Aktywność ureazy w roślinach

Urease activity in plants

M. DĄBROWSKA, K. KLECZKOWSKI, I. REIFER

Ureaza jest szeroko rozpowszechniona w świecie roślinnym (The Enzymes — Boyer, Lardy, Myrbäck 1960). Najbogatszym poznanym źródłem ureazy jest *Bacillus pasteurii*, który zawiera około 1,0% enzymu na suchą masę; z roślin wyższych *Canavalia ensiformis* i *Canavalia obtusifolia* zawierają 0,15% enzymu w przeliczeniu na suchą masę. Tracey (1955) w tabelarycznym zestawieniu 29 przebadanych rodzin botanicznych cytuje następujące rośliny, które zawierają ureazę: *Acer pseudoplatanus* (młode rośliny i nasiona), *Agrostemma githago* (młode rośliny i nasiona), *Glycine hispida* (młode rośliny i nasiona), *Lupinus albus* (młode rośliny i nasiona) i *Mimosa pudica* (nasiona).

Założeniem niniejszej pracy było przebadanie kilkudziesięciu rodzin roślin w celu określenia obecności ureazy w nasionach i kielkach, jak również aktywności tego enzymu w całym cyklu rozwojowym dwóch roślin, a mianowicie: grochu i sałaty.

MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzano w nasionach powietrznie suchych, w kielkach o wieku 6—22 dni oraz w organach bądź całych częściach nadziemnych danej rośliny.

Aktywność ureazy podczas pełnego cyklu rozwojowego roślin badano u grochu odmiany „Szlachetna Perła” i sałaty gruntowej „Królowa Majowych”.

Odczynniki:

L(+) cysteina — Schuchardt NRF,

mocznik przekrystalizowany z H₂O,

pozostałe odczynniki krajowego pochodzenia z Biura Obrotu Odczynniki Gliwice.

Wykonanie oznaczenia: 4g zielonych części roślin, kielków lub 250 mg nasion rozcierano w moździerzu w temperaturze +2°C z 20 ml 0,1 M buforu fosforanowego o pH = 6,8. W przypadku nasion, jak: groch, soja, łubin mielono je w młynku na mączkę i ekstrahowano przez 5 minut w temperaturze +2°C buforem fosforanowym. Analizy wykonywano na kilku poziomach wyciągu w celu wybrania optymalnego stężenia enzymu. Do inkubacji pobierano każdorazowo homogenat uprzednio przesączony przez watę, uzupełniany do 1,0 ml wyżej wymienionym buforem, 0,1 ml roztworu mocznika (10,0 μmoli), a do równoległych prób dodawano ponadto 0,1 ml roztworu L-cysteiny (5,0 μmoli). Inkubację przeprowadzano

w temperaturze $+37^{\circ}\text{C}$ przez 30 minut w naczyniach Conway'a, a następnie pozostawiano na okres 16 godzin do destylacji w temperaturze pokojowej, po czym związany amoniak odmiareczkowany 0,01 N HCl (Brzeski, Kaniuga 1957). Oznaczenia wykonywano w trzech powtórzeniach. Próby kontrolne przygotowywano identycznie jak próby pełne, pomijając dodatek mocznika do inkubatu.

Białko oznaczano metodą Lowry i in. (1951).

Aktywność ureazy obliczano jako ilość zhydrolizowanego mocznika, a wyniki wyrażano zarówno w μmol ach względnie $\text{m}\mu\text{mol}$ ach mocznika na 1 mg białka, jak i w μmol ach mocznika na 1 g suchej masy.

WYNIKI I DYSKUSJA

W tabeli 1 zestawiono wyniki przedstawiające aktywność ureazy w nasionach i częściach zielonych roślin 49 przedstawicieli 30 rodzin botanicznych.

Jak wynika z tabeli nie wszystkie przebadane rośliny wykazują aktywność ureazową. Ponadto w jednej i tej samej rodzinie botanicznej np. *Papilionaceae* — aktywność ureazy w nasionach jest znacznie wyższa niż w kielkach (soja, łubin), podczas gdy w grochu aktywność ureazy została wykazana w częściach zielonych rośliny a nie wykryto jej w nasionach.

