,4 D na aktywność amylazy i fosforylasy w komórkach szparkowych nie można wnioskować, że istotą działania tego związku na zamykanie się szparek jest zahamowanie działania tych enzymów.

Zamykanie się bowiem szparek pod wpływem 2,4 D zachodzi u liści już po upływie 1/2—1 godziny i nie można go chyba tłumaczyć procesami syntezy czy rozkładu skrobii, które zachodzą znacznie wolniej.

Bardziej natomiast prawdopodobne wydaje się, że zmiany turgoru w komórkach szparkowych związane są z odwadniającym działaniem 2,4 D na komórkę roślinną.

Z danych Curriera i Hacketta wynika, że komórka reaguje na związki typu hormonów syntetycznych zwiększeniem lub zmniejszeniem (zależnie od stężenia stosowanego związku) uwodnienia.

W szeregu doświadczeń wykazał Currier, że 2,4 D zastosowany w większych stężeniach powoduje odwodnienie komórki przejawiające się koagulacją plazmy i pojawianiem się w niej ziarnistości oraz zwiększeniem przepuszczalności błony plazmatycznej i skurczeniem się całego protoplastu.

W pracy niniejszej obserwując pod mikroskopem komórki epidermy w roztworze 2,4 D, a także komórki szparkowe, stwierdzono w nich pojawianie się ziarnistości, co ilustrują załączone fotografie. Dla potwierdzenia, że 2,4 D działa na zwiększenie przepuszczalności błony plazmatycznej, wykonano doświadczenie z wycinkami buraka ćwikłowego, które po dokładnym opłukaniu umieszczono w 0,1% roztworze 2,4 D. Po niedługim czasie stwierdzono wydostawanie się antocjanu do otaczającego wycinki roztworu, czego nie zaobserwowano u wycinków kontrolnych, umieszczonych w wodzie. Doświadczenie to dowodzi zwiększenia przepuszczalności błon plazmatycznych komórek miększu buraka.

W celu stwierdzenia odwadniającego działania 2,4 D na tkankę roślinną wykonano doświadczenia z dokładnie odmierzonymi wycinkami kłąbów ziemniaka, które umieszczano: jedno w 0,1% roztworze 2,4 D, inne dla kontroli w wodzie.

Po kilku godzinach stwierdzono skurczenie się wycinków w roztworze hormonu w porównaniu z wycinkami w wodzie, które uległy nieznacznemu zwiększeniu. Po 24 godzinach doświadczenia skurczenie to było

bardzo wyraźne, co dowodzi, że komórki tkanki ziemniaka uległy pod działaniem 2,4 D odwodnieniu.

W oparciu więc o dane dotyczące działania 2,4 D na zwiększenie przepuszczalności plazmy oraz na odwodnienie komórek można przypuszczać, że podstawą działania tego związku na mechanizm szparkowy jest odwodnienie komórek i obniżenie turgoru dające w efekcie prawie natychmiastowe zamknięcie się szparek.

ZESTAWIENIE WYNIKÓW

W pracy niniejszej stwierdzono, że:

1. Spryskiwanie liści 0,1% wodnym roztworem soli sodowej 2,4 D powoduje stosunkowo szybkie zamknięcie się szparek.
2. Aktywność enzymów: amylazy i fosforylasy w komórkach szparkowych ulega pod wpływem tych stężeń 2,4 D zahamowaniu.
3. Takie stężenie 2,4 D powoduje zwiększenie przepuszczalności protoplastu komórki roślinnej i odwadnia go silnie.

Wydaje się, że pomimo stwierdzonego hamującego wpływu 2,4 D na aktywność enzymów pozostających w związku z syntezą i rozpadem skrobi w komórkach szparkowych, u podstaw mechanizmu działania tego związku na aparat szparkowy leży raczej odwadniające działanie hormonu prowadzące do zmiany turgoru w komórkach zamykających i dające w efekcie szybkie zamknięcie się szparek.

Praca niniejsza została wykonana w Zakładzie Fizjologii Roślin Uniwersytetu Łódzkiego. Kierownikowi Zakładu panu prof. drowi W. M o y c h o składam serdeczne podziękowanie za cenne wskazówki oraz opiekę nad pracą.

Zakład Fizjologii Roślin
Uniwersytetu Łódzkiego

(Wpłynęło dn. 10.II.1955 r.)

S U M M A R Y

1. The spraying of the leaves with a 0,1% aqueous solution of the sodium salt of 2,4 D causes a relatively rapid closing of the stomata.
2. The activity of amylase and phosphorylase in the stomatal cells is inhibited by 0,1% solution of 2,4 D.
3. The same concentration of 2,4 D increases the permeability of the protoplasm of the plant cell and dehydrates it strongly.

It seems that in spite of the inhibiting influence of 2,4 D on the activity of amylase and phosphorylase a quick closing of the stomata is caused rather by the dehydration of the protoplasm, which leads to changes in the turgor of the stomatal cells.

L I T E R A T U R A

- Alvim P., 1952. The influence of the green mezophyll in stomatal movement, *Plant Physiology* nr 1.
- Biełozjerski A. i Proskuriakow N., 1954, Ćwiczenia z biochemii roślin (tłum. z rosyjskiego) Warszawa, str. 49—51.
- Currier H., 1949, Responses of plant cells to herbicides, *Plant Physiology* nr 5.
- Curtis O., Clark D., 1950, An introduction to plant physiology. N. York, Toronto, London, str. 209—233.
- Ferri M., Lex A., 1948, Stomatal behaviour as influenced by treatment with β -naphtoxyacetic acid, *Contributions from Boyce-Thompson Institute* nr 5.
- Hackett D., 1952, The osmotic change during auxin induced water uptake by potato tissue. *Plant Physiology* nr 2.
- Imamura, Schun - Ichiro, 1951, Untersuchungen über den Mechanismus der Turgorschwankung der Spaltöffnungsschliesszellen 1943, *Japanese Jour. Bot.* 12 (3/4) (praca cyt. *Biological Abstracts* 1951 Vol. 25, nr 10).
- Rabinowitch E., 1945, Photosynthesis and related processes, N. York t. I, str. 47 i str. 334.
- Rubin B., 1954, *Fizjologija rastenij*, Moskwa, str. 105—113.
- Worth D., Cowie L., 1953, The effect of 2,4 dichlorophenoxyacetic acid on phosphorylase, phosphatase, amylase, catalase and peroxidase activity in wheat, *Plant Physiology* nr 1.
- Williams W. T., 1952. Studies in Stomatal Behaviour. II The role of starch in the light response of stomata Part. 3. Quantitative relationships in *Pelargonium* *Journal of Experimental Botany*, Oxford Vol. 3, str. 110—127.
- Williams W. T. 1952, Studies in Stomatal Behaviour. II The role of starch in the light response of stomata Part 4. Variation under constant conditions *Journal of Experimental Botany*, Oxford Vol. III, str. 424—429.
- Yin H., Sun C., 1947, Histochemical method for the detection of phosphorylase in plant tissues, *Science*, Vol. 105, 650.
- Yin H., Tung Y., 1948, Phosphorylase in Guard Cells, *Science* Vol. 108, nr 2795.