

Badania i Rozwój Młodych Naukowców w Polsce

Uprawa roślin i ochrona środowiska



www.mlodzinaukowcy.com

Poznań 2019

Redakcja naukowa

dr inż. Jędrzej Nyckowiak, UPP

dr hab. Jacek Leśny prof. UPP

Wydawca

Młodzi Naukowcy

www.mlodzinaukowcy.com

wydawnictwo@mlodzinaukowcy.com

ISBN (całość 978-83-66139-81-7)

ISBN (wydanie online 978-83-66392-48-9)

ISBN (wydanie drukowane 978-83-66392-47-2)

Ilość znaków w książce: 444 tys.

Ilość arkuszy wydawniczych: 11.1

Data wydania: sierpień 2019

Niniejsza pozycja jest monografią naukową. Jej rozdziały zostały wydrukowane zgodnie z przesłanymi tekstami po ich zaakceptowaniu przez recenzentów. Odpowiedzialność za zgodne z prawem wykorzystanie użytych materiałów ponoszą autorzy poszczególnych rozdziałów.

Spis treści

1. Reaktywne formy tlenu – charakterystyka oraz znaczenie dla roślin	7
<i>Borkowska Izabela, Hanaka Agnieszka, Domaciuk Marcin, Wójcik Małgorzata</i>	
2. Kryształy szczawianu wapnia – budowa morfologiczna, występowanie i funkcje w tkankach roślinnych	13
<i>Borkowska Izabela, Domaciuk Marcin, Hanaka Agnieszka, Wójcik Małgorzata</i>	
3. Remediacja chloranów(VII) ze środowiska – problemy i możliwości	21
<i>Kasprzak Kamila, Niziński Przemysław, Krupa Katarzyna, Karolina Wojtunik-Kulesza</i>	
4. Morwa czarna jako superfood- w świetle współczesnych badań naukowych	27
<i>Kasprzak Kamila, Pawlicka Marta, Kupryaniuk Karol, Widelska Gabriela, Oniszczyk Anna</i>	
5. Wpływ techniki ekstruzji na biomasę lignocelulozową	33
<i>Kupryaniuk Karol, Oniszczyk Tomasz, Lisiecka Katarzyna, Kłapsia Sybilla</i>	
6. Surowce lignocelulozowe stosowane w biogazowniach rolniczych	40
<i>Kupryaniuk Karol, Oniszczyk Tomasz, Rodzeń Anna, Kasprzak Kamila</i>	
7. Aeroponic cultivation systems in space application	46
<i>Joanna Kuźma, Anna Jurga</i>	
8. Uprawa i wykorzystanie ziarna owsa	52
<i>Monika Ogórkiewicz, Marcin Różewicz</i>	
9. Udział wybranych cyklofilin we wzroście i rozwoju <i>Arabidopsis thaliana</i>	59
<i>Przemysław Olejnik</i>	
10. Systemy jakości i bezpieczeństwa stosowane w wybranym gospodarstwie rolnym	65
<i>Piwowski Dawid⁽¹⁾, Moczko Joanna</i>	
11. Powstawanie, rozwój i funkcjonowanie pręcików u roślin	76
<i>Przedniczek Krzysztof, Kotarski Dawid, Marciniak Katarzyna</i>	
12. Porównanie wybranych parametrów aktywności wymiany gazowej trzech gatunków z rodzaju <i>Fragaria</i> w uprawie hydroponicznej	83
<i>Rokosa Marta</i>	
13. Wpływ wybranych regulatorów wzrostu na wzrost tkanki kalusowej stewii (<i>Stevia rebaudiana</i> Bert.) w kulturach <i>in vitro</i>	89
<i>Rokosa Marta</i>	
14. Przedstawienie i porównanie metod ochrony sadów czereśniowych w uprawach ekologicznych i w systemie integrowanej ochrony roślin	95
<i>Wojciech Sokołowski</i>	
15. Wykorzystanie grzybów pożytecznych w ochronie drzew przed patogenami w terenach zurbanizowanych – stan obecny i perspektywy rozwoju	103
<i>Wojciech Sokołowski</i>	
16. Aktywność enzymatyczna gleb sąsiadujących z zadrzewieniami przyulicznymi na terenach zurbanizowanych	109
<i>Joanna Trzcńska, Joanna Gmitrowicz-Iwan, Elżbieta Zawierucha</i>	
17. Ryzobakterie promujące wzrost roślin (PGPR)	117
<i>Karolina Włodarczyk</i>	
18. Interakcja symbiotyczna pomiędzy roślinami bobowatymi (Fabaceae), a bakteriami z rodziny <i>Rhizobiaceae</i>	124
<i>Karolina Włodarczyk</i>	

Przedmowa

Szanowni Państwo, wydawnictwo „Młodzi Naukowcy” oddaje do rąk czytelnika kolekcję monografii. Znajdują się tutaj pozycje dotyczące nauk przyrodniczych, nauk medycznych i nauk o zdrowiu, nauk technicznych i inżynierskich oraz szeroko pojętych nauk humanistycznych i społecznych.

W prezentowanych monografiach poruszany jest szeroki przekrój zagadnień, jednak każda z osobna składa się z kilkunastu rozdziałów, spójnych tematycznie, dających jednocześnie bardzo dobry przegląd tematyki naukowej jaką zajmują się studenci studiów doktoranckich lub ich najmłodszy absolwenci, którzy uzyskali już stopień doktora.

Czytelnikom życzymy wielu przemyśleń związanych z tematyką zaprezentowanych prac. Uważamy, że doktoranci i młodzi badacze z pasją i bardzo profesjonalnie podchodzą do swojej pracy, a doświadczenie jakie nabierają publikując prace w monografiach wydawnictwa „Młodzi Naukowcy”, pozwoli im udoskonalać swój warsztat pracy. Dzięki temu, z pewnością wielu autorów niniejszych prac, z czasem zacznie publikować prace naukowe w prestiżowych czasopismach. Przyczyni się to zarówno do rozwoju nauki, jak i każdego autora, budując jego potencjał naukowy i osobisty.

Redakcja

1. Reaktywne formy tlenu – charakterystyka oraz znaczenie dla roślin

Reactive oxygen species - characteristics and role in plants

Borkowska Izabela⁽¹⁾, Hanaka Agnieszka⁽¹⁾, Domaciuk Marcin⁽²⁾, Wójcik Małgorzata⁽¹⁾

⁽¹⁾ Zakład Fizjologii Roślin; Wydział **Biologii i Biotechnologii**; Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin

⁽²⁾ Zakład Anatomii i Cytologii Roślin; Wydział **Biologii i Biotechnologii**; Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin

Opiekun naukowy: Małgorzata Wójcik

Borkowska Izabela: izabelaborkowska4@gmail.com

Słowa kluczowe: stres oksydacyjny, rośliny, enzymy antyoksydacyjne

Streszczenie

Wszystkie organizmy żywe narażone są na działanie reaktywnych form tlenu (ROS, *ang. reactive oxygen species*). W organizmach roślinnych powstają one w warunkach fizjologicznych, m.in. podczas przepływu elektronów w fotosyntezie i oddychaniu. Liczne czynniki biotyczne i abiotyczne, takie jak: patogeny, susza, zasolenie, metale ciężkie, promieniowanie UV, powodują wzmożone generowanie ROS. Reaktywne formy tlenu mogą wchodzić w reakcje ze związkami budującymi strukturę komórkową, zaburzać przebieg procesów metabolicznych, doprowadzając nawet do śmierci komórki. Z tego względu ROS, jako toksyczne dla komórki, są usuwane przez szereg komórkowych mechanizmów antyoksydacyjnych, zarówno enzymatycznych, jak i nieenzymatycznych. Natomiast nadmiar ROS powoduje, że obecne w komórkach mechanizmy antyoksydacyjne nie są w stanie obniżyć ich zawartości do bezpiecznego dla komórki poziomu. Dochodzi wówczas do stresu oksydacyjnego. Ostatnio coraz częściej rozpatrywana jest pozytywna rola ROS w komórkach roślinnych. Postuluje się ich udział w procesach rozwojowych, w szlakach transdukcji sygnału, w ochronie komórek przed atakiem patogenów, modyfikacji ścian komórkowych oraz w rozluźnianiu ich struktury, co ułatwia wzrost komórkom.

1. Wstęp

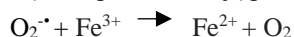
Tlen cząsteczkowy (O_2) jest utleniaczem: reagując ze związkami organicznymi, utlenia je, pobierając od nich elektrony, a sam ulega redukcji. Całkowita redukcja O_2 oznacza przyłączenie 4 protonów i 4 elektronów w wyniku czego powstają 2 cząsteczki H_2O . Cząsteczka tlenu nie zawsze ulega pełnej, czteroelektronowej redukcji. Niepełna redukcja tlenu prowadzi do powstawania reaktywnych form tlenu (ROS). Podstawowymi reaktywnymi formami tlenu są: tlen singletowy (1O_2), anionorodnik ponadtlenkowy ($O_2^{\cdot-}$), rodnik hydroksylowy (OH^{\cdot}), rodnik nadtlenkowy (ROO^{\cdot}), nadtlenek wodoru (H_2O_2). Cząsteczki te są wysoce reaktywne i mogą prowadzić do oksydacyjnego niszczenia komórki (Takagi i in. 2016). Stres oksydacyjny jest stanem nierównowagi pomiędzy reakcjami prowadzącymi do generacji ROS, a reakcjami związanymi z ich usuwaniem. Stan ten może być niespecyficzną odpowiedzią tkanek roślinnych na różne czynniki stresowe: stres osmotyczny, deficyt wody, stres solny, niedobór mikro- lub makroelementów, zbyt niska lub wysoka temperatura, atak patogenów lub roślinożerców, uszkodzenia mechaniczne, zranienia, promieniowanie UV, nadmiar promieniowania fotosyntetycznie czynnego, działanie zanieczyszczeń atmosferycznych (SO_2 , NO , NO_2 , O_3), jonów metali, herbicydów. Reaktywne formy tlenu powstają także podczas naturalnych procesów fizjologicznych (tworzenie brodawek na korzeniach roślin motylkowatych, lignifikacja czy starzenie się komórek). Ochrona przed niekorzystnym działaniem ROS polega na uruchomieniu komórkowego systemu antyoksydacyjnego: nieenzymatycznego (m.in. askorbinianu, glutationu, karotenoidów, flawonoidów) i enzymatycznego (m. in. dysmutaz, peroksydaz, katalaz) (Szymańska i Strzałka 2010).

W ostatnich latach zidentyfikowano nową rolę ROS, polegającą na kontroli i regulacji procesów biologicznych, takich jak wzrost i rozwój, cykl komórkowy, programowana śmierć

komórki, reakcje na biotyczne i abiotyczne czynniki stresowe. Badania te poszerzają naszą wiedzę na temat generacji ROS i sugerują podwójną rolę tych cząsteczek w biologii roślin (Foyer i Noctor 2016).

2. Charakterystyka reaktywnych form tlenu

Wszystkie ROS mają swoje własne unikalne właściwości chemiczne i poziom reaktywności. Cząsteczka OH^\bullet jest najbardziej niestabilną formą ROS o okresie półtrwania wynoszący zaledwie 1 ns i szybko reaguje z różnymi składnikami komórek (np. lipidami, DNA, węglowodanami, białkami). Cząsteczki $\text{O}_2^{\bullet -}$ i $^1\text{O}_2$ są dość podobne pod względem stabilności, z okresem półtrwania 1 μs . Niemniej jednak różnią się one znacznie pod względem działania. Podczas gdy $\text{O}_2^{\bullet -}$ reaguje głównie z centrum żelazowo-siarkowym (Fe-S) białek, $^1\text{O}_2$ może utleniać wielonienasycone kwasy tłuszczowe, guaninę oraz pewne aminokwasy (np. histydynę, metioninę i tryptofan). Natomiast H_2O_2 jest o wiele bardziej stabilny (okres półtrwania równy 1 ms) i może się kumulować w stosunkowo wysokich stężeniach, utleniając grupy tiolowe (-SH) lub jony metali przejściowych (np. Cu^+ do Cu^{2+} , Fe^{2+} do Fe^{3+}). Utlenianie jonów metali przejściowych prowadzi do powstawania OH^\bullet (Mignolet-Spruyt i in. 2016). Schemat reakcji Fentona, w czasie której Fe^{2+} jest utleniany do Fe^{3+} oraz wytwarza się OH^\bullet przedstawiają poniższe równania (Dietz i in. 2016):



Wzrost stężenia ROS w komórce może skutkować oksydacyjnym uszkodzeniem błon (peroksydacja lipidów poprzez reakcję ROS z nienasyconymi kwasami tłuszczowymi), białek (modyfikacja aminokwasów, fragmentacja łańcuchów polipeptydowych), cząsteczek RNA i DNA (utlenianie zasad azotowych, uszkodzenia reszt cukrowych), doprowadzając do oksydacyjnego zniszczenia komórki w procesie nazywanym stresem oksydacyjnym (Mittler i in. 2004). Jednym z następstw stresu oksydacyjnego jest zahamowanie oddychania i obniżenie poziomu ATP. W komórkach roślinnych ROS hamują również fotosyntezę. Najbardziej wrażliwymi enzymami na działanie ROS są enzymy fazy ciemnej fotosyntezy, zawierające grupy tiolowe. Stres oksydacyjny wpływa również na przepuszczalność błon, powodując obniżenie różnicy potencjału elektrycznego pomiędzy wnętrzem komórki a środowiskiem zewnętrznym. Cząsteczki ROS uszkadzając składniki DNA, prowadzą do powstawania mutacji, np. wskutek niewłaściwego parowania zmodyfikowanych zasad podczas replikacji (Bartosz 1995).

3. Produkcja reaktywnych form tlenu w komórkach

Głównymi miejscami wytwarzania cząsteczek ROS w komórce roślinnej są: chloroplasty, mitochondria, peroksyzomy, błony komórkowe oraz apoplast.

Znajdująca się w chloroplastie błona tylakoidu jest miejscem przepływu elektronów przez łańcuch fotosyntetyczny. Zawarte są w niej dwa kompleksy białkowo-barwnikowe – fotosystem I (PSI) oraz fotosystem II (PSII), a także cytochrom b_6/f i syntaza ATP. W transporcie elektronów biorą udział również ruchome przENOŚniki w postaci plastochinonu i plastocyjaniny. Barwniki fotosyntetyczne znajdują się w kompleksach zbierających światło (LHC, *ang.* *light-harvesting complex*), a także w kompleksach anten pomocniczych i rdzeniowych. W obrębie PSII, na skutek fotolizy wody wytwarzany jest O_2 . Po stronie donorowej (w warunkach utleniających) i akceptorowej (w warunkach redukujących) w PSII, w wyniku redukcji O_2 , generowane są cząsteczki: $\text{O}_2^{\bullet -}$, H_2O_2 , OH^\bullet (Gilroy i in. 2016). Redukcję O_2 mogą przeprowadzać przENOŚniki elektronów, takie jak feofityna oraz pierwotny chinonowy akceptor elektronów (Q_A). Po stronie akceptorowej PSII w wyniku dysmutacji $\text{O}_2^{\bullet -}$ powstaje H_2O_2 . Następnie w reakcji reakcji Fentona, katalizowanej przez Cu^+ , Fe^{2+} lub Mn^{2+} z cząsteczką H_2O_2 generowana jest cząsteczka OH^\bullet . Fotoukład II i LHClI są miejscami wytwarzania $^1\text{O}_2$, który może prowadzić do degradacji białka D1 (zlokalizowanego w centrum PSII). W fotoukładzie I zachodzi reakcja Mehlera, polegająca na redukcji tlenu cząsteczkowego do $\text{O}_2^{\bullet -}$, przy udziale reduktazy monodehydroaskorbinianowej (MDHAR). W produkcji cząsteczki $\text{O}_2^{\bullet -}$ biorą

udział centra żelazowo-siarkowe (Fe-S) oraz witamina K, będąca składnikiem PSI. Cząsteczka $O_2^{\cdot -}$ może redukować formę cytochromu *f* oraz plastocyaninę. Z cząsteczki $O_2^{\cdot -}$, przy udziale CuZn-dysmutazy ponadtlenkowej (w obecności jonów metali przejściowych, np. Fe^{2+}) wytwarzany jest H_2O_2 , co prowadzi do produkcji OH^{\cdot} (Szymańska i Strzałka 2010).

Źródłem ROS w komórce roślinnej jest również mitochondrialny łańcuch transportu elektronów. Jednak ze względu na obecność alternatywnej oksydazy (AOX), udział mitochondrium w ogólnej puli wytwarzania ROS jest niewielki. AOX ogranicza produkcję ROS poprzez tworzenie bocznego odgałęzienia szlaku cytochromowego, przenosząc elektrony z ubichinolu wprost na tlen (Rucińska-Sobkowiak 2010).