Również należy zaznaczyć, że rośliny tych samych rodzin botanicznych, jak i rodziny ewolucyjne bliskie wykazują znaczną rozpiętość w aktywności ureazy zarówno w nasionach, jak i kielkach. Tak na przykład nasiona grochu wykazują brak ureazy, podczas gdy aktywność nasion soi jest bardzo wysoka.

Najwyższą aktywność ureazy wykryto w nasionach i kielkach soi, oraz nieoczekiwanie równie wysoką w nasionach i kielkach arbuza.

W większości przebadanych roślin, które zawierają ureazę, aktywność tego enzymu była około 100, a nawet 1000 razy niższa aniżeli w przypadku nasion soi.

Nandi (1958) stwierdził brak ureazy u pewnych roślin strączkowych, takich jak: *Phaseolus mungo*, *Lens esculenta*, *Vigna catieng* i *Cicer arietinum*.

W naszych badaniach nie wykryto także aktywności tego enzymu w nasionach grochu. Aktywności ureazy nie wykryto również w roślinach należących do innych rodzin botanicznych. Należą do nich: kapelusze grzybów *Agaricus campestris*, *Naematoloma fasciculare* i *Paxillus involutus*, części nadziemne skrzypu, igły świerku i jałowca, liście poziomki, topoli, lipy, kasztanowca, ostu, nasiona sałaty, lnu, słonecznika i gorczycy oraz kielki szczawiu, cebuli i kapusty.

Jak wykazali Reinbothe i Mothes (1962) rzekomy brak aktywności ureazy w homogenatach *Taraxacum*, wynikał z inaktywacji enzymu w procesie przygotowania materiału roślinnego do analizy. Bowiem homogenaty sporządzane w obecności H_2S wykazywały znaczną aktywność ureazową. W naszych badaniach zamiast H_2S stosowano L-cysteinę i jak wynika z tabeli 1 dodatek cysteiny do homogenatów roślinnych podnosił przeważnie aktywność ureazy z wyjątkiem jednego przypadku, kiedy dodatek L-cysteiny obniżył nieznacznie aktywność tego enzymu.

Jak wykazali Reifer i Wielgat (1964) przyczyną braku aktywności ureazy

Tablica 1 — Table 1

Aktywność ureazy u różnych roślin

Urease activity in various plants

Rodzina Family	Gatunek Species	Badany material Investigated matter	Dzień zbioru albo wiek rośliny w dniach Date of harvesting or age of plant in days	L-Cysteina + z dodatkiem — bez L-cysteine + added — omitted	Aktywność ureazy w μ M mocznika Urease activity in μ M of urea	
					na 1 mg białka per 1 mg of protein	na 1 g suchej masy per 1 g of dry matter
1	2	3	4	5	6	7
Agaricaceae	Agaricus campester	kapelusze pileus	17.X.65	— +	— —	— —
Strophariaceae	Naematoloma fascicu- lare	kapelusze pileus	9.VI.65	— +	— —	— —
Paxillaceae	Paxillus involutus	kapelusze pileus	9.VI.65	— +	— —	— —
Boletaceae	Boletus luteus	kapelusze pileus	9.VI.65	— +	0,143 0,119	nie oznaczano non determined
Tricholomata- ceae	Armillariella mellea	kapelusze pileus	27.V.65	— +	0,875 1,027	57,13 66,61
Dicranaceae	Dicranum scoparium	część nadziemna aerial part	27.V.65	— +	0,075 0,115	9,35 14,50
Hypnaceae	Hypnum commutatum	część nadziemna aerial part	27.V.65	— +	0,455 0,470	31,31 32,50
Polypodiaceae	Dryopteris filix-mas	liście leaves	7.VI.65	— +	0,013 0,015	3,80 3,35
Equisetaceae	Equisetum arvense	część nadziemna aerial part	8.VI.65	— +	— —	— —
Pinaceae	Picea abies	igły needles	7.VI.65	— +	— —	— —
	Larix decidua	igły needles	23.VI.65	— +	0,007 0,009	4,29 5,04
	Juniperus communis	igły needles	25.V.65	— +	— —	— —
Cupressaceae	Thuja occidentalis	liście leaves	2.VIII.65	— +	0,026 0,032	6,29 8,01
Ranunculaceae	Ranunculus	kwiaty flowers	2.VIII.65	— +	ślady (traces) 0,034	ślady (traces) 4,76
		liście leaves	2.VIII.65	— +	0,0067 0,0101	1,60 2,39
Rosaceae	Fragaria	liście leaves	28.V.65	— +	— ślady (traces)	— ślady (traces)
	Rosa canina	liście leaves	28.VII.65	— +	0,0062 0,0062	2,61 2,61
Saxifragaceae	Saxifraga hosti	część nadziemna aerial part	25.IX.65	— +	ślady (traces) "	ślady (traces) "
	Ribes rubrum	liście leaves	28.VII.65	— +	— 0,00625	— 1,78

1	2	3	4	5	6	7
Papilionaceae	Pisum sativum	nasiona	—	—	—	—
		seeds	—	+	—	—
		część nadziemna	36	—	0,0086	2,45
	Trifolium	aerial part	36	+	0,0129	3,70
		nasiona	—	—	0,133	18,00
		seeds	—	+	0,133	18,00
		kielki	6	—	0,054	nie oznaczano
	Lupinus angustifolius	seedlings	6	+	0,054	non determined
		nasiona	—	—	0,693	128,00
		seeds	—	+	0,693	128,00
		liścienie	15	—	0,480	nie oznaczano
	Soja	cotyledones	15	+	0,480	non determined
		liście	15	—	0,123	13,50
		leaves	15	+	0,123	13,50
		nasiona	—	—	28,260	1077,00
		seeds	—	+	34,230	1318,00
		kielki	8	—	3,500	397,50
		seedlings	8	+	4,660	460,00
Linaceae	Linum usitatissimum	nasiona	—	—	—	—
		seeds	—	+	—	—
		kielki	7	—	0,080	23,70
		seedlings	7	+	0,080	23,70
Cannabaceae	Humulus lupulus	liście	2.VIII.65	—	0,011	3,525
		leaves		+	0,011	3,525
	Cannabis sativa	nasiona	—	+	0,0875	10,82
		seeds	—	+	0,125	18,90
		kielki	6	—	0,314	28,30
		seedlings	6	+	0,360	32,30
Euphorbiaceae	Euphorbia	część nadziemna	23.VII.65	—	0,0549	14,17
		aerial part		+	0,0652	16,72
Ericaceae	Vaccinium vitis-idaea	liście	8.VI.65	—	ślady (traces)	ślady (traces)
		leaves		+	„	„
Compositae	Carduus	liście	5.VI.65	—	—	—
		leaves		+	—	—
	Lactuca	nasiona	—	—	—	—
		seeds	—	+	—	—
		kielki	8	—	—	—
		seedlings	8	+	0,0378	1,54
	Helianthus annuus	nasiona	—	—	—	—
		seeds	—	+	—	—
		liście	23.VII.65	—	0,0075	2,39
		leaves		+	0,01125	3,58
Polygonaceae	Rumex	nasiona	—	—	ślady (traces)	ślady (traces)
		seeds	—	+	„	„
		kielki	8	—	—	—
		seedlings	8	+	—	—
	Rheum	nasiona	—	—	ślady (traces)	ślady (traces)
		seeds	—	+	„	„
		kielki	11	—	0,069	8,58
		seedlings	11	+	0,069	8,58
	Fagopyrum sagittatum	nasiona	—	—	0,166	15,30
		seeds	—	+	0,166	15,30
		kielki	8	—	0,0133	3,27
		seedlings	8	+	0,015	3,60
Labiatae	Mentha	liście	2.VIII.65	—	—	—
		leaves		+	0,007	2,24

1	2	3	4	5	6	7
Liliaceae	Allium cepa	nasiona seeds kielki seedlings	— — 11 11	— + — +	ślady (traces) 0,029 — —	ślady (traces) 2,95 — —
Cruciferae	Brassica oleracea	nasiona seeds kielki seedlings	— — 7 7	— + — +	ślady (traces) „ — —	ślady (traces) „ — —
	Sinapis alba	nasiona seeds	— —	— +	— —	— —
Chenopodiaceae	Beta vulgaris	kielki seedlings	8 8	— +	0,029 0,058	nie oznaczano non determined
	Spinacia oleracea	nasiona seeds	— —	— +	0,0323 0,0512	2,25 3,57
Cucurbitaceae	Cucumis sativus	nasiona seeds kielki seedlings	— — 6 6	— + — +	0,035 0,105 0,050 0,060	5,30 15,70 9,58 11,56
	Cucumis melo	nasiona seeds kielki seedlings	— — 22 22	— + — +	0,047 0,066 0,106 0,125	8,10 12,60 21,30 25,00
	Cucurbita	nasiona seeds kielki seedlings	— — 8 8	— + — +	0,085 0,092 0,398 0,426	16,20 18,00 nie oznaczano non determined
	Citrullus vulgaris	nasiona seeds kielki seedlings	— — 20 20	— — — +	18,000 21,600 10,340 10,830	954,00 1035,00 553,00 568,00
Salicaceae	Populus berolinensis	pączki buds pączki buds liście leaves liście leaves	31.III.65 8.IV.65 28.IV.65 15.VI.65	— + — + — + — +	— — — — — — 0,0112 0,0112	— — — — — — 2,88 2,88
	Salix	liście leaves	28.VII.65	— +	— —	— —
Tiliaceae	Tilia cordate	pączki buds pączki buds liście leaves	31.III.65 8.IV.65 28.IV.65	— + — + — +	— — — — — —	— — — — — —
Hippocastana- ceae	Aesculus hippocas- tanum	pączki buds pączki buds liście leaves	31.III.65 8.IV.65 28.IV.65	— + — + — +	— — — ślady (traces) „	— — — ślady (traces) „
Graminae	Arrhenatherum elatius	kielki seedlings liście leaves	8 8 — 6.VI.65	— + — +	0,0180 0,0259 0,0093 0,0154	nie oznaczano non determined 1,95 3,27
	Avena	kielki seedlings	8 8	— +	0,2130 0 2130	nie oznaczano non determined

Wykres 1. Aktywność ureazy w okresie rozwoju grochu

Urease activity in growth cycle of green peas

1 — Nadziemna część rośliny (whole plant without roots); 1' — z L-cysteiną (with L-cysteine); 2 — Liście dolne — 3 dolne piętra (lower leaves — 3 lower levels of leaves); 2' — z L-cysteiną (with L-cysteine); 3 — liście górne — 3 górne piętra (top leaves — 3 top levels of a leaves); 3' — z L-cysteiną (with L-cysteine); 4 — kwiaty (flowers); 4' — z L-cysteiną (with L-cysteine); 5 — strąki (pods); 5' — z L-cysteiną (with L-cysteine); 6 — łodyga (stem); 6' — z L-cysteiną (with L-cysteine)

Wykres 2. Aktywność ureazy w okresie rozwoju sałaty

Urease activity in growth cycle of lettuce

1 — liście górne — 3 piętra górne (top leaves — 3 top levels of a leaves); 1' — z L-cysteiną (with L-cysteine); 2 — liście dolne — 3 piętra dolne (lower leaves — 3 lower levels of leaves); 2' — z L-cysteiną (with L-cysteine)

może być również obecność naturalnych inhibitorów tego enzymu w niektórych roślinach. Nie wykryli oni bowiem aktywności ureazy w liściach topoli i stwierdzili, że dodatek ekstraktu z liści topoli do bardzo aktywnego wyciągu z *Canavalia ensiformis* hamuje enzymatyczną hydrolizę mocznika w 100%.

Podobnie w naszych wstępnych badaniach dodatek ekstraktu z nasion sałaty obniżał znacznie aktywność ureazy homogenatów z nasion soi.

Aktywność ureazy w trakcie całego cyklu rozwojowego grochu i sałaty przedstawiają wykresy 1 i 2.

Jak wynika z przytoczonych wykresów aktywność ureazy u obu roślin stwierdzono tylko w pewnych okresach cyklu rozwojowego. W łodygach grochu aktywności ureazy nie wykryto. Znaczny wzrost aktywności następował w okresie kwitnienia (56 dzień) i maksymalną aktywność ureazy stwierdzono w młodych strąkach (70 dzień). W miarę dojrzewania strąków aktywność spadała do punktu zerowego w dojrzających nasionach.

Podobnie u sałaty (wykres 2) aktywność ureazy była najwyższa w chwili tworzenia kwiatostanu (63 dzień), a rośliny w wieku do 63 dni i powyżej 105 dni nie wykazywały aktywności zarówno z dodatkiem, jak i bez cysteiny.

We wcześniejszych badaniach nad innymi enzymami cyklu ornitynowego w okresie ich całego rozwoju, a mianowicie nad karbamoilotransferazą ornitynową (Reifer i inni 1963) i arginazą (Morawska i inni 1963) stwierdzono podobnie jak w niniejszej pracy, że maksymalne aktywności enzymatyczne przypadają na okres kwitnienia i wczesnego tworzenia organów generatywnych.

Streszczenie

1. Badano aktywność ureazy u 49 roślin 30 rodzin botanicznych.
2. Przebadano aktywność ureazy grochu i sałaty w całym ich cyklu rozwojowym, przy czym aktywność enzymu jest najwyższa w okresie tworzenia się narządów generatywnych.

Instytut Biochemii i Biofizyki P.A.N.
Zakład Biochemii Roślin
Warszawa

(Wpłynęło: dn. 13.XI.1965 r.)

SUMMARY

1. Urease activity was determined in 49 species belonging to 30 botanical families.
2. Urease activity was investigated in the whole growth cycle of the green pea and lettuce. In both cases the highest activity was found at the time of formation of generative organs.

Niniejsza praca była częściowo finansowana z funduszy Ministerstwa Rolnictwa USA, Nr umowy FG — Po — 170.

LITERATURA

- Brzeski W., Kaniuga Z., 1957, Ćwiczenia z biochemii roślin, str. 127, PWN.
- Conway E. G., 1947, Microdiffusion Analysis and Volumetric, Error, London.
- Lowry O. H., Rosenbrough N. Y., Farr A. L., Randall R. G., 1951, Protein measurement with the Folin Phenol reagent, J. B. C. 193: 265.
- Morawska G., Kleczkowski K., Reifer I., 1963, Występowanie i aktywność arginazy w roślinach wyższych, Acta Soc. Bot. Pol. 32 (1): 191.
- Nandi D. L., 1958, Studies on the Free Amino Acid Composition and Urease Activity of Some Leguminous Seeds during Germination in Different Organic Nitrogen Media, Naturwiss. 45: 246.
- Reifer I., Kleczkowski K., Klimowicz E., Zielińska K., 1963, Ornithine Carbamylotransferase in Higher Plants, Acta Bioch. Pol. 10 (2): 151.
- Reifer I., Wielgat B., 1964, Further Studies on the Urease Inhibition from Poplar Leaves (*Populus berolinensis*). II, 1964, Bull. Acad. Polon. Sci., Ser. sci. biol. 12 (11): 499.
- Reinbothe H., Mothes K., 1962, Urea, Ureides and Guanidines in Plants, Annual Review of Plant Physiol. 13: 129.
- Paech K., Tracey M. V., 1955, Moderne Methoden der Pflauzenanalyse 4: 119.
- Wielgat B., Morawska-Muszyńska G., Reifer I., 1965, Aktywność arginazy i zawartość argininy w grochu i pszenicy, Acta Soc. Bot. Pol. 34 (2): 205.
- The Enzymes pod red. Boyer P. D., Lardy H., Myrbäck K., 4 (A): 247, Academic Press, New York, 1960.