W peroksysomach komórek roślinnych przebiegają reakcje procesu fotooddychania, podczas których generowany jest H_2O_2 . Cząsteczka H_2O_2 może powstawać w peroksysomach także jako produkt uboczny β -oksydacji kwasów tłuszczowych. W błonie peroksysomów występuje krótki łańcuch transportu elektronów złożony z flawoproteiny – reduktazy NADPH oraz cytochromu. W wyniku działania tego łańcucha na zewnętrznej, cytoplazmatycznej stronie peroksysomów wytwarzany jest $O_2^{\cdot -}$. Produkcja $O_2^{\cdot -}$ powoduje obniżenie aktywności katalazy, co skutkuje wzrostem stężenia H_2O_2 (Gilroy i in. 2016).

Reaktywne formy tlenu są wytwarzane także w apopląście przez oksydazy NADPH (określane jako homologii oksydazy wybuchu oddechowego RBOH, *ang. respiratory burst NADPH oxidases*) (Vaahtera i in. 2014). Produkcja ROS w roślinach jest większa w warunkach ograniczających przyswajanie CO_2 , np. podczas stresu suszy, zasolenia, wysokiej temperatury, także przez połączenie tych czynników stresowych z dużym stresem świetlnym (Mignolet-Spruyt i in. 2016).

3.1 Mechanizmy obrony przed reaktywnymi formami tlenu

Większość biotycznych i abiotycznych czynników stresowych zakłóca metabolizm komórek, co skutkuje zwiększoną produkcją ROS (Mittler i in. 2004). W komórkach roślinnych proces neutralizowania ROS jest regulowany przez szereg enzymów antyoksydacyjnych, np. dysmutazę ponadtlenującą (SOD), peroksydazę askorbinianową (APX), katalazę (CAT), peroksydazę glutationową (GPX), reduktazę monodehydroaskorbinianową (MDHAR), reduktazę dehydroaskorbinianową (DHAR), reduktazę glutationową (GR), jak również przez nieenzymatyczne przeciwutleniacze, takie jak askorbinian i glutation (GSH), które występują prawie we wszystkich przedziałach komórkowych. W tabeli 1 zostały przedstawione przykłady enzymów antyoksydacyjnych aktywowanych w odpowiedzi na działanie czynników stresowych w różnych gatunkach roślin (Mittler i in. 2011).

Dysmutaza ponadtlenująca jest enzymem katalizującym reakcję przekształcenia dwóch cząsteczek $O_2^{\cdot -}$ do H_2O_2 i O_2 . Odmiennie izoformy SOD mogą występować w różnych częściach komórki, np.: w matriksie mitochondrium, peroksysomach i glioksysomach – MnSOD (tetramer, zawierający mangan w centrum aktywnym, złożony z czterech podjednostek o masie cząsteczkowej około 20 kDa); w stromie chloroplastów, mitochondriach, apopląście i cytozolu – Cu/ZnSOD (homodimer zawierający miedź i cynk w centrum aktywnym, złożony z dwóch podjednostek o masie cząsteczkowej około 16 kDa) oraz izoforma zawierająca żelazo – FeSOD w chloroplastach i peroksysomach (Huang i in. 2016). **Peroksydaza askorbinianowa** jest peroksydazą specyficzną względem askorbinianu jako donora elektronów. Enzym ten jest hemoproteiną i występuje w chloroplastach oraz cytoplazmie. **Katalaza** katalizuje reakcję dysproporcjonowania H_2O_2 , posiadając również właściwości peroksydazowe.

Przeciwutleniaczami (antyoksydantami) nazywane są substancje, które w niskich stężeniach, w porównaniu z substancją ulegającą utlenianiu, hamują bądź opóźniają utlenienie tej substancji. Należy do nich **glutation** (γ -glutamilo-cysteinylo-glicyna, GSH), który dzięki grupie tiolowej cysteiny łatwo reaguje z wolnymi rodnikami, inaktywując je i tworząc wolny rodnik glutationu, przekształcany do utlenionego glutationu (GSSG). Silnym przeciwutleniaczem jest również **askorbinian** (AsA), który wykazuje reaktywność wobec $O_2^{\cdot -}$, H_2O_2 , OH^{\cdot} i 1O_2 . Współdziała on z GSH w neutralizacji H_2O_2 w cyklu glutationowo-askorbinianowym, zlokalizowanym w cytozolu

i mitochondriach (Mittler i in. 2004). Skutecznymi antyoksydantami nieenzymatycznymi, występującymi w roślinach są również flawonoidy i karotenoidy (Bartosz 1995).

Tab. 1. Aktywacja enzymów antyoksydacyjnych w różnych gatunkach roślin w odpowiedzi na działanie czynników stresowych (zmodyfikowano wg Sharma i in. 2012)

Rodzaj stresu	Enzymy antyoksydacyjne	Gatunek rośliny
Susza	SOD, GPX, APX, MDHAR, DHAR	<i>Oryza sativa</i>
	SOD, CAT, GPX	<i>Beta vulgaris</i>
	SOD, APX, GR	<i>Triticum sativum</i>
Zasolenie	CAT, SOD, GR	<i>Olea europaea</i>
	GPX	<i>Oryza sativa</i>
Mród	APX, MDHAR, DHAR, GR, SOD	<i>Zea mays</i> , <i>Fragaria x ananassa</i>
Metale		
Al	SOD, GPX, APX	<i>Oryza sativa</i> , <i>Glycine max</i>
Ni	SOD, GPX, APX	<i>Oryza sativa</i>
As	SOD, GPX, APX	<i>Oryza sativa</i>
Mn	SOD, GPX, APX	<i>Oryza sativa</i>
UV	SOD, GPX, APX, CAT GPX, APX	<i>Picea asperata</i> , <i>Arabidopsis thaliana</i>
Patogen <i>Oidium lini</i>	GPX, CAT	<i>Linum usitatissimum</i>
Wirus żółtej mozaiki fasoli	POD, CAT, APX, SOD	<i>Vicia faba</i>

Stosowane skróty: APX – peroksydaza askorbinianowa; CAT – katalaza; DHAR – reduktaza dehydroaskorbinianowa; GPX – peroksydaza glutationowa; GR – reduktaza glutationowa; MDHAR - reduktaza monodehydroaskorbinianowa; POD – peroksydaza; SOD – dysmutaza ponadtlenkowa.

4. Przykłady funkcji reaktywnych form tlenu w roślinach

Ciągły proces produkcji i usuwania ROS zachodzi we wszystkich komórkach i jest kontrolowany na poziomie genów (Mittler i in. 2004). Reaktywne formy tlenu pełnią rolę sygnałów w komórce roślinnej poprzez aktywację czynników transkrypcyjnych, receptorów białkowych i bezpośrednie hamowanie fosfatyzacji (Choudhury 2017; Le i in. 2016; Pesaresi i in. 2009). W momencie działania czynników stresowych na komórki, często dochodzi do zaburzenia metabolizmu i wzrostu stężenia ROS na skutek niewystarczającej aktywności elementów systemu antyoksydacyjnego. Dochodzi wtedy do uruchomienia mechanizmów sygnałowych odpowiadających za inicjację odpowiedzi związanej z aklimatyzacją komórek do zmienionych warunków (Choudhury i in. 2017; Tian i in. 2016).

W odpowiedzi na stres wodny, wysokiej temperatury czy zasolenia w komórkach roślinnych akumuluje się kwas abscysynowy (ABA). Reaktywne formy tlenu pośredniczą w indukowanym ABA zamykaniu aparatów szparkowych, poprzez aktywację kanałów wapniowych w błonie komórkowej. Wysokiemu stężeniu ROS w apoplazmie przeciwdziała Cu/ZnSOD, APX, związane ze ścianą komórkową peroksydazy oraz niski poziom askorbinianu i glutationu. Jednak te apoplastyczne

mechanizmy usuwające ROS nie są takie skuteczne jak systemy wewnątrzkomórkowe (Noctor i Foyer 2016).

Reaktywne formy tlenu odgrywają kluczową rolę w obronie roślin przed atakiem patogenów (Mittler i in. 2004). Wysoka zawartość H_2O_2 jest toksyczna dla patogenów oraz komórek roślinnych, które zostały zainfekowane. W miejscu zranienia (wnikania patogenu) następuje gwałtowna produkcja H_2O_2 (tzw. wybuch tlenowy), który nie tylko zabija patogen, ale powoduje również zamieranie komórki roślinnej na skutek programowanej śmierci komórki (tzw. reakcja nadwrażliwości), co ogranicza rozprzestrzenianie się patogenu (O'Brien i in. 2012). Część cząsteczka ta jest również wykorzystywana jako substrat w reakcjach tworzenia ligniny, przez co wzmocnieniu i usztywnieniu ulega ściana komórkowa, utrudniając wnikanie patogenu do wnętrza rośliny.

Produkowany przez oksydazę NADPH O_2^{\cdot} bierze udział w regulacji wydłużania się korzeni. Procesem kontrolowanego utleniania jest również dojrzewanie i starzenie się owoców. W czasie dojrzewania owoców zmniejsza się zawartość grup tiolowych i wzrasta zawartość H_2O_2 i nadtlenków lipidów. Nadtlenki lipidów oraz produkty ich degradacji są wytwarzane po zranieniu tkanki roślinnej. Mają one charakterystyczny zapach i pełnią istotną rolę ochronną przed grzybami i bakteriami wnikającymi w miejsce zranienia (Bartosz 1995).

5. Podsumowanie

Reakcje roślin na czynniki stresowe są bardzo złożone i obejmują zmiany na poziomie komórkowym i fizjologicznym. Jednym z przejawów działania czynników stresowych jest powstanie ROS. Reagują one ze składnikami komórek, modyfikując je i uszkadzając, a nawet doprowadzając do śmierci komórki. Ponieważ wysoki poziom ROS jest szkodliwy dla komórek, rośliny wykształciły odpowiednie mechanizmy obronne (enzymy antyoksydacyjne, nieenzymatyczne antyutleniacze). Jednak reaktywne formy tlenu są nie tylko toksycznymi produktami ubocznymi metabolizmu tlenowego, ale również są wykorzystywane jako przekaźniki sygnałów w procesach fizjologicznych i pełnią rolę m.in. w obronie przed patogenami.

6. Literatura

- Bartosz G (1995) *Druga twarz tlenu*. Wydawnictwo Naukowe PWN. Warszawa
- Choudhury FK, Rivero MR, Blumwald E, Mittler R (2017) Reactive oxygen species, abiotic stress and stress combination. *Plant J.* 90: 856-867.
- Dietz KJ, Turkan I, Krieger-Liszkay A (2016) Redox- and reactive oxygen species-dependent signaling in and from the photosynthesizing chloroplast. *Plant Physiol.* 171, 1541-1550.
- Foyer CH, Noctor G (2016) Stress-triggered redox signalling: what's in pROSpect? *Plant, Cell Environ.* 39, 951-964.
- Gilroy S, Bialasek M, Suzuki N, Gorecka M, Devireddy A, Karpinski S, Mittler R (2016) ROS, calcium and electric signals: key mediators of rapid systemic signaling in plants. *Plant Physiol.* 171, 1606-1615.
- Huang S, Van Aken O, Schwarzländer M, Belt K, Millar A (2016) The roles of mitochondrial reactive oxygen species in cellular signaling and stress responses in plants. *Plant Physiol.* 171, 1551-1559.
- Le C, Brumbarova T, Ivanov R, Stoof C, Weber E, Mohrbacher J, Fink-Straube C, Bauer P (2016) Zinc finger of Arabidopsis thaliana 12 (ZAT12) interacts with fer- like iron deficiency induced transcription factor (FIT) linking iron deficiency and oxidative stress responses. *Plant Physiol.* 170, 540-557.
- Mignolet-Spruyt L, Xu E, Idanheimo N, Hoerberichts FA, Muhlenbock P, Brosche M, Van Breusegem F, Kangasjarvi J (2016) Spreading the news: subcellular and organellar reactive oxygen species production and signalling. *J. Exp. Bot.* 67, 3831-3844.
- Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Van Breusegem F (2004) Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci.* 9, 490-498.
- Mittler R, Vanderauwera S, Suzuki N, Miller G, Tognett V.B, Vandepoele K, Gollery M, Shulaev V, Van Breusegem F (2011) ROS signaling: the new wave? *Trends Plant Sci.* 16, 300-309.

- Noctor G, Foyer CH (2016) Intracellular redox compartmentation and ROS-related communication in regulation and signaling. *Plant Physiol.* 171, 1581-1592.
- O'Brien JA, Daudi A, Finch P, Butt VS, Whitelegge JP, Souda P, Ausubel FM, Bolwell GP (2012) A peroxidase-dependent apoplastic oxidative burst in cultured *Arabidopsis* cells functions in MAMP-elicited defense. *Plant Physiol.* 158, 2013-2027.
- Pesaresi P, Hertle A, Pribil M (2009) *Arabidopsis* STN7 kinase provides a link between short- and long-term photosynthetic acclimation. *Plant Cell.* 21, 2402-2423.
- Rucińska-Sobkowiak R (2010) Stres oksydacyjny wywołany działaniem metali ciężkich na rośliny. *Postępy Biochemii.* 56, 191-200.
- Sharma P, Jha AB, Shanker Dubey R, Pessarakli M (2012) Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *J Bot.* ID 217037.
- Szymańska R, Strzałka K (2010) Reaktywne formy tlenu w roślinach – powstawanie, dezaktywacja i rola w przekazywaniu sygnału. *Postępy Biochemii.* 56, 182-190.
- Takagi D, Takumi S, Hashiguchi M, Sejima T, Miyake C (2016) Superoxide and singlet oxygen produced within the thylakoid membranes both cause photosystem I photoinhibition. *Plant Physiol.* 171, 1626-1634.
- Tian S, Wang XLiP, Wang HJiH, Xie J, Qiu Q, Shen D, Dong H (2016) Plant aquaporin AtPIP1;4 links apoplastic H₂O₂ induction to disease immunity pathways. *Plant Physiol.* 171, 1635-1650.
- Vaahtera L, Brosche M, Wrzaczek M, Kangasjarvi J (2014) Specificity in ROS signaling and transcript signatures. *Antioxid. Redox Signal.* 21, 1422-1441.

2. Kryształy szczawianu wapnia – budowa morfologiczna, występowanie i funkcje w tkankach roślinnych

Morphological diversity, occurrence and role of calcium oxalate crystals present in plant tissues

Borkowska Izabela⁽¹⁾, Domaciuk Marcin⁽²⁾, Hanaka Agnieszka⁽¹⁾, Wójcik Małgorzata⁽¹⁾

⁽¹⁾Zakład Fizjologii Roślin; Wydział Biologii i Biotechnologii; Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin

⁽²⁾Zakład Anatomii i Cytologii Roślin; Wydział Biologii i Biotechnologii; Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin

Opiekun naukowy: Małgorzata Wójcik

Borkowska Izabela: izabelaborkowska4@gmail.com

Słowa kluczowe: biokryształizacja, idioplast, szczawian wapnia

Streszczenie

W komórkach roślinnych, na drodze biokryształizacji tworzone są kryształy różnych związków, przyjmujące wielorakie kształty. Najczęściej są to kryształy szczawianu wapnia, które mogą stanowić więcej niż 85% suchej masy organów roślinnych. Zostały one odkryte przez Leeuwenhoka w XVII wieku i udokumentowane za pomocą mikroskopii świetlnej (LM – ang. *light microscope*) oraz bardziej szczegółowo za pomocą spektroskopii w podczerwieni i mikroskopii elektronowej, zarówno skaningowej (SEM – ang. *scanning electron microscope*), jak i transmisyjnej (TEM – ang. *transmission electron microscope*). Obecność kryształów szczawianu wapnia jest powszechna u wielu gatunków roślin, w tym glonów, nagozależkowych i okrytozależkowych. Ze względu na kształt kryształy te można podzielić na jedyńce, styloidy, rafidy, druzy i piasek krystaliczny. Często występują one w wakuoli kryształonośnych idioplastów, wyspecjalizowanych komórek, które stanowią mniej niż 1-2% wszystkich komórek, w których akumulowany jest wapń. Funkcje kryształów obejmują regulację homeostazy wapnia, ochronę roślin przed roślinożercami, detoksyfikację metali, przywracanie równowagi jonowej, nadawanie sztywności roślinom. Enzymem, który może rozkładać szczawian wapnia na dwutlenek węgla (CO₂) i nadtlenek wodoru (H₂O₂) jest oksydaza szczawianowa (OXO). Wysoki poziom H₂O₂ jako kluczowego induktora dla różnych rodzajów programowanej śmierci komórek (PCD – ang. *programmed cell death*) może sprzyjać powstawaniu aerenchymy.

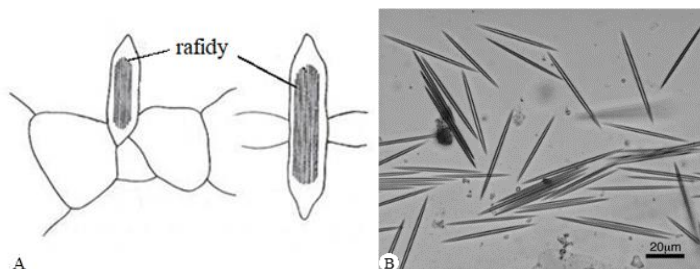
1. Tworzenie kryształów

Wytwarzanie kryształów szczawianu wapnia przez rośliny jest procesem zaliczanym do biokryształizacji. Kryształy te powstają w wakuolarnych strukturach błonowych, nazywanych często wewnątrz-wakuolarnymi komorami błonowymi (ang. *intravacuolar membrane chambers*), występującymi w wyspecjalizowanych komórkach (idioplastach). Kryształy mogą być tworzone również w szeregach wydłużonych komórek zawierających znaczne ilości śluzu i przebiegających w pobliżu wiązek przewodzących roślin (tzw. kanały śluzowe) (Saltz in. 2000). Proces powstawania kryształów szczawianu wapnia w roślinach nie jest do końca poznany. Horner i in. (2000) wykazali, że szlak biosyntezy szczawianu wykorzystuje askorbinian jako prekursor, a Nakata (2003) odkrył, że askorbinian jest wytwarzany bezpośrednio w samym idioplaście kryształonośnym. Tworzenie kryształów, jest indukowane przez szereg zmian na poziomie subkomórkowym, takich jak zmiany w jądrowym DNA, retikulum endoplazmatycznym, białkach kwasowych i składnikach cytoszkieletu (Nakata 2003).

2. Podział kryształów szczawianu wapnia ze względu na budowę morfologiczną

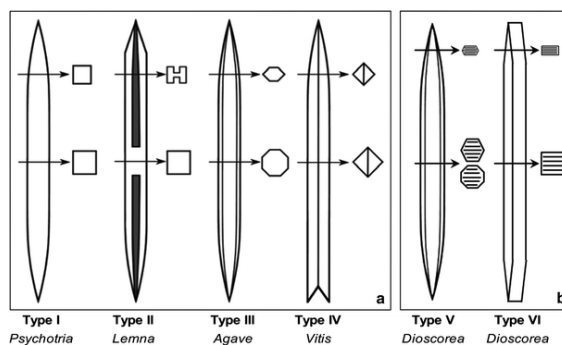
2.1 Rafidy

Rafidy są to igiełkowate kryształy szczawianu wapnia, zidentyfikowane u przedstawicieli z ponad 200 rodzin botanicznych. Kryształy te mają około 50 μm długości oraz około 850-250 nm szerokości w przekroju i są powszechnie spotykane w *Alocasia* (alokazja), *Colocasia* (kolokazja), *Pistia* (pistia rozetkowa). Mogą występować w postaci wiązek lub jako pojedyncze igły (Rys. 1) (Franceschi i Nakata 2005).



Rys. 1. Morfologia rafidów A) Wiązka rafidów B) Rafidy zaobserwowane w *Cordyline terminalis* (kordyliina krzewiasta), TEM (Crowther 2009).

Do tej pory w roślinach odnotowano sześć rodzajów rafidów w kształcie igieł (Rys. 2).



Rys. 2. Rodzaje rafidów a) przekroje podłużne i poprzeczne typów 1-4 (Crowther 2009) b) Typy V i VI zaobserwowane w liściach *Dioscorea polystachya* (pochrzyn chiński) (Raman 2014).

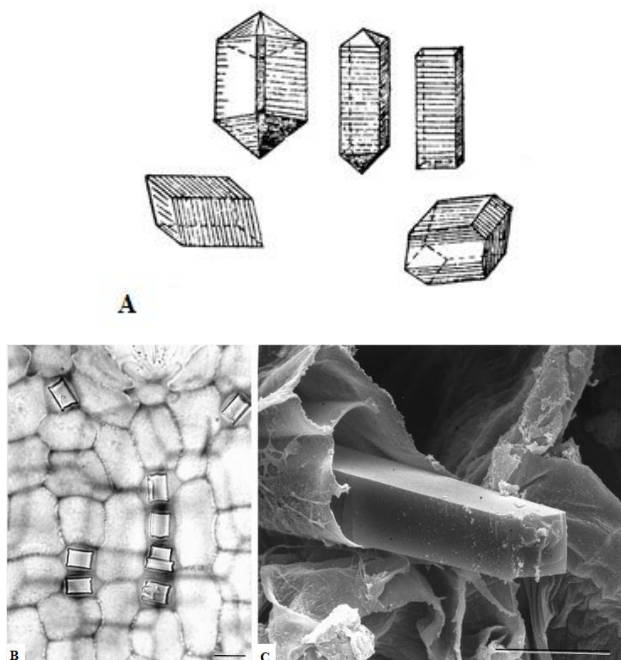
Rafidy typu I z rodzaju *Psychotria* (chacruna) posiadają czworoboczne przekroje na całej długości, typ II z rodzaju *Lemna* (rzęsa) cechuje czworoboczny przekrój poprzeczny w części centralnej oraz przekroje w kształcie litery H na końcach. Typ III spotykany u *Agave* (agawa) jest ośmioboczny w przekroju centralnym, a sześcioboczny w przekroju jego końców. Typ IV charakterystyczny dla *Vitis* (winorośl) posiada w przekroju poprzecznym dwa trójkąty równoramienne stykające się ze sobą podstawą, przekrojem przypominając romb. Typ V i VI zidentyfikowane u *Dioscorea* (pochrzyn) charakteryzują się poprzecznymi liniami występującymi na przekrojach. Powstały poprzez dobudowywanie kolejnych wąskich płytek, ułożonych względem siebie równolegle. Typ V ma sześcioboczny lub ośmioboczny przekrój centralny i sześcioboczny przekrój na końcach. Typ VI echuje czworoboczny, prostokątny przekrój poprzeczny na całej swojej długości (Raman 2014).

Rafidy mogą występować w aerenchymie lub włoskach roślinnych, najczęściej w wakuoli komórek, a także w połączeniu z błonami. Obecność rafidów najprawdopodobniej związana jest

z mechanizmem obronnym przeciwko roślinożercom. Wykazano także obecność rafidów w komórkach wytwarzających toksyny, bowiem kształt kryształów ułatwia uszkodzenie skóry i wniknięcie substancji trujących. Sugerowano również, że niektóre rafidy mogą pomóc w tworzeniu struktury szkieletowej rośliny (Horner i in. 2012)

2.2 Styloidy

Kryształy styloidowe, znane również jako pseudorafidy, są zazwyczaj wydłużone, tworzące prostokątne kolumny. W komórkach roślinnych występują jako pojedyncze kryształy lub mogą tworzyć kryształy bliźniacze. Styloidy cechuje obecność spiczastych lub kwadratowych końców, a w niektórych kryształach mogą być one zadaszone przez dwa pryzmaty (Meric 2009) (Rys. 3).



Rys. 3. Morfologia styloidów: A) Typy styloidów [dostęp: <http://www.ghb.cz/view.php?navezclanku=pozvanka-do-mikrosveta&cislocianku=2015110002>]; B) Styloidy zaobserwowane u *Freycinetia javanica* (pandanowate) skala = 10 μm , LM (Prychid i in. 2003); C) Styloidy u *Chlorophytum comosum* (zielistka czubiasta) skala = 100 μm , SEM (Prychid i in. 2003)

Kryształy styloidowe są charakterystyczne dla niektórych roślin z rodzin *Asparagaceae* (szparagowce), w tym *Agavaceae* (agawowe), *Alliaceae* (czosnkowe), *Convallariaceae* (konwaliowate), *Asphodelaceae* (złotogłowowe), *Iridaceae* (kosaćcowate) (Prychid i in. 2003).

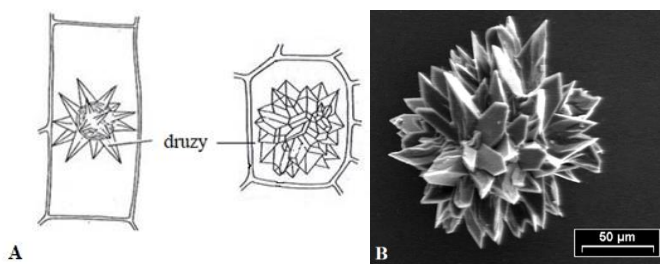
2.3 Druzy

Druzy charakteryzują się największą złożonością pod względem budowy morfologicznej. Nazywane często kulistymi rafidami, tworzą kryształy wieloskładnikowe na drodze krystalizacji, przebiegającej wokół miejsca zarodkowania kryształu. Zbudowane są zarówno z mono- jak i dihydratu szczawianu wapnia, a w ich skład wchodzi struktury analogiczne do rafidów i styloidów (także kryształy bliźniacze). Na ich powierzchni widoczne są charakterystyczne kolce, wystające z głównej masy kryształu (Braissant i in. 2004) (Rys. 4).

Druzy można spotkać w liściach i łuskach pączków *Prunus* (śliwa), *Rosa* (róża), *Allium* (czosnek), *Vitis* (winorośl), *Morus* (morwa) i *Phaseolus* (fasola) (Monje i Baran 2002).

Jedyńce mają postać pryzmatów lub romboedrów, występują u roślin z rodziny *Fabaceae* (bobowate). Piasek krystaliczny to zbiór wielu drobnych kryształów, luźno ułożonych względem

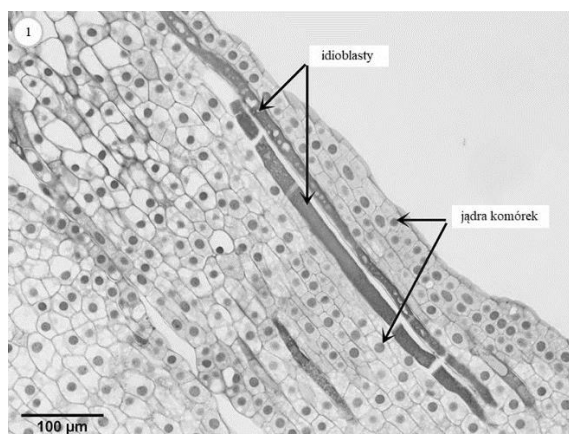
siebie, wypełniają prawie całą komórkę, spotykany m.in. u Apocynaceae (toinowate) (Monje i Baran 2002).



Rys. 4. Morfologia druzów A) Typy druzów B) Druzy zaobserwowane w *Opuntia aurantiaca* (kaktusowate), SEM (Monje i Baran 2002)

3. Krysztalonośne idioblasty są strukturalnie wyspecjalizowane w akumulacji wapnia

Kryształy powstają w wakuolach komórek lub idioblastów (pojedynczych komórek o strukturze lub zawartości odmiennej od otaczających komórek), które są rozproszone w komórkach miękiszowych liści (Rys. 5). Idioblasty pełnią różne funkcje, do których należy: przechowywanie substancji wydzielanych, barwników i minerałów. Mogą zawierać substancje olejiste, taniny, kryształy szczawianu wapnia lub krzemionkę. Po uszkodzeniu komórki idioblastu, kryształy lub inna substancja jest wyrzucana przez wewnętrzne ciśnienie wody (Lersten i Horner 2011).



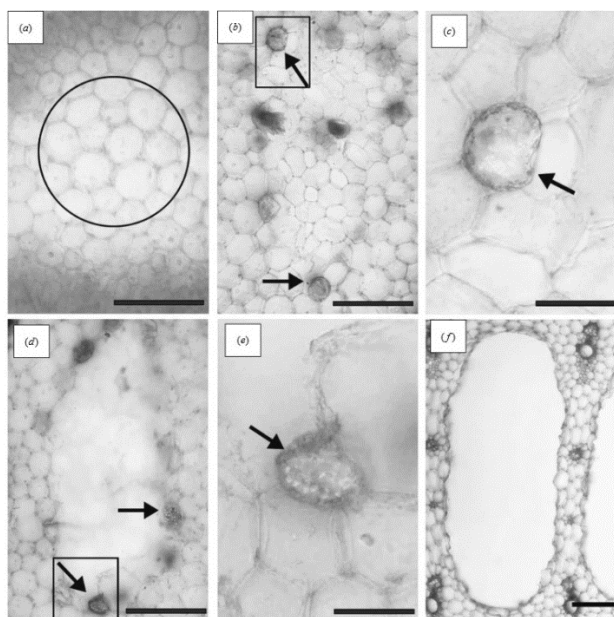
Rys. 5. Idioblasty w komórkach miękiszowych liści [dostęp: <http://www.ueb.cas.cz/cs/content/zarodky-smrku-v-prouzkovanem-pyzamu>]

Idioblasty produkujące kryształy szczawianu wapnia charakteryzują się obecnością dużego jądra, plastydów, rozbudowanego retikulum endoplazmatycznego (RE), wysokim poziomem rRNA oraz posiadają unikalne komponenty wakuoli. Wzrost i kształt kryształu jest zależny od wewnątrz wakuolarniej matrycy, którą określono jako jamę krystaliczną (Hardy i Stevenson 2000). Prawdopodobnie wytwarza ją lipidowo-polisacharydowa przegroda oddzielająca tworzący się kryształ od pozostałej zawartości wakuoli. Na podstawie kształtu jamy krystalicznej można określić kształt kryształu, który zostanie w niej wytworzony. Jeden krysztalonośny idioblast zawiera tylko jeden rodzaj kryształu. Idioblasty rafidów gromadzą się w dolnej części liścia między powietrznymi przestrzeniami aerenchymy, podczas gdy idioblasty kryształów druzowych znajdują się zwykle w górnej części liścia nad aerenchymą (Kostman i Franceschi 2000). Rozbudowane retikulum

endoplazmatyczne ma za zadanie przystosować komórki do nagłego wzrostu stężenia wapnia w trakcie formowania kryształów. Ekspresja białek zdolnych do wiązania wapnia, takich jak sekwestryna i kalretikulina jest znacząca w idioblastach krystalicznych. Idioblasty dzięki rozległej sieci mikrotubul w korowej części komórki, mogą dostosować rozmiar komórki w trakcie wzrostu kryształów. Mikrotubule ograniczają powiększanie się idioblastów i odpowiadają za ich kształt, nie wpływając na wzrost kryształów (Lersten i Horner 2011).

4. Degradacja szczawianu wapnia a tworzenie aerenchymy

Oksydaza szczawianowa może rozkładać szczawian wapnia na CO_2 i H_2O_2 . Degradacja kryształów szczawianu wapnia prowadzi do powstawania wysokiego poziomu H_2O_2 , powodując programowaną śmierć komórek (PCD) u *Theobroma cacao* L. (kakaowiec właściwy). Według badań Du i in. (2018) aerenchyma *Typha angustifolia* L. (pałka wąskolistna) została utworzona przez degradację komórek na skutek PCD. Komórki podatne na PCD przeszły kilka etapów związanych ze śmiercią komórki, w tym pojawienie się pęcherzyków, pęknięcie tonoplastu oraz degradację cytoplazmy, organelli i ścian komórkowych (Du i in. 2018). W początkowej fazie tworzenia się jamy krystalicznej idioblasty występują w strefie wrażliwej na PCD, następnie osadzają się wokół wgłębienia. Gdy jama dojrzeje poprzez lizę dużej liczby komórek, kryształy są jednocześnie degradowane i idioblasty ulegają dysocjacji (Ni i in. 2014).



Rys. 3. Wykrywanie H_2O_2 (barwienie DAB - diaminobenzydyna) w różnych stadiach rozwojowych tworzenia aerenchymy w *Typha angustifolia* (pałka wąskolistna) (a) Faza stała: nie stwierdzono akumulacji H_2O_2 w komórkach podatnych na programowaną śmierć komórki (okrąg – komórki tworzące aerenchymę); (b, c) Faza formowania wczesnej jamy (b) kryształonośny idioblast (strzałki) wykazywał obecność obszarów zabarwionych DAB, (c) krystaliczny idioblast w powiększeniu (b); (d, e) faza tworzenia późnej jamy; (d) silne zabarwienie DAB było głównie skoncentrowane w idioblastach kryształonośnych wokół jamy (strzałki); (e) powiększony obraz d; (f) Dojrzała jama krystaliczna, skala = (b, d) = 50 mm, (a) = 25 mm, (c, e) = 12,5 mm, (f) = 200 mm (Du i in. 2018)

Barwienie za pomocą DAB wykazało, że wysoki poziom H_2O_2 utrzymywał się podczas wczesnych i późnych etapów formowania aerenchymy, wykazując zwiększoną akumulację H_2O_2 w

idioblastach krystalicznych. Nadtlenek wodoru może działać ponadto jako cząsteczka sygnałowa, która reguluje rozwój roślin, adaptację do stresu i PCD (Du i in. 2018).

5. Rola kryształów szczawianu wapnia w komórkach roślinnych

U roślin jednoliściennych występują trzy główne typy kryształów szczawianu wapnia: rafidy, styloidy i druzy (Prychid i in. 2003). Niektóre rodziny roślin jednoliściennych (np. *Iridaceae*) charakteryzują się obecnością jedynie styloidów lub rafidów (np. *Hypoxidaceae* – przyklękowate) (Raman i in. 2014). Stąd obecność lub brak określonego typu kryształu szczawianu wapnia mogą być pomocne w taksonomii.

Tworzenie kryształów szczawianu wapnia w roślinach odgrywa kluczową rolę w wielu ważnych procesach, w tym regulowaniu gospodarki wapniowej, ochronie przed roślinożercami i detoksykacji metali.

Podstawową funkcją krystalicznego idioblastu jest magazynowanie wapnia w celu zmniejszenia stężenia wapnia wokół sąsiednich komórek. Badania na poparcie tej hipotezy wykazały, że przy uprawie różnych gatunków roślin, wielkość i liczba kryształów szczawianu wapnia jest zależna od dostępności wapnia w środowisku. Tworzenie kryształów rafidów może pełnić podwójną funkcję: regulację homeostazy wapnia oraz obronę roślin przed roślinożercami, podczas gdy tworzenie druzów jest ściśle związane z regulacją stężenia jonów wapnia. Proces ten jest dynamiczny i reaguje na wahania poziomów wapnia. Przy jego wysokim poziomie, wielkość i liczba kryształów gwałtownie rośnie, natomiast przy ograniczonej dostępności tego pierwiastka, dochodzi do uwalniania wapnia z kryształów, co prowadzi do redukcji wielkości i liczby druzów (Volk i in. 2002).

W badaniach prowadzonych przez Molano-Flores (2001) stwierdzono nagromadzenie kryształów szczawianu wapnia w liściach *Sida rhombifolia* L. (polska nazwa gatunkowa) w odpowiedzi na zranienie tkanek. Wynika z tego, że w niektórych roślinach tworzenie kryształów jest indukowaną odpowiedzią obronną. W badaniu roślinożernych gazeli, autorzy zauważyli, że zwierzęta zjadały tylko końcówki liści lilii pustynnych. Po analizach mikroskopowych liści okazało się, że końcówki były jedynymi obszarami liścia pozbawionymi rafidów. Ruiz i in. (2002) porównali ilość szczawianu wapnia zgromadzonego przez rośliny z ilością roślinożerców, które przebywały na danym terenie. Autorzy stwierdzili, że lilie, które były uprawiane w miejscach, gdzie żerowanie gazeli było najintensywniejsze, zawierały największą ilość kryształów, podczas gdy te, które rosły w miejscach, gdzie żerowanie było minimalne, gromadziły niewiele (lub brak) kryształów. Przycinanie lub zranienie liści nie powodowało jednak wzrostu akumulacji szczawianu wapnia, co wskazuje, że w tym przypadku tworzenie kryształów nie było indukowane (Molano-Flores 2001).

Zgodnie z przeprowadzonymi badaniami rośliny wykorzystują kwasy organiczne (np. cytryniany, jabłczan i/lub szczawian) jako mechanizmy umożliwiające im tolerowanie nadmiernych stężeń metali (Ryan i in. 2001). Niektóre gatunki wykorzystują szczawian do detoksykacji metali, takich jak ołów (Yang i in. 2000), glin (Ma i in. 2001), stront i kadm (Choi i in. 2001). Badania wykazały, że obecny w środowisku metal jest włączany do kryształów szczawianu wapnia (Choi i in. 2001). W glebach kwaśnych (około 40% światowych gruntów rolnych), toksyczność glinu jest głównym problemem ograniczającym produkcję roślinną (Nakata 2003). Mikromolowe stężenia glinu mogą hamować wzrost korzeni i wpływać na pozyskiwanie składników odżywczych i wody. To zmniejszenie funkcji korzeni jest głównym problemem w produkcji wielu ważnych rolniczo gatunków roślin (Ma i in. 2001). Zostały opisane dwa mechanizmy detoksyfikacji glinu. Pierwszy polega na wydzieleniu szczawianu do środowiska przez korzenie, drugi nazywany mechanizmem wewnętrznej tolerancji polega na związaniu glinu do kryształu szczawianu w części nadziemnej rośliny. Oba mechanizmy detoksyfikacji glinu występują między innymi u gryki (Nakata 2003).

6. Podsumowanie

Tworzenie kryształów szczawianu wapnia jest kontrolowane genetycznie, a kryształy są zwykle formowane w określonym kształcie i położeniu przestrzennym. Morfologia kryształów szczawianu wapnia jest bardzo zróżnicowana począwszy od prostych, pryzmatycznych form poprzez agregaty, aż do pojedynczych kolumn lub igieł. Powstają one w komórkach zwanych idioblastami.

Podstawowa rola kryształów szczawianu wapnia może się różnić w zależności od rośliny i tkanki, w której występują. Są one między innymi rezerwuarem wapnia, pozwalając utrzymać prawidłową równowagę jonową. Działają również jako obrona roślin przed roślinożercami, ponieważ powodują podrażnienia błon śluzowych. W wyniku degradacji kryształów szczawianu wapnia w roślinach powstaje wysoki poziom H_2O_2 , który jest uważany za kluczową cząsteczkę sygnałową, wywołującą PCD.

7. Literatura

- Braissant O, Cailleau G, Aragno M, Verrecchia EP (2004) Biologically induced mineralization in the tree *Milicia excelsa* (Moraceae): its causes and consequences to the environment, *Geobiology*, 2:59-66.
- Choi YE, Harada E, Wada M, Tsuboi H, Morita Y, Kusano T, Sano H (2001) Detoxification of cadmium in tobacco plants: formation and active excretion of crystals containing cadmium and calcium through trichomes, *Planta*, 213: 45-50.
- Crowther A (2009) Re-viewing raphides: issues with the identification and interpretation of calcium oxalate crystals in microfossil assemblages. In: Fairbairn A, O'Connor S, Marwick B (eds) *New Directions in Archaeological Science*. Terra Australis, ANU E-Press, 28: 105-118.
- Du X, Ren X, Wang L, Yang K, Xin G, Jia G, Nicand X, Liu W (2018) Calcium oxalate degradation is involved in aerenchyma formation in *Typha angustifolia* leaves. *Funct Plant Biol*, 45: 922-934.
- Franceschi VR, Nakata PA (2005) Calcium oxalate in plants: formation and function. *Annu Rev Plant Biol*, 56: 41-71.
- Hardy CR, Stevenson DW (2000) Development of the gametophytes, flower and vasculature in *Cochliostema odoratissimum* (Commelinaceae), *Bot J Linn Soc*, 134: 131-157.
- Horner HT, Kausch AP, Wagner BL (2000) Ascorbic acid: a precursor of oxalate in crystal idioblasts of *Yucca torreyi* in liquid root culture, *Int J Plant Sci*, 161: 861-868.
- Horner HT, Wanke S, Samain MS (2012) A comparison of leaf crystal macropatterns in the two sister genera *Piper* and *Peperomia* (Piperaceae), *Am J Bot*, 99: 983-997.
- Kostman TA, Franceschi VR (2000) Cell and calcium oxalate crystal growth is coordinated to achieve high-capacity calcium regulation in plants, *Protoplasma*, 214: 166-179.
- Lersten NR, Horner HT (2011) Unique calcium oxalate "duplex" and "concretion" idioblasts in leaves of tribe Naucleae (Rubiaceae), *Am J Bot*, 98: 1-11.
- Ma JF, Ryan PR, Delhaize E (2001) Aluminium tolerance in plants and the complexing role of organic acids, *Trends Plant Sci*, 6: 273-278.
- Meric C (2009) Calcium oxalate crystals in some species of the tribe Inuleae (Asteraceae), *Acta Biol Cracov Bot*, 51: 105-110.
- Molano-Flores B (2001) Herbivory and calcium concentrations affect calcium oxalate crystal formation in leaves of *Sida* (Malvaceae), *Ann. Bot*, 88: 387-391.
- Monje PV, Baran EJ (2002) Characterization of Calcium Oxalates Generated as Biominerals in Cacti, *Plant Physiol*, 128: 707-713.
- Nakata PA (2003) Advances in our understanding of calcium oxalate crystal formation and function in plants, *Plant Sci*, 164: 901-909.
- Ni XL, Meng Y, Zheng SS, Liu WZ (2014) Programmed cell death during aerenchyma formation in *Typha angustifolia* leaves, *Aquat Bot*, 113: 8-18.
- Prychid CJ, Furness CA, Rudall PJ (2003) Systematic significance of cell inclusions in Haemodoraceae and allied families: silica bodies and tapetal raphides, *Ann Bot*, 92: 571-580.
- Raman V, Horner HT, Khan IA (2014) New and unusual forms of calcium oxalate raphide crystals in the plant kingdom, *J Plant Res*, 127: 721-730.
- Ruiz N., Ward D., Saltz S (2002) Responses of *Pancreatium sickenbergeri* to simulated bulb herbivory: combining defence and tolerance strategies, *J. Ecol*, 90: 472-479.
- Ryan PR, Delhaize E, Jones DL (2001), Function and mechanism of organic anion exudation from plant roots, *Annu. Rev., Plant Physiol., Plant Mol. Biol.*, 52: 527-560.

Saltz S, Ward D (2000) Responding to a three-pronged attack: desert lilies subject to herbivory by dorcas gazelles, *Plant Ecol*, 148: 127-138.

Volk GM, Lynch-Holm VJ, Kostman TA, Goss LJ, Franceschi VR (2002) The role of druse and raphide calcium oxalate crystals in tissue calcium regulation in *Pistia stratiotes* leaves, *Plant Biol*, 4: 34-45.

Yang YY, Jung JY, Song WY, Suh HS, Lee Y (2000) Identification of rice varieties with high tolerance or sensitivity to lead and characterization of the mechanism tolerance, *Plant Physiol*, 124: 1019-1026.

Wykaz stron internetowych

<http://www.ghb.cz/view.php?navezclanku=pozvanka-do-mikrosveta&cisloclanku=2015110002>
[dostęp: 10.04.19r]

<http://www.ueb.cas.cz/cs/content/zarodky-smrku-v-prouzkovanem-pyzamu> [dostęp: 10.04.19r]

3. Remediacja chloranów(VII) ze środowiska – problemy i możliwości

Perchlorate remediation from environment – challenges and possibilities

Kasprzak Kamila⁽¹⁾, Niziński Przemysław⁽²⁾, Krupa Katarzyna⁽²⁾, Karolina Wojtunik-Kulesza⁽¹⁾

⁽¹⁾ Katedra Chemii, Zakład Chemii Nieorganicznej, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Analityki Medycznej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

⁽²⁾ Katedra Chemii, Zakład Chemii Analitycznej, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Analityki Medycznej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

Słowa Kluczowe: żywność funkcjonalna, gruczoł tarczowy, redukcja chloranów(VII)

Streszczenie

Zainteresowanie problemem wpływu chloranów(VII) na zdrowie ludzi wzrosło od 1997 roku, kiedy odkryto duże stężenia tych związków w próbkach wód pochodzących z zachodnich stanów USA. Ze względu na ich właściwości fizyczne i chemiczne związki te ulegają bardzo powolnej degradacji w środowisku i mogą akumulować się w otoczeniu przez wiele lat. Udowodniony został szkodliwy wpływ dużych dawek chloranów(VII) na czynność gruczołu tarczowego poprzez hamowanie jednego z etapów syntezy hormonów tarczycy. Wciąż jednak nie jest znany wpływ na zdrowie dawek subklinicznych, gdyż dane literaturowe z ostatnich lat dostarczają często sprzecznych ze sobą informacji. W celu usunięcia ze środowiska jonów ClO_4^- zostały opracowane różne metody remediacji, między innymi fizykochemiczne i biologiczne. W niniejszej pracy przedstawione zostały podstawowe informacje dotyczące budowy, zastosowania i wpływu chloranów(VII) na zdrowie oraz metody ich remediacji ze środowiska, w szczególności w formie żywności funkcjonalnej.

1. Wprowadzenie

Chlorany(VII) stanowią stosunkowo nowe, dotychczas nie w pełni poznane zagrożenie środowiska. Wzrost zainteresowania problemem chloranów(VII) jako związków mających szkodliwy wpływ na zdrowie ludzi jest obserwowany od końca lat 90. XX wieku. Wówczas odkryto duże stężenia tych związków w wodach rzeki Kolorado w USA. W tym samym czasie nastąpił przełom w analityce jonów ClO_4^- , z uwagi na odkrycie nowej metody oznaczania chloranów(VII), pozwalającej na oznaczenie tych anionów na poziomie $4 \mu\text{g/L}$ (Urbansky 2002). Jon chloranowy(VII) to prosty anion nieorganiczny o silnych właściwościach utleniających. Anion ma budowę tetraedru zbudowanego z czterech atomów tlenu oraz jednego zlokalizowanego centralnie atomu chloru. Swoją silnie utleniającą charakter zawdzięcza atomowi chloru, znajdującemu się na +6 stopniu utlenienia, jednakże szybkość reakcji redox z udziałem chloranów(VII) jest bardzo mała i zwykle jest obserwowana tylko w stężonym roztworze kwasu chlorowego(VII). Prawdopodobnie jest to spowodowane obecnością atomów tlenu w tetraedrycznej cząsteczce, które chronią reaktywny atom chloru przed wpływem reduktorów z otoczenia. Sole kwasu chlorowego(VII) w postaci stałej przyjmują formę białych lub bezbarwnych kryształów, uwodnionych (chloran(VII) sodu) lub bezwodnych (chloran(VII) potasu), zaś kwas chlorowy(VII) bezbarwnej, oleistej cieczy. Rozpuszczalność chloranów(VII) w wodzie zależy od rodzaju kationu wchodzącego w skład soli. Większość jednak jest dobrze rozpuszczalna w wodzie i rozpuszczalnikach niewodnych, dzięki swojemu niskiemu powinowactwu do kationów metali. W rezultacie chlorany(VII) mogą akumulować się w środowisku przez wiele lat, ulegając bardzo powolnej degradacji (Gu 2006).

Z uwagi na swoje silne właściwości utleniające chlorany(VII) są szeroko wykorzystywane jako składniki stałych paliw rakietowych, amunicji oraz materiałów wybuchowych. Na masową skalę zaczęto ich używać podczas II wojny światowej, w 1940 roku światowa produkcja chloranu(VII) amonu wynosiła ok. 2 tys. ton rocznie, zaś w połowie 1945 roku wzrosła dziesięciokrotnie do poziomu 20 tys. ton rocznie. Poza zastosowaniem w przemyśle zbrojeniowym, sole kwasu chlorowego(VII) wykorzystywane są do produkcji fajerwerków, jako detonatory w poduszkach powietrznych montowanych w seryjnie produkowanych samochodach, w procesach elektrolizy,

w procesie garbowania skór, a także w grawimetrycznym oznaczaniu jonów potasu, gdyż chloran(VII) potasu jest związkiem słabo rozpuszczalnym w wodzie (Schilt 1979).

Źródła chloranów(VII) w środowisku można podzielić na naturalne i antropogeniczne. Do grupy pierwszej zaliczyć można naturalne formowanie się chloranów(VII) w atmosferze. Mechanizm tworzenia się jonów ClO_4^- nie jest dobrze poznany, na przestrzeni lat zostało zaproponowanych kilka możliwych ścieżek syntezy, przy czym do najbardziej prawdopodobnych należy formowanie się chloranów(VII) przy udziale jonów chlorkowych i ozonu w troposferze i stratosferze oraz nowa teoria zakładająca syntezę chloranów(VII) podczas wyładowań atmosferycznych (Dasgupta 2005). Największym znanym rezerwuarem chloranów(VII) na świecie są złoża saletry chilijskiej znajdujące się na pustyni Atacama w Ameryce Południowej. Obecność jonów chloranowych(VII) pochodzenia naturalnego wykazano także w próbkach śniegu z Arktyki, wodach Wielkich Jezior (USA i Kanada), próbkach gleb z Doliny Śmierci (USA) oraz Suchych Dolin (Antarktyda). Do źródeł związanych z działalnością człowieka oprócz produkcji na cele militarne oraz cywilne, której światową ilość szacuje się na kilkaset tys. ton rocznie, należy import rudy saletry chilijskiej i wytwarzanie z niej nawozu sztucznego. Szacuje się iż ruda saletry chilijskiej zawiera wg różnych opracowań 0.2 - 0.4% lub 0.05 – 0.4% masowych ClO_4^- (Susarla 1999). W latach 1830 – 1980 szacowana wielkość importu rudy saletry chilijskiej do USA i Europy wyniosła ok. 23 miliony ton w przeliczeniu na azot (N), przy czym największą wartość odnotowano w latach 30. XX wieku. W związku z wynalezieniem przemysłowej metody produkcji kwasu azotowego z azotu atmosferycznego import saletry chilijskiej do krajów Europy i USA w drugiej połowie XX wieku znacząco zmalał (Urbansky 2003).

Istnieją trzy podstawowe drogi przenikania chloranów(VII) do organizmu człowieka – wziewna, przezskórna (transdermalna) i doustna, przy czym najbardziej istotne znaczenie kliniczne zdaje się mieć ta ostatnia. Chlorany(VII) w większości są związkami dobrze rozpuszczalnymi w wodzie i jako takie pozostają w roztworach wodnych w formie zdysocjowanej, skóra zaś jest bardzo dobrą barierą dla związków zjonizowanych, dzięki czemu absorpcja ich tą drogą jest bardzo mała. Droga inhalacyjna polega na wdychaniu cząstek chloranów(VII) zaadsorbowanych na cząsteczkach pyłów. Na ten rodzaj ekspozycji najbardziej narażeni są mieszkańcy dużych aglomeracji, w których występuje zjawisko smogu oraz pracownicy kompleksów przemysłowych, gdzie wykorzystywane lub produkowane są sole kwasu chlorowego(VII). Badania prowadzone w Chinach na grupie pracowników fabryki chloranu(VII) amonu nie wykazały istotnego zwiększenia stężenia jonów ClO_4^- w moczu po wziewnym przyjmowaniu tych związków razem z pyłem fabrycznym, jednakże liczne ograniczenia tego badania nie pozwalają jednoznacznie zaklasyfikować tej drogi narażenia jako mało istotnej. Drogą narażenia o największym znaczeniu klinicznym jest droga doustna. Chlorany(VII) bardzo szybko są wychwytywane z żołądka i jelita cienkiego, a następnie trafiają do krwiobiegu. Z uwagi na ich dobrą rozpuszczalność i mobilność w środowisku wodnym mogą znajdować się w wielu produktach spożywanych przez człowieka – w wodzie pitnej, owocach, warzywach, produktach mlecznych, żywności dla niemowląt oraz suplementach diety. W związku ze wciąż słabo poznanym możliwym wpływem przewlekłego przyjmowania wraz z wodą i produktami spożywczymi na funkcjonowanie organizmu niewielkich dawek ClO_4^- , w 2005 roku amerykańska Agencja Ochrony Środowiska (Environmental Protection Agency, EPA) ustaliła na podstawie niezależnych badań naukowych dzienną dawkę nadchloranów, która nie wywołuje możliwych do zaobserwowania działań niepożądanych na poziomie 0,7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ masy ciała oraz dopuszczalne stężenie jonów ClO_4^- w wodach pitnych na poziomie 15 $\mu\text{g}/\text{L}$ (NRC 2005).

Narzędem krytycznym dla narażenia na chlorany(VII) jest tarczycza. Wpływ chloranów(VII) na gruczoł tarczycowy został odkryty w latach 50. i 60. XX wieku, w którym to okresie stosowano te związki w terapii nadczynności tarczycy. Sole kwasu chlorowego(VII) należą do grupy związków wolotwórczych (goitrogenów). Oprócz chloranów(VII) goitrogenami są jeszcze min. tiocyjaniany SCN^- i azotany(V) NO_3^- . Związki te mają zdolność hamowania wychwytywania jodu przez komórki gruczołu tarczycowego (Smanik 1996). Szkodliwy wpływ nadchloranów związany z hamowaniem transportu jodu do tarczycy jest ściśle związany z zaburzeniami wytwarzania przez ten gruczoł hormonów 3,5,3'-trójodotyroniny (T_3) i 3,5,3',5'-tetrajodotyroniny, (tyroksyny, T_4). Synteza tych hormonów jest złożonym procesem, zależnym od wielu czynników. Zahamowanie transportu jonów jodkowych do światła pęcherzyka tarczycowego blokuje kluczowy etap syntezy T_3 i T_4 jakim jest

jodowanie aminokwasu tyrozyny i jego jodowanych pochodnych do właściwych hormonów. Ogólna funkcja T_3 i T_4 polega na stymulacji konsumpcji tlenu w komórkach organizmu, powodowaniu wzrostu syntezy białka oraz uzyskiwaniu dodatniego bilansu azotowego. Skutkiem ich działania jest ogólny wzrost tempa metabolizmu węglowodanów i tłuszczów. Są one również ważnymi modulatorami procesów rozwojowych, poprzez stymulowanie przysadki mózgowej do wydzielania hormonu wzrostu (somatotropiny), a także wpływanie na rozwój płuc, kości, naczyń krwionośnych oraz OUN, dlatego grupą szczególnie narażoną na niedobory jodu i niedoczynność tarczycy są kobiety w okresie ciąży i połogu oraz dzieci. Niedoczynność tarczycy objawiająca się w życiu płodowym lub w okresie niemowlęcym może prowadzić do kretynizmu, który to stan chorobowy charakteryzuje się niską masą urodzeniową, licznymi, nieodwracalnymi wadami rozwojowymi, zarówno fizycznymi jak i umysłowymi. U dorosłych do najczęstszych objawów należą zwolnienie akcji serca, senność, zaparcia, nadwrażliwość na zimno, łamliwość włosów i ogólne osłabienie organizmu (Biochemia Harpera 1995).

2. Metody remediacji chloranów(VII)

W związku z pojawiającymi się doniesieniami o zanieczyszczeniu chloranami(VII) wód pitnych, powierzchniowych, basenowych i innych, a także oznaczeniu znacznych ilości tych związków w niektórych produktach spożywczych istnieje potrzeba degradacji anionu ClO_4^- do innych, nietoksycznych związków. Z uwagi na właściwości fizykochemiczne chloranów(VII) jak dobra rozpuszczalność i mobilność w środowisku wodnym, słabe właściwości kompleksujące oraz mała reaktywność w stężeniach występujących w środowisku stosowanie konwencjonalnych technik remediacji jak koagulacja, precypitacja i sedymentacja jest kosztowne, mało efektywne i w rezultacie nieoptymalne. Do nowoczesnych metod remediacji chloranów(VII) ze środowiska zaliczyć można techniki membranowe, adsorbcję na granulowanym węglu aktywnym oraz wykorzystywaną na największą skalę wymianę jonową. Metody te, jakkolwiek odznaczające się pewną skutecznością w oczyszczaniu próbek środowiskowych, nie nadają się do redukcji chloranów(VII) z żywności (Bardiya 2010).

Interesującym sposobem remediacji chloranów(VII) jest wykorzystanie do tego celu mikroorganizmów. Zidentyfikowano kilka szczepów bakterii, które redukują te jony do chlorków min. *Dechloromonas spp.*, *Azospira spp.* oraz *Dechlorosoma spp.* Bakterie te wytwarzają specjalne enzymy, które obniżają energię aktywacji potrzebną do redukcji chloranów(VII) i wykorzystują je jako związki utleniające w ich metabolizmie. Chaudhari et al. i Wu et al. badali czynniki które wpływają na redukcję chloranów(VII) przez drobnoustroje. Wykazali dwa szczepy bakteryjne które w beztlenowych warunkach przy obecności molibdenu wykazały właściwości redukujące względem tych jonów. Jeden z nich był w stanie zredukować chlorany(VII) nawet w obecności azotanów, natomiast drugi w pierwszej kolejności redukował azotany, następnie chlorany(VII). Ze względu na obecność w wodzie dużych ilości zanieczyszczeń innymi anionami, w tym azotanami, istotne jest aby zrozumieć w jaki sposób zachodzi mikrobiologiczna redukcja chloranów(VII) w ich obecności.

Badania Xu et al. dowiodły że bakterie hodowane zarówno w obecności jonów chloranowych(VII) jak i azotanowych wykazywały lepsze właściwości redukcyjne niż te, hodowane tylko w obecności jonów chloranowych(VII). Bakterie hodowane jedynie w obecności jonów azotanowych, nie wykazywały żadnych zdolności redukcyjnych względem chloranów(VII). Interesujące doświadczenie opisano w pracy Hutchinson i in. Wykorzystując enzymy izolowane z *Azospira oryzae* dowiedziono, iż mają one zdolność redukcji chloranów(VII) nawet przy 500 – krotnie wyższym stężeniu jonów NO_3^- . Przeprowadzono wiele badań dowodzących skuteczności bakterii w redukcji tych jonów zarówno w wodzie, jak i innych materiałach, odbyły się również wielkoskalowe demonstracje. Jednakże ze względu na kwestie publicznej akceptacji, remediacja mikrobiologiczna nie była nigdy stosowana bezpośrednio w systemach uzdatniania wody pitnej. Nadal wiedza na temat skutków zdrowotnych spożywania wody z tymi drobnoustrojami jest zbyt mała, chociaż jak wskazują badania, wykorzystanie tej metody do oczyszczania wody jest skuteczne (Srinivasan i in. 2009).

3. Problem nadmiernego spożycia chloranów(VII), a żywność funkcjonalna

Komisja Europejska (ZALECENIE KOMISJI (UE) 2015/682 z dnia 29 kwietnia 2015 r.) rekomenduje prowadzenie monitorowania obecności chloranów(VII) w żywności. Ustaliła także, iż docelowa granica oznaczalności (LOQ) nie powinna być wyższa niż 2 µg/kg w przypadku analizy chloranów(VII) w żywności dla niemowląt i małych dzieci, 10 µg/kg w innych środkach spożywczych oraz 20 µg/kg w suszonych ziołach, przyprawach, herbacie oraz naparach ziołowych i owocowych. Działający w ramach Europejskiego Urzędu panel ds. środków trujących w łańcuchu żywnościowym (CONTAM) przedstawił opinię naukową na temat zagrożeń dla zdrowia publicznego związanych z obecnością chloranów(VII) w żywności. Panel CONTAM stwierdził, że „przewlekłe narażenie z dietą na nadchlorany stanowi potencjalne zagrożenie, zwłaszcza w przypadku konsumentów spożywających duże ilości chloranów(VII) z żywnością, należących do młodszych grup wiekowych populacji cierpiących na łagodny lub umiarkowany niedobór jodu. Ponadto możliwe jest, że krótkotrwałe narażenie na chlorany(VII) jest powodem obaw w odniesieniu do niemowląt karmionych piersią i małych dzieci spożywających niewielkie ilości jodu”. Przedstawiono także informację, że wysoki poziom chloranów(VII) stwierdzono w roślinach z rodziny *Cucurbitaceae* i warzywach liściastych. Istnieją także inne doniesienia świadczące o występowaniu podwyższonego, ponad ustaloną bezpieczną granicę, poziomu chloranów(VII) w żywności - w niektórych warzywach i owocach (Calderón i in. 2017), mlekach będących podstawą diety dziecięcej oraz kobiet w okresie laktacji (Andrea i in. 2003) czy mieszanek mlecznych przeznaczonych do żywienia niemowląt i dzieci (Nanguk i in. 2000).

Interesującym i racjonalnym remedium chroniącym przed zbyt dużym nieświadomym spożyciem opisywanych chloranów(VII) jest produkcja odpowiednio zaprojektowanej żywności funkcjonalnej z wykorzystaniem bakterii wykazujących zdolności redukujące względem tych jonów, jak np. *Azospira oryzae* lub *Dechloromonas spp.* W szczególności może to być użytkowo istotne w przemyśle produktów spożywczych przeznaczonych dla niemowląt i małych dzieci.

Koncepcja żywności funkcjonalnej wywodzi się z kultury Wschodu, zaś po raz pierwszy została zdefiniowana w Japonii w latach 80 XX wieku. Jednym z zamierzeń rozwoju produkcji tego typu żywności było obniżenie rosnących kosztów ochrony zdrowia społeczeństwa poprzez ograniczanie i zapobieganie występowania chorób, w szczególności cywilizacyjnych. W Japonii, poza znaczącą pozycją na rynku spożywczym, żywność funkcjonalna uzyskała swój status prawny, natomiast nauka o niej zajmuje centralną pozycję wśród nowoczesnych nauk przyrodniczo-medycznych (Darewicz i in. 2003). W 1991 roku Ministerstwo Zdrowia opracowało zbiór norm prawnych regulujących wymagania dotyczące kwestii produkcyjnych i obrotu handlowego prozdrowotnej żywności funkcjonalnej, nazwanej jako *Food for Specified Health Use* (FOSHU) (Arai 2000). W USA definicję żywności funkcjonalnej opracował Instytut Medycyny Narodowej Akademii Nauk, zaś w Europie międzynarodowy interdyscyplinarny projekt ILSI *Functional Food Science in Europe* (FUFOSE). Celem tego programu było rozwijanie i koordynowanie współpracy pomiędzy ośrodkami naukowymi, a przemysłem spożywczym krajów członkowskich Unii Europejskiej. Konsekwencją prac nad tym projektem było europejskie zdefiniowanie pojęcia żywności funkcjonalnej. Jest to żywność, która poza funkcją odżywczą wykazuje udowodniony korzystny wpływ na jedną lub więcej funkcji organizmu, polegający na poprawie stanu zdrowia oraz samopoczucia i/lub zmniejszeniu ryzyka chorób. Wymagane jest aby stanowiła konwencjonalną formę żywności, a także aby pozytywne prozdrowotne działanie wykazywała w ilościach dostępnych podczas ogólnego spożywania jako uzupełnienie codziennej diety. Wytwarzanie żywności funkcjonalnej może być oparte na dodatku substancji aktywnych biologicznie, także otrzymywanych z naturalnych surowców roślinnych i zwierzęcych, także bakterii, projektowaniu nowatorskiego składu chemicznego znanych już produktów lub ograniczaniu ich wartości energetycznej (*Scientific Concepts of Functional Foods in Europe Consensus Document* 1999). Stosowane są różne klasyfikacje żywności funkcjonalnej. Ze względu na specyficzny skład finalnej żywności lub grupy odbiorców- niemowlęta, matki karmiące, kobiety ciężarne, osoby obciążone zwiększonym ryzykiem określonych chorób, sportowcy. Natomiast nową żywnością (*novel food*), mogąą jednocześnie stanowić żywność funkcjonalną, są produkty spożywcze i ich składniki, które nie były w znacznym

stopniu stosowane w żywieniu ludzi w krajach członkowskich Unii Europejskiej przed dniem 15 maja 1997 roku.

Rynek żywności funkcjonalnej jest najszybciej rozwijającym się sektorem światowego rynku żywnościowego, roczny wzrost tego rynku jest oceniany na 20%. Trendy demograficzne i kulturowe na świecie wpływają na wzrost sprzedaży żywności funkcjonalnej oraz zainteresowania wybranymi rodzajami tej żywności. Jest to rynek odpowiadający na aktualne potrzeby konsumentów, stąd też stale rośnie liczba nowych produktów (Korbutowicz 2018). Odpowiednio zaprojektowana i przebadana żywność funkcjonalna, wzbogacana dodatkami opisywanych bakterii, mogłaby stanowić kolejny prozdrowotny produkt zapobiegający powstawaniu i rozwojowi chorób związanych ze zbyt dużym spożyciem chloranów(VII).

4. Podsumowanie

Chlorany(VII) negatywnie oddziałują na organizm człowieka. Udowodniony został szkodliwy wpływ określonych dawek chloranów(VII) na czynność gruczołu tarczowego poprzez hamowanie jednego z etapów syntezy hormonów tarczycy. Drogą narażenia o największym znaczeniu klinicznym jest droga doustna, a ryzyko zbyt dużego spożycia chloranów(VII) związane jest z faktem, że zanieczyszczone są nimi wody- w szczególności pitne i powierzchniowe. Z uwagi na ich dobrą rozpuszczalność i mobilność w środowisku wodnym wykazano, że znajdują się w wielu produktach spożywanych przez człowieka, także przeznaczonych dla niemowląt. Istnieją różne metody remediacji chloranów(VII), jedną z nich jest wykorzystanie do tego celu mikroorganizmów. Zidentyfikowano kilka szczepów bakterii, które redukują te jony do chlorków min. *Dechloromonas spp.*, *Azospira spp.* oraz *Dechlorosoma spp.* Zastosowanie tej metody w połączeniu z założeniami i rozwiązaniami technologicznymi żywności funkcjonalnej stanowi interesującą możliwość stworzenia nowatorskich prozdrowotnych produktów spożywczych, przeznaczonych w szczególności dla niemowląt i małych dzieci. Zasadne wydają się być przyszłe badania dotyczące opisywanej tematyki.

5. Literatura

- Arai S (2000) Functional food science in Japan: state of the art. *Biofactors* 12: 1-4.
- Calderón R, Godoy F, Escudey M i in. (2017) A review of perchlorate (ClO₄⁻) occurrence in fruits and vegetables. *Environmental Monitoring and Assessment* 189(2):82.
- Chaudhuri SK, O'Connor SM, Gustavson RL i in.(2002) Environmental factors that control microbial perchlorate reduction. *Applied & Environmental Microbiology* 68: 4425-4430.
- Darewicz M, Dziuba J, Panfil T (2003) Biologicznie aktywne składniki żywności funkcjonalnej w profilaktyce chorób nowotworowych. *ŻYWNOŚĆ. Nauka. Technologia. Jakość* 4(37): 36-47.
- Dasgupta, PK, Martinelango, PK, Jackson, WA i in. (2005) The origin of naturally occurring perchlorate: The role of atmospheric processes. *Environmental Science and Technology*, 39(6), 1569-1575.
- Gu B, Coates, JD (2006) Perchlorate: Environmental occurrence, interactions and treatment.
- Kirk A, Martinelango K, Tian K (2005) Perchlorate in Milk. *Environmental Science & Technology* 39 (7): 2011-2017.
- Korbutowicz M (2018) Żywność funkcjonalna na rynku światowym. *Studia i Prace WNEIZ US* (2)53: 209-220.
- Murray R, Granner D, Mayes P i in. (1995). *Biochemia Harpera*. (F. Kokot, Ed.) (3rd ed.). Warszawa: Wydawnictwo Lekarskie PZWL.
- Namguk H, Jongsung K, Yeomin Y (2010) Perchlorate in dairy milk and milk-based powdered infant formula in South Korea. *Chemosphere* 81(2010): 732-737.
- National Research Council. (2005). *Health Implications of Perchlorate Ingestion*. Washington, DC: National Academies Press.
- Schilt, AA (1979). *Perchloric Acid and Perchlorates*. Columbus, OH: GF Smith Chemical Company.

- Scientific Concepts of Functional Foods in Europe Consensus Document (1999) *British Journal of Nutrition* 81: S1-S27.
- Smanik PA, Liu Q, Furminger TL i in. (1996). Cloning of the human sodium iodide symporter. *Biochem Biophys Res Commun*, 226(2), 339–345.
- Srinivasan, R, Sorial, GA (2009). Treatment of perchlorate in drinking water: A critical review. *Separation and Purification Technology*, 69:7–21.
- Susarla S, Collette TW, Garrison AW i in. (1999) Perchlorate identification in fertilizers. *Environmental Science and Technology*, 33(19), 3469–3472.
- Urbansky ET (2002) Perchlorate as an environmental contaminant. *Environmental Science and Pollution Research*, 9(3): 187–192.
- Urbansky, ET i Brown SK (2003). Perchlorate retention and mobility in soils. *J. Environ. Monit.*, 5(3), 455–462.
- Wu D, He P, Xu X i in.(2008) The effect of various reaction parameters on bioremediation of perchlorate-contaminated water. *Journal of Hazardous Materials* 150: 419–423.
- Xu, J, Trimble JJ, Steinberg L i in. (2004) Chlorate and nitrate reduction pathways are separately induced in the perchlorate-respiring bacterium *Dechlorosoma* sp. KJ and the chlorate-respiring bacterium *Pseudomonas* sp. PDA. *Water Research* 38: 673–680.

4. Morwa czarna jako superfood- w świetle współczesnych badań naukowych Black mulberry as a superfood - in contemporary scientific researches

Kasprzak Kamila⁽¹⁾, Pawlicka Marta⁽²⁾, Kupryaniuk Karol⁽³⁾, Widelska Gabriela⁽¹⁾, Oniszczyk Anna⁽¹⁾

⁽¹⁾Zakład Chemii Nieorganicznej Katedry Chemii, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Analityki Medycznej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

⁽²⁾Studenckie Koło Naukowe przy Katedrze i Zakładzie Epidemiologii i Metodologii Badań Klinicznych, II Wydział Lekarski z Oddziałem Anglojęzycznym, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

⁽³⁾Zakład Inżynierii Procesowej, Katedra Techniki Ciepłej i Inżynierii Procesowej, Wydział Inżynierii Produkcji, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Kasprzak Kamila: kasprzak.kamila.k@o2.pl

Słowa kluczowe: *Morus nigra* L., antocyjany, związki polifenolowe, fitochemia

Streszczenie

„Superfoods” to naturalne nieprzetworzone produkty, które według badań naukowych za pomocą zawartych w nich związków aktywnych pomagają zoptymalizować zdolność organizmu do prawidłowego funkcjonowania. Jednym z przykładów superfoods jest morwa czarna- gatunek należący do rodzaju *Morus*. Wykazuje ona szereg prozdrowotnych właściwości- działanie antyoksydacyjne, neutroprotektoryjne, przeciwnowotworowe, przeciwwirusowe i przeciwbakteryjne, hipolipemizujące, gastroprotektoryjne, poprawiające profil lipidowy krwi, przeciwwzapalne i inne.

1. Wstęp

Do rodzaju morwa (*Morus*) z rodziny morwowatych (*Moraceae*) zalicza się kilkadziesiąt gatunków, głównie drzew liściastych, znanych z umiarkowanej i subtropikalnej strefy półkuli północnej. Są to uprawiane w Polsce morwa biała (*Morus alba* L.), morwa czarna (*Morus nigra* L.) i morwa czerwona (*Morus rubra* L.) (Ercisli, Orhan 2006), pozostałe to m.in. morwa piłkowana (*Morus serrata* M.), morwa chińska (*Morus australis* Poir.), morwa afrykańska (*Morus mesozygia* Stapf), morwa teksańska (*Morus microphylla* Buckley).

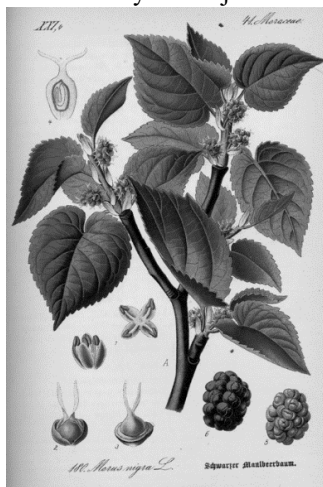
M. nigra (Rys. 1) charakteryzuje się niewysokim, często rozgałęzionym pniem, okrągłą koroną, jajowatymi lub 3–5-kłapowymi liśćmi, rozdzielнопłciowymi kwiatami (kwiaty żeńskie zebrane w krótkoszypułowych główkach o załączniach z dwoma słupkami) oraz ciemnopurpurowymi albo czarnawymi owocami (Rys.1). Osiąga wysokość 25 m. Rodzima w lasach zlokalizowanych na południe od Kaukazu i Morza Kaspijskiego, jak również w Iranie.

W Polsce gwałtowny wzrost upraw morwy białej w XX wieku związany jest z faktem, iż jej liście stanowią niezbędne pożywienie dla gąsienic jedwabnika morwowego (*Bombyx mori*). Do tego celu nadaje się także morwa czarna, lecz jej bardziej owłosione liście stanowią gorszy pokarm, a otrzymany jedwab zaś jest mniej wartościowy. Obecnie morwy w naszych rejonach uprawiane są głównie ze względu na wartościowe jadalne owoce (Karczmarczyk 2012).

Najbardziej zbadane i cenione gatunki z rodzaju *Morus* stosowane do celów leczniczych to morwa biała, morwa czarna i morwa czerwona. Stwierdzono, że ich owoce wykazują różne kierunki działania biologicznego- szczególnie antyoksydacyjne (Ercisli, Orhan 2006). Stres oksydacyjny związany jest z nadmiernym wzrostem wewnątrzkomórkowych związków utleniających, takich jak reaktywne formy tlenu (ROS), zaangażowanych w utratę zdolności obronnych przeciwutleniaczy. Odgrywa kluczową rolę w różnych stanach klinicznych, w tym procesach starzenia się, nowotworach, cukrzycy, miażdżycy, przewlekłym zapaleniu, chorobach neurodegeneracyjnych, reumatoidalnym zapaleniu stawów, zakażeniu ludzkim wirusem niedoboru odporności (HIV) (Collins i in 2005; Dröge 2002). Wielu naukowców interesuje się aktywnością przeciwutleniającą naturalnie występujących składników, w szczególności związków polifenolowych (Dröge 2002). Ponadto wykazują działanie

antytrombotyczne, przeciwzapalne, neuroprotektoryjne, nocyceptywne i inne. (Ercisli, Orhan 2006). Wspomniane aktywności determinowane są w głównej mierze przez obecność związków polifenolowych, w szczególności antocyjanin, które dodatkowo warunkują kolor owoców. Cyjanidyno-3-glukozyd oraz cyjanidyno-3-rutynozyd to najważniejsze antocyjany obecne w morwach. Istotne działanie wykazują również kwasy fenolowe (Aramwit 2010). Całkowita zawartość związków fenolowych w owocach *M. alba* wynosi 181 mg GAE/100G, w *M. nigra* 1422 mg GAE/100G, w *M. rubra* 1035 mg GAE/100G. Całkowita zawartość flawonoidów odpowiednio 29, 276, 219 mg GAE/100G (Ercisli, Orhan 2006).

Liście różnych odmian gatunków morw wykazują wysoką koncentrację 1,4-dideoksy-1,4-imino-D-arabinitolu i 1,4-dideoksy-1,4-imino-D-rybitolu, którym przypisuje się właściwości hipoglikemiczne. W owocach rodzaju *Morus* obecne są pierwiastki, takie jak wapń, magnez, żelazo, sód, mangan, cynk, miedź, selen oraz azot, sód i potas w znacznych ilościach. Owoce gatunku morwy białej są zasobniejsze w zawartość białka niż morwy czarnej i czerwonej (Rodrigues i in. 2019).



Rys.1. Morwa czarna (*Morus nigra*). Za: Otto Wilhelm Thomé, Flora von Deutschland, Österreich und der Schweiz, Gera 1885 (www.BioLib.de).

2. Przegląd literatury- właściwości prozdrowotne morwy czarnej

Owoce *M. nigra* wykazują najznaczniesze właściwości antyoksydacyjne spośród wszystkich gatunków rodziny *Moraceae*. Skutkuje to prewencyjnym lub hamującym wpływem na szereg chorób, w szczególności związanych z procesami starzenia (Ercisli i in. 2010). Substancje aktywne zawarte w *M. nigra*, w szczególności antocyjany, mogą być skuteczne w leczeniu chorób neurodegeneracyjnych. Przeprowadzony został szereg badań pod kątem wpływu na chorobę Parkinsona. Jest jednym z najczęściej występujących (18-418 zachorowania/100 000 osób w skali światowej) zwyrodnieniowych zaburzeń funkcji mózgu z objawami dysfunkcji motorycznych, takimi jak na przykład sztywność mięśni, bradykineza, drżenie spoczynkowe w jednej ręce połączone ze zmniejszoną możliwością ruchu ramienia, zachwiania równowagi, a także zamiany behawioralne i poznawcze. Pacjenci cierpiący na tę chorobę doświadczają obniżonej jakości życia z powodu przewlekłego postępującego przebiegu choroby, jak i niepożądanych skutków terapii farmakologicznych (Fahimi, Hadipour Jahromy 2018). W konsekwencji analizy skutków spożycia morwy czarnej przez 130 000 osób stwierdzono, że jest wartościowym czynnikiem zmniejszającym ryzyko wystąpienia choroby Parkinsona (Gao i in. 2012). Rahman i in. (2008) wykazali, iż spożycie antocyjanów występujących w morwie czarnej w dziennej dawce 100 mg/kg może przyczynić się do modulacji stężenia poziomu neurotransmiterów, takich jak DA, będących czynnikiem wpływającym na przebieg choroby Parkinsona. Ziaei i in. (2012) zasugerowali, że *M. nigra* łagodzi objawy parkinsonizmu, obniża narażenie stresem oksydacyjnym i przeciwdziała śmierci neuronów dopaminergicznych. W badaniu opublikowanym w 2018 roku w *Journal of Experimental Pharmacology* przeprowadzonym na modelu zwierzęcym (wykorzystującym 1-metylo-4-fenilo-

1,2,3,6-tetrahydropirydynę - MPTP) stwierdzono, że sok uzyskany z owoców *M. nigra* wpływa hamująco na dyskinezy związane z ruchami hiperkinetycznymi (LID) indukowane leczeniem lewodopą. Działanie to występuje w codziennej dawce $\geq 10\text{ml/kg}$ (Fahimi, Hadipour Jahromy 2018).

Rośliny z rodzaju *Morus* wykazują działanie antibakteryjne- odmienne w zależności od gatunku i części rośliny. Przykładowo, kora *M. rubra* działa przeciwbakteryjnie przeciwko bakteriom wywołującym zakażenia u ludzi- *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus epidermis*, *Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium bacteria*, owoce *M. nigra* i *M. mongolica* przeciwko *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Staphylococcus aureus*. Proces patologiczny bólu zapalnego jest istotnym kryterium diagnostycznym w wielu ostrych i przewlekłych schorzeniach. Infekcje bakteryjne to jedna z przyczyn powstawania bólu. Związki polifenolowe zawarte w *M. nigra* wykazały znacznie wyższą aktywność antynocyceptywną i przeciwbakteryjną w stosunku do *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Staphylococcus aureus* niż te w *M. alba*, *M. rubra* i *M. mongolica*. Aktywności te mogą być skutkiem hamującego działania na cytokiny prozapalne, indukowanej syntezy tlenku azotu (iNOS) i NF- κ B. Testy na modelach zwierzęcych wykazały, że cyjanidyno-3-O-glukozyd, rutyna i izokwercetyna to główne składniki aktywne w procesie antynocyceptywnym (Chen i in. 2017).

Spożycie owoców *M. nigra* obniża stężenie całkowitego cholesterolu, triglicerydów, lipoprotein o niskiej gęstości (LDL-c) i o bardzo niskiej gęstości (VLDL-c) w surowicy, podwyższa zaś zawartość lipoprotein o wysokiej gęstości (HDL-C) oraz enzymatyczną aktywność antyoksydacyjną. W badaniach na zwierzętach stwierdzono ponadto, że morwa czarna spowoduje obniżenie zmian miażdżycowych (Rodrigues i in. 2019).

Dieta bogata w polifenole morwy czarnej i morwy czerwonej przyczynia się do zapobiegania występowania chorób układu sercowo-naczyniowego oraz nowotworów (Fahimi, Hadipour Jahromy 2018). Związki czynne zawarte w morwie czarnej wykazują zdolność antyproliferacyjną i proapoptyczne działanie wobec komórek gruczolaka poprzez indukowanie aktywności kaspaz 3 i 7 podczas faz G0/G1 cyklu komórkowego. Powoduje to obniżenie ilości komórek w fazie S, podczas której następuje synteza białek i DNA (Rodrigues i in. 2019). Stwierdzono przeciwnowotworowe właściwości korzenia *M. nigra*. Najistotniejszy związek czynny morusin wywiera cytotoksyczność *in vitro* przeciwko nowotworowym liniom komórkowym różnego pochodzenia, w tym na przykład trzustki, szyjki macicy i jelita grubego (Zoofishan i in. 2018).

Liście *M. nigra* charakteryzują się właściwościami przeciwtleniającymi i cytoprotekcyjnymi. Przeprowadzone badanie wykazało, że posiadają zdolność do hamowania wzrostu komórek nowotworowych w warunkach *in vitro*. Flawonoidy (m.in. kwercetyna, luteolina i izoramnetyna) obecne w liściach *M. nigra* działają hepatoprotekcyjnie. W zbadanym terapeutycznym połączeniu z metotreksatem nastąpił znaczny spadek aktywności aminotransferazy alaninowej (ALT), aminotransferazy asparaginianowej (AST) i dehydrogenazy mleczanowej (LDH). Natomiast w doświadczeniu dotyczącym hepatotoksyczności wywołanej paracetamolem zastosowanie alkoholowego ekstraktu z liści morwy czarnej spowodowało obniżenie ALT, AST, fosfatazy alkalicznej (ALP) i całkowitej bilirubiny. Owoce morwy czarnej przyczyniają się do zmniejszenia poziomu stłuszczenia wątroby spowodowanej hiperlipidową dietą. Efekt hepatoprotekcyjny związany jest także z obniżeniem nieprawidłowej tolerancji glukozy i insulinooporności, indukcją utleniania kwasów tłuszczowych, obniżoną biosyntezą kwasów tłuszczowych i cholesterolu.

Światowa Organizacja Zdrowia (WHO) szacuje, że do roku 2025 liczba chorych na cukrzycę typu 2 może osiągnąć 300 mln. Leczenie cukrzycy typu 2 można wspomagać fitoterapią. Jako roślina o działaniu hipoglikemizującym spośród rodzaju *Morus* najbardziej znana jest *M. alba*, jednak morwa czarna także wykazuje wspomniane działanie. Właściwości przeciwcukrzycowe polegają przede wszystkim na obniżeniu poziomu cukru we krwi, zwiększaniu wrażliwości tkanek na działanie insuliny, obniżaniu glikemii poposiłkowej, hamowaniu nieprawidłowego wydzielania insuliny czy zapobieganiu powikłań cukrzycowych. Abd El-Mawla et al. (2011) wykazali działanie hipoglikemizujące ekstraktów z liści morwy czarnej na modelach zwierzęcych oraz jednoczesny efekt akumulacji zawartości flawonoidów w kulturach komórkowych traktowanych jasmonianem metylu. Ponadto zaobserwowano nieco większy efekt hipoglikemiczny gdy szczury poddawano działaniu

ekstraktów z hodowanych komórek, co wskazuje na addytywne działanie flawonoidów indukowanych przez jasmonian metylu. W innym badaniu odnotowano, że wodno-etanolowe ekstrakty z liści *M. nigra* istotnie obniżały stężenie glukozy na czczo i 2 godziny po posiłku (w dawce 50 mg/kg) oraz zwiększały poziom insuliny w surowicy (w dawce 10 mg/kg). Badanie przeprowadzono na szczurach cierpiących na cukrzycę typu 2 indukowaną nikotynamidem-STZ (AbouZid i in. 2014) Zmiany w naczyniach krwionośnych wywołane cukrzycą mogą zwiększać patofizjologiczną aktywność metaloproteinaz (MMP). Wiadomo, że hamowanie MMP może poprawić oporność na insulinę i stres oksydacyjny (Araujo i in. 2015; Kłysik i in. 2010). Araujo i in. (2015) wykazali potencjał hipoglikemiczny liści *M. nigra* poprzez zmniejszenie ekspresji i aktywności MMP-2 w wątrobach szczurów z cukrzycą. Ponadto kilka związków fenolowych i izoprenylowanych flawonoidów wyizolowanych z ekstraktów gałązek *M. nigra* wykazało dobre działanie przeciwcukrzycowe, obejmujące mechanizmy aktywacji receptora gamma aktywowanego przez proliferatory peroksysomów (PPAR γ) (Xu i in. 2018a) i inhibicję α -glukozydazy (Xu i in. 2018b). Jednak 3-tygodniowe podawanie wodnego ekstraktu z liści morwy czarnej nie wpłynęło na poziom glukozy w surowicy u ciężarnych szczurów- z cukrzycą lub zdrowych (Volpato i in. 2011).

Związki zawarte w morwie czarnej wykazują efekt gastroprotekcyny. Udokumentowano, że w przypadku mysiego wrzodu żołądka indukowanego etanolem wysokie dawki (300 mg/kg) metanolowego ekstraktu z owoców *M. nigra* działały ochronnie. Wynik badania potwierdzono metodami makroskopowymi i mikroskopowymi stwierdzając, iż stopień uszkodzenia nabłonka w tkance żołądkowej został zmniejszony. Ekstrakt zapobiegał wyczerpaniu zasobów glutationu (GSH) i sprzyjał częściowej redukcji wodorotanlenków lipidowych (szkodliwych związków powstających podczas utleniania, LOOH) w owrzodzonej błonie śluzowej żołądka. Mechanizm gastroprotekcynowego działania nie opiera się na regulacji wydzielania kwasu żołądkowego, stąd też pozbawiony jest działań niepożądanych standardowej terapii- tj. np. hipergastrynemii, hiperplazji komórek enterochromafinopodobnych, zanikowego zapalenia błony śluzowej żołądka.

Pigmentacja melaniny w skórze jest ważnym mechanizmem obronnym przed promieniowaniem ultrafioletowym, jednak nieprawidłowa hiperpigmentacja melaniny katalizowana przez enzym tyrozinazę może powodować istotne problemy estetyczne. Inhibitory tyrozinazy stają się coraz ważniejsze w leczeniu zaburzeń skóry związanych z pigmentacją i poprawą wybielania skóry jako strategia anti-melanogeniczna. Przeprowadzono badanie dotyczące hamującego oddziaływania związku wyizolowanego z łodygi *M. nigra* (2,4,2', 4'-tetrahydroksy-3- (3-metylo-2-butenylo) –chalkonu, TMBC) na aktywność tyrozinazy i biosyntezę melaniny. Ponadto TMBC znacząco obniżyło zawartość melaniny i komórkową aktywność tyrozinazy w komórkach czerniaka B16, chociaż zwiększyło poziomy mRNA komórkowej tyrozinazy (Zhang i in. 2009). Zheng i in. (2010) przebadali związki aktywne wyizolowane z korzeni morwy czarnej pod kątem właściwości hamujących tyrozinazę - 29 wykazywało taką aktywność, natomiast 9 spośród nich wyższą niż dobrze poznany i powszechnie stosowany kwas kojowy. Natomiast w innym badaniu dowiedziono, że standaryzowane ekstrakty metanolowe z liści *M. nigra* wykazywały aktywność hamującą tyrozinazę, z IC₅₀ w zakresie od 5,00 do 8,49 μ g/ml przy jednoczesnym braku cytotoksyczności ocenianym za pomocą testu MTT (referencyjny test umożliwiającym pomiar aktywności przemian energetycznych w mitochondriach) na mysich i ludzkich komórkach czerniakach, ludzkich keratynocytach i mysich fibroblastach. Preparaty z *M. nigra* to obiecujące naturalne środki przeciwdziałające przebarwieniom skóry (De Freitas i in. 2016).

Metanolowy wyciąg z owoców morwy czarnej poprzez stymulację receptorów muskarynowych wykazuje działanie przeczyszczające (Rodrigues i in. 2019), natomiast dichorometanolowy z liści silnie przeciwzapalne. Tradycyjne zastosowanie owoców morwy czarnej polega na obniżaniu gorączki, regeneracji stawów, ochronie wątroby przed szkodliwymi czynnikami, obniżaniu ciśnienia krwi czy leczeniu stanów zapalnych dróg moczowych (Ercisli i in. 2010).

3. Definicja superfoods

Pod pojęciem żywności funkcjonalnej rozumiemy żywność, która na podstawie wyników badań naukowych może przyczyniać się do osiągnięcia określonej odpowiedzi organizmu człowieka, a także odgrywać ważną rolę w kierunku zapobiegania chorobom cywilizacyjnym, czy też stanowić

czynnik promocji zdrowia. Możliwe korzystne właściwości żywności funkcjonalnej wynikają z ich zawartości składników bioaktywnych, o określonych właściwościach biologicznych i działaniu w organizmie człowieka. Jednocześnie aktualne badania naukowe potwierdzają potencjalne korzystne właściwości różnych konwencjonalnych produktów spożywczych, takich jak na przykład zielona kawa, herbata, jagody Goji, owoce grantowca, rokitnik, jarmuż, pieprzyca peruwiańska, które są znane pod pojęciem „superfoods”. Termin po raz pierwszy został użyty przez Aarona Mossa w czasopiśmie *Nature Nutrition* w 1998. Według Wolfe „superfoods” to naturalne nieprzetworzone produkty, które według badań naukowych, za pomocą zawartych w nich związków aktywnych pomagają zoptymalizować zdolność organizmu do prawidłowego funkcjonowania (Wolfe 2009). Najważniejsze bioaktywne prozdrowotne składniki zawarte w „superfoods” to związki o aktywności antyoksydacyjnej, wielonienasycone kwasy tłuszczowe, witaminy, minerały, mikroorganizmy probiotyczne, niezbędne aminokwasy, polisacharydy i różne enzymy. Jedną z metod prewencji coraz powszechniej występujących chorób cywilizacyjnych jest przyjęcie odpowiednich wzorców żywieniowych i stanowi to stale rosnący trend konsumencki (Proestos 2018).

4. Podsumowanie

Morwa czarna dzięki obecności licznych prozdrowotnych związków bioaktywnych zyskała status „superfood” w krajach europejskich, gdzie jest uprawiana ze względu na jej owoce. Dalsze badania nad właściwościami i działaniem składników fitochemicznych zawartych w różnych genotypach *M. nigra* przyczynią się do większego docenienia i rozpowszechnienia wiedzy o wartości nutraceutycznej i leczniczej tej rośliny, co w konsekwencji będzie sprzyjać wzrostowi jego konsumpcji. Ważnym aspektem prewencji chorobom, także cywilizacyjnym jest stosowanie zbilansowanej diety (Krishna i in. 2018).

5. Literatura

- Abd El-Mawla AM, Mohamed KM, Mostafa AM (2011) Induction of Biologically Active Flavonoids in Cell Cultures of *Morus nigra* and Testing their Hypoglycemic Efficacy. *Scientia Pharmaceutica* 79: 951–961.
- AbouZid SF, Ahmed OM, Ahmed RR i in. (2014) Antihyperglycemic effect of crude extracts of some Egyptian plants and algae. *Journal of Medicinal Food* 17: 400–406.
- Aramwit P., Bang N., Srichana T., 2010. The properties and stability of anthocyanins in mulberry fruits. *Food Research International* 43,4: 1093–1097.
- Araujo CM, Lúcio Kde P, Silva ME i in. (2015) *Morus nigra* leaf extract improves glycemic response and redox profile in the liver of diabetic rats. *Food & Function* 6: 3490–3499.
- Chen H., Yu W., Chen G., Meng S., Xiang Z., He N., 2017. Antinociceptive and Antibacterial Properties of Anthocyanins and Flavonols from Fruits of Black and Non-Black Mulberries. *Molecules* 23,1: 4 (published online) doi: 10.3390/molecules23010004.
- Collins CA, Fry FH, Holme AL i in. (2005) Towards multifunctional antioxidants: Synthesis, electrochemistry, in vitro and cell culture evaluation of compounds with ligand/catalytic properties. *Organic and Biomolecular Chemistry* 3: 1541–1546.
- De Freitas MM, Fontes PR, Souza PM i in. (2016) Extracts of *Morus nigra* L. Leaves Standardized in Chlorogenic Acid, Rutin and Isoquercitrin: Tyrosinase Inhibition and Cytotoxicity. *PLoS ONE* 11:e0163130. doi: 10.1371/journal.pone.0163130.
- Dröge W (2001) Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews* 82: 47–95.
- Ercisli S., Orhan E., 2006. Chemical composition of white (*Morus alba*), red (*Morus rubra*) and black (*Morus nigra*) mulberry fruits. *Food Chemistry* 103,4: 1380–1384
- Ercisli S., Tosun M., Duralija B., Voca S., Sengul M., Turan M., 2010. Phytochemical Content of Some Black (*Morus nigra* L.) and Purple (*Morus rubra* L.) Mulberry Genotypes. *Food Technology and Biotechnology* 48,1: 102-16

- Fahimi Z., Hadipour Jahromy M., 2018. Effects of blackberry (*Morus nigra*) fruit juice on levodopa-induced dyskinesia in a mice model of Parkinson's disease. *Journal of Experimental Pharmacology* 10: 29-35.
- Gao X., Cassidy A., Schwarzschild M.A., Rimm E.B., Ascherio A., 2012. Habitual intake of dietary flavonoids and risk of Parkinson disease. *Neurology* 78,15: 1138–1145.
- Karczmarczyk R., 2012. Morwa, brusonocja i żółtnica pomarańczowa. *Wszechświat* 113,1-3: 36-40.
- Klysik AB, Naduk-Kik J, Hrabec Z i in. (2010) Intraocular matrix metalloproteinase 2 and 9 in patients with diabetes mellitus with and without diabetic retinopathy. *Archives of Medical Science* 6: 375–381.
- Krishna H, Singh D, Singh RS i in. (2018) Morphological and antioxidant characteristics of mulberry (*Morus spp.*) genotypes. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*. doi: 10.1016/j.jssas.2018.08.002
- Proestos C (2018) Superfoods: Recent Data on their Role in the Prevention of Diseases. *Current Research in Nutrition and Food Science* 6: 576-593.
- Rahman M.M., Ichiyanaagi T., Komiyama T., Sato S., Konishi T., 2008. Effects of anthocyanins on psychological stress-induced oxidative stress and neurotransmitter status. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56,16: 7545–7550.
- Rodrigues E.L., Marcelino G., Torres G.S., Figueiredo P.S., Garcez W.S., Corsino J., Cássia Avellaneda Guimarães R., Cássia Freitas K., 2019. Nutraceutical and Medicinal Potential of the *Morus* Species in Metabolic Dysfunctions. *Molecules* 20,2: 301 (published online) doi: 10.3390/ijms20020301.
- Volpato GT, Calderson IMP, Sinzato S i in. (2011) Effect of *Morus nigra* aqueous extract treatment on the maternal-fetal outcome, oxidative stress status and lipid profile of streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology* 138: 691–696.
- Wolfe D (2009) Superfoods: The food and medicine of the future. California: North Atlantic Books 10-49.
- Xu L, Yu M, Niu L i in. (2018) Phenolic compounds isolated from *Morus nigra* and their α -glucosidase inhibitory activities. *Natural Product Research* 130:451–465.
- Xu LJ, Yu MH, Huang CY i in. (2018) Isoprenylated flavonoids from *Morus nigra* and their PPAR γ agonistic activities. *Fitoterapia* 127:109.
- Zhang X, Hu X, Hou A i in. (2009) Inhibitory effect of 2,4,2',4'-tetrahydroxy-3-(3-methyl-2-butenyl)-chalcone on tyrosinase activity and melanin biosynthesis. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 32: 86–90.
- Zheng ZP, Cheng KW, Zhu Q i in. (2010) Tyrosinase inhibitory constituents from the roots of *Morus nigra*: A structure-activity relationship study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58: 5368–5373.
- Ziaei A., Nasri S., Roushani M., Niknami Z., 2012. The Effect of Blackberry Extract on Parkinson [MS thesis]. Payame Noor University of Tehran, Tehran; 2012.
- Zoofishan Z., Hohmann J., Hunyadi A., 2018. Phenolic antioxidants of *Morus nigra* roots, and antitumor potential of morusin. *Phytochemistry Reviews* 17,5: 1031-1045.

5. Wpływ techniki ekstruzji na biomasę lignocelulozową

Impact of extrusion-cooking technique on lignocellulosic biomass

Kupryaniuk Karol⁽¹⁾, Oniszcuk Tomasz⁽¹⁾, Lisiecka Katarzyna⁽¹⁾, Kłapsia Sybilla⁽²⁾

⁽¹⁾ Katedra Techniki Ciepłej i Inżynierii Procesowej, Wydział Inżynierii Produkcji, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

⁽²⁾ Zakład Chłodnictwa i Energetyki Przemysłu Spożywczego, Wydział Inżynierii Produkcji, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Opiekun naukowy: Tomasz Oniszcuk

Karol Kupryaniuk: karol.kupryaniuk@o2.pl

Słowa kluczowe: ekstruzja, celuloza, biomasa

Streszczenie

Celem pracy jest uzyskanie za pomocą techniki ekstruzji taniego i wysokoenergetycznego substratu lignocelulozowego do stosowania w biogazowniach rolniczych. Badaniom poddano wybrane substraty lignocelulozowe, m.in. zdrewniałe siano straw, słomę zbóż, łodygi topinamburu, otręby z młyna i słomę kukurydzianą. Ekstruzję prowadzono przy wykorzystaniu ekstrudera jednoślimakowego TS-45 z zastosowaniem zmiennej prędkości obrotowej ślimaka i zmiennego poziomu dowilżenia surowców. Podczas procesu oceniano wydajność i energochłonność procesu ekstruzji, a następnie zbadano gęstość usypową ekstrudatów, wskaźnik absorpcji wodnej oraz wskaźnik rozpuszczalności ekstrudatów. Zwiększanie prędkości obrotowej ślimaka podczas ekstruzji wpływało na wzrost wydajności i energochłonności procesu ekstruzji, nieznaczny spadek gęstości usypowej oraz wzrost wskaźnika absorpcji wodnej i wskaźnika rozpuszczalności ekstrudatów w wodzie.

1. Wprowadzenie

Najbardziej rozpowszechnioną w Europie technologią budowy biogazowni, powstających od blisko 20 lat mają Niemcy (blisko 9,5 tys.) i Włochy (2 tys.). System produkcji biogazu NaWaRo (Nach Wachsende Rohstoffe) wykorzystuje głównie kiszonki z roślin (buraków, kukurydzy, traw itp.) (Tys 2006). Inne substraty, takie jak odpady z zakładów przetwórstwa rolno-spożywczego lub z produkcji zwierzęcej wykorzystywane są w zależności od konkretnych uwarunkowań gospodarstwa (Niedziółka i in. 2006). Każda biogazownia składa się z kosza zasypowego na substrat zaopatrzonego w automatyczny podajnik, zamkniętej komory fermentacyjnej (lub kilku komór), agregatu kogeneracyjnego, sterowni i zbiornika na poferment. Poferment jako surowiec odpadowy z produkcji metanu, często wykorzystywany jest w rolnictwie do nawożenia i użyźniania gruntów rolnych. W Niemczech powierzchnia pod uprawę kukurydzy dla biogazowni zajmuje 10% użytków rolnych, co roku biogazownie w Niemczech wykorzystują 60 mln ton kiszonki. Kiszonka kukurydziana prócz wykorzystania w biogazowniach rolniczych wykorzystywana jest jako karma przy chowie zwierząt gospodarskich głównie w okresie jesienno-zimowym. Zakiszenie prowadzi się przy wykorzystywaniu różnych rodzajów magazynów, do których zalicza się: przyzmy, rękawy foliowe, silosy przejazdowe oraz płyty kisonkowe. Aby kukurydza była poprawnie zakiszona, proces tworzenia przyzmy kisonkowej powinien trwać możliwie jak najkrócej (1 – 3 dni). Po odpowiednim równomiernym rozrzuceniu zielonki następuje jej ugniecenie i przykrycie folią, dzięki czemu zielonka przechowywana jest w warunkach beztlenowych. Takie warunki sprzyjają zakwaszeniu się masy roślinnej kwasem mlekowym. Szacuje się, że kiszonka kukurydziana zdatna jest do skarmiania zwierząt po upływie od 6 do 8 tygodni od czasu zamknięcia przyzmy. Dofinansowanie do produkcji energii elektrycznej w Niemczech (do 270 Euro za MWh) jest prawie dwukrotnie wyższe niż w Polsce (560 zł za MWh), dlatego w Polsce powinno się unikać stosowania kiszonki i poszukiwać innych substratów. Obiecującym substratem jest biomasa lignocelulozowa (czyli różnego rodzaju słomy), której mamy w Polsce ponad 30 mln ton. Słoma kukurydziana posiada wysoki plon suchej masy (do

15 Mg ha⁻¹). W biogazowniach może być wykorzystywana słoma z kukurydzy, której wydajność energetyczna z 1 Mg jest ok. trzykrotnie wyższa niż wydajność energetyczna takiej samej ilości kiszonki kukurydzianej. Za optymalny rozdrobnienie zielonki przyjmuje się długość od 4 do 8 mm. Kolejnym surowcem, który potencjalnie może być stosowany jako substrat do biogazowni po obróbce wstępnej jest zdrewniałe siano traw, które nie nadaje się na pasze dla zwierząt, a w stanie surowym nie nadaje się do wykorzystania w biogazowniach. Słoma zbóż, głównie wykorzystywana jest jako ściółka przy chowie każdego rodzaju zwierząt gospodarskich, wykorzystywana jest jako paliwo alternatywne, jednak należy do uciążliwych paliw, których spalanie wymaga specjalnie skonstruowanych kotłów, a z powodu powstającego kożucha surowiec ten rzadko stosowany jest w biogazowniach. Wykorzystywane są dwa rodzaje słomy, żółta, która jest zbierana bezpośrednio po żniwach oraz szara, która pozostawiana jest na polu i poddawana zmiennym warunkom atmosferycznym a następnie zbierana i suszona. Słonecznik bulwiasty zwany powszechnie topinamburem jest rośliną wieloletnią i silnie ukorzonioną. Z jednej łodygi może wyrosnąć od kilku do kilkunastu bulw. Liście i łodygi topinamburu stanowią karmę dla zwierząt gospodarskich, a także znajdują zastosowanie w postaci kiszonki. Duży potencjał energetyczny tej rośliny wynika z tego, że na cele biogazowe mogą być przydatne zarówno bulwy, jak i łodygi. Potencjalnym surowcem, który może być wykorzystany na cele biogazowe są również otręby z młyna, które są surowcem odpadowym z oczyszczania ziarna zbóż, obecnie wykorzystywanym głównie na pasze dla zwierząt. Pozyskiwanie biogazu z biomasy lignocelulozowej jest długotrwałym procesem zajmującym standardowo ok. 125 dni, podczas gdy z kiszonki około 28 dni. Spowodowane jest to trudną do rozkładu strukturą związków lignocelulozowych. Stąd bardzo ważne jest zniszczenie struktur lignocelulozowych przed procesem fermentacji w celu ich lepszej dostępności dla bakterii do fermentacji beztlenowej. Technika ekstruzji, stosowana głównie w przemyśle spożywczym, może być jedną z metod stosowanych do obróbki wstępnej surowców lignocelulozowych. Zastosowanie tej techniki pozwala na rozbicie wiązań w strukturach lignocelulozy, utworzenie większej ilości łatwiej przyswajalnych cukrów prostych, dzięki czemu proces fermentacji metanowej przebiega szybciej przy jednoczesnym wzroście uzysku metanu (Mościcki 2011).

2. Materiał i metody

Do badań wykorzystano surowce lignocelulozowe, które dotychczas nie są powszechnie stosowane w biogazowniach. Wykorzystano słomę kukurydzianą, zdrewniałe siano traw, słomę zbożową, łodygi topinamburu (słonecznik bulwiasty) oraz otręby z młyna. Surowce rozdrobniono do wielkości od 5 do 10 mm, następnie dowlżono do 4 poziomów wilgotności (25, 30, 35 i 40%). Nawilżone surowce poddawano procesowi ekstruzji stosując 3 prędkości obrotowe ślimaka ekstrudera (70, 90 i 110 obr/min⁻¹) oraz zakres temperatur: sekcja 1 - 120°C, sekcja 2 - 130°C i głowica 130°C. Wykorzystano ekstruder jednoślímakowy TS-45 uzbrojony w ślímak o L/D = 12. W trakcie ekstruzji badano wydajność i energochłonność procesu, a otrzymane ekstrudaty poddano badaniom wybranych właściwości fizykochemicznych.

Badania eksploatacyjne podczas procesu ekstruzji obejmowały:

- pomiar wydajności procesu ekstruzji wg:

$$Q = \frac{m}{t} [kg h^{-1}]$$

gdzie:

m – masa ekstrudatu otrzymanego w trakcie pomiaru [kg],

t - czas pomiaru [h];

- pomiar energochłonności procesu:

$$SME = \frac{n P O}{n_m Q} [kWh kg^{-1}]$$

gdzie:

SME- wskaźnik specyficznego zapotrzebowania energii mechanicznej,

n - obroty ślímaka ekstrudera [min⁻¹],

P – moc znamionowa [kW],

O – obciążenie silnika w stosunku do obciążenia maksymalnego [%],

n_m – maksymalne obroty ślimaka [min^{-1}],

Q – wydajność procesu [kg h^{-1}].

Po przeprowadzeniu procesu ekstruzji zbadano:

-gęstość usypową ekstrudatów (wg BN-87/9135-09):

$$\rho_u = \frac{m_u}{v} [\text{kg m}^{-3}]$$

gdzie:

m_u – masa próbki [kg],

v – objętość pojemnika [m^3],

- wskaźnik absorpcji wodnej (Anderson i Griffin 1969):

$$WAI = \frac{m_z - m_k}{m_p} [g g^{-1}]$$

gdzie:

m_z – masa kolby z żelazem [g],

m_k – masa kolby [g],

m_p – masa próby [g],

- wskaźnik rozpuszczalności ekstrudatów w wodzie (Wójtowicz i in. 2015):

$$WSI = \frac{m_s - m_{ps}}{m_{pp}} 100 [\%]$$

gdzie:

m_s – masa naczynka po suszeniu [g],

m_{ps} – masa naczynka przed suszeniem [g],

m_{pp} – masa próby [g].

Do wyznaczenia wpływu zmiennych parametrów procesu ekstruzji na poszczególne cechy wykorzystano metodę powierzchni odpowiedzi RSM (ang. response surface methodology), która pozwoliła na opracowanie modeli kwadratowych odpowiedzi na dane wejściowe wraz z równaniami regresji wielorakiej.

3. Wyniki i wnioski

Parametry procesu ekstruzji w zależności od zastosowanych surowców, obrotów ślimaka oraz poziomu ich wilgotności rejestrowano w kartach produkcji, której przykład przedstawiono w tabeli 1. Na tej podstawie określono stabilność procesu ekstruzji. Dla przykładu, temperatura wytwarzania ekstrudatów przy prędkości obrotowej ślimaka ekstrudera 70 obrmin^{-1} , wynosiła od 120°C do 150°C .

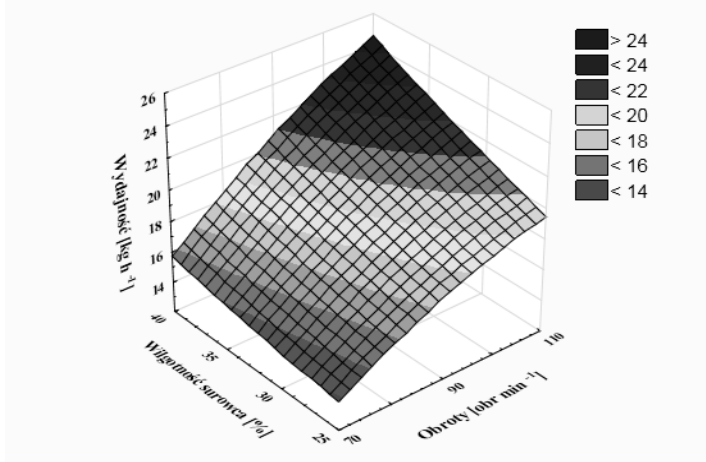
W trakcie procesu ekstruzji wyznaczono wydajność procesu. Wyniki pomiaru wydajności procesu ekstruzji otrąb z młyna przedstawiono na rys 1.

Podczas ekstruzji tego surowca zaobserwowano, że wyższy poziom dowilżenia surowca oraz wyższa prędkość obrotowa ślimaka ekstrudera miały istotny wpływ na zwiększenie wydajności procesu. Najwyższe wydajności odnotowano podczas ekstruzji otrąb z młyna (do 26 kg h^{-1}). Najniższe wydajności zaobserwowano w przypadku podczas ekstruzji łądzyg topinamburu (rys. 2). W przypadku tego surowca prędkość obrotowa ślimaka ekstrudera nie miała istotnego wpływu na wydajność procesu a zwiększanie wilgotności wstępnej surowca wpływało na uzyskiwanie wyższej wydajności podczas ekstruzji.

Tab.1. Przykładowa karta produkcji wybranych materiałów lignocelulozowych przy prędkości ślimaka 70 obrmin⁻¹

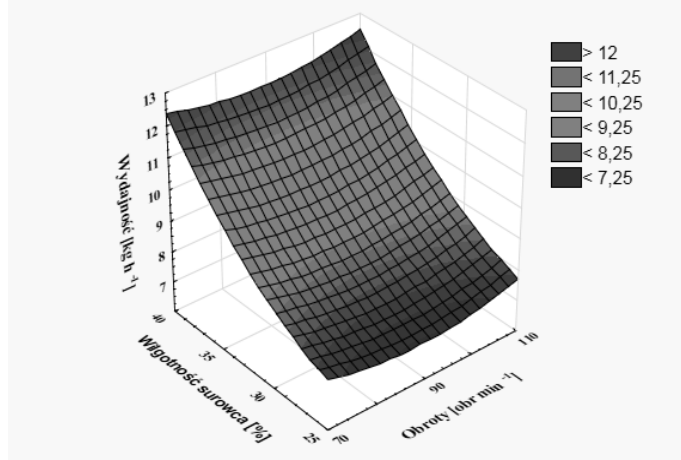
Surowiec	Wilgotność [%]	Temperatura [°C]				
		I sekcja	II sekcja	produkt	głowica	chłodzenie
Zdrewniałe siano traw	25	127	137	94	128	123
	30	131	145	100	137	116
	35	135	138	98	132	106
	40	125	134	90	123	105
Słoma kukurydziana	25	130	142	90	107	125
	30	134	150	85	112	109
	35	126	138	93	114	109
	40	129	132	95	121	113
Słoma zbóż	25	138	150	98	120	124
	30	130	144	94	105	128
	35	129	137	85	107	124
	40	120	125	97	118	115

$$\text{Wydatność [kg h}^{-1}\text{]} = 0,7025 + 0,3039 \cdot x - 0,455 \cdot y - 0,0017 \cdot x^2 + 0,0055 \cdot x \cdot y + 0,003 \cdot y^2$$



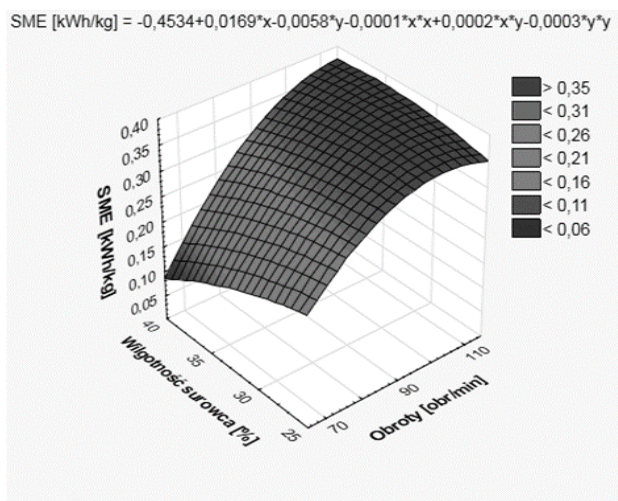
Rys. 1. Wyniki pomiaru wydajności procesu ekstruzji otrąb z młyna.

$$\text{Wydatność [kg h}^{-1}\text{]} = 20,7629 - 0,2042 \cdot x - 0,4903 \cdot y + 0,0011 \cdot x^2 + 3E-5 \cdot x \cdot y + 0,0124 \cdot y^2$$



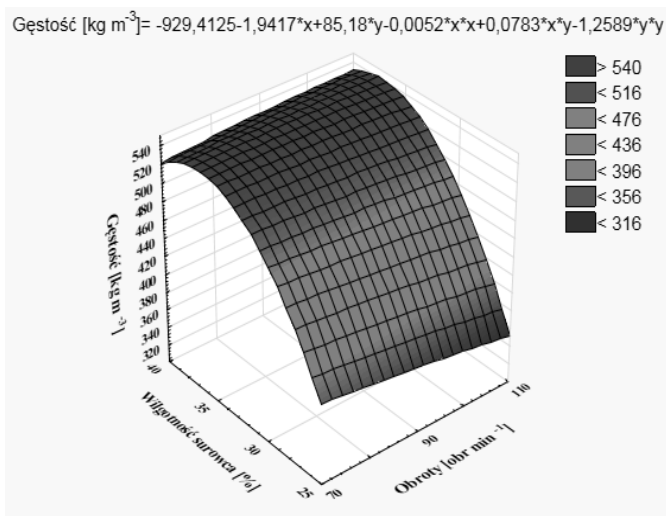
Rys. 2. Wyniki pomiaru wydajności procesu ekstruzji łodyg topinamburu.

Kolejnym badanym parametrem był wskaźnik energochłonności. W przypadku wyznaczania zapotrzebowania jednostkowego na energię mechaniczną SME procesu ekstruzji materiałów lignocelulozowych zaobserwowano, że dla większości badanych surowców wraz ze wzrostem prędkości obrotowej ślimaka ekstrudera wzrastała energochłonność procesu. Najwyższe wartości wskaźnika SME zaobserwowano w przypadku łodyg topinamburu (rys. 3).



Rys. 3. Wyniki pomiaru wskaźnika SME podczas ekstruzji łodyg topinamburu.

Po procesie ekstruzji przeprowadzono pomiar gęstości usypowej ekstrudatów. W przypadku wyników tego badania znacznie wyższymi wartościami gęstości w stanie usypowym niż w przypadku pozostałych badanych materiałów charakteryzowały się ekstrudaty wytworzone z otrąb, gdzie gęstość sięgała 540 kg m^{-3} przy zastosowaniu najwyższego poziomu dowlżenia surowców (rys. 4). W tym przypadku nie stwierdzono wpływu prędkości ślimaka na wartości gęstości usypowej ekstrudatów. W przypadku pozostałych substratów wyniki pomiaru gęstości były zbliżone i wynosiły od 89 do 109 kg m^{-3} . Nieznacznie wyższe wyniki pomiarów gęstości usypowej zaobserwowano dla ekstrudowanego zdrewniałego siana traw gdzie gęstość usypowa sięgała do 120 kg m^{-3} .

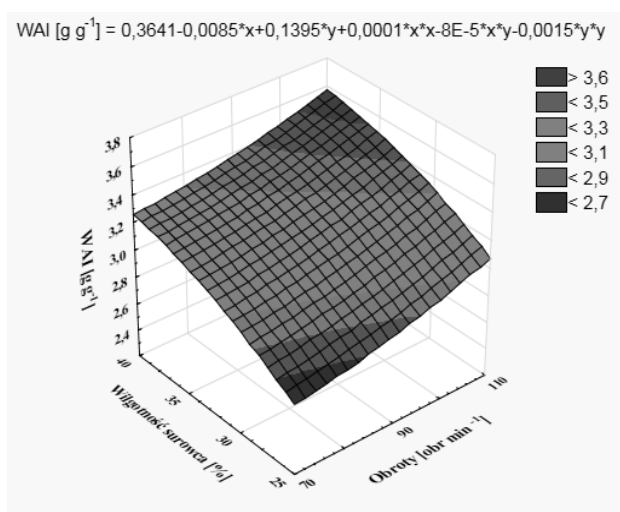


Rys. 4. Wyniki pomiaru gęstości usypowej ekstrudowanych otrąb z młyna.

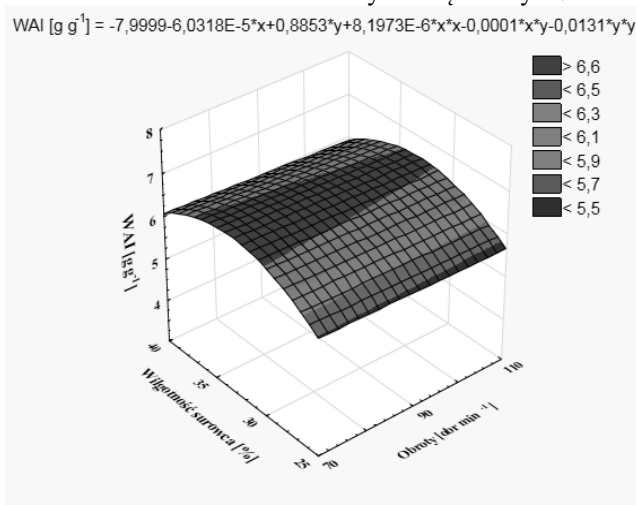
Wskaźnik absorpcji wody jest niezwykle istotny przy określaniu charakterystyki materiałów do zastosowania w biogazowniach. Przeprowadzone badania wskaźnika absorpcji wodnej wykazały, że znacznie niższy wskaźnik absorpcji odnotowano dla ekstrudowanych otrąb z młyna w porównaniu do innych ekstrudowanych substratów (rys. 5). W przypadku tego surowca najwyższy pomiar ($3,59 \text{ gg}^{-1}$) był niższy od najniższych pomiarów pozostałych surowców (powyżej $5,50 \text{ gg}^{-1}$).

Najwyższy wskaźnik absorpcji wodnej odnotowano dla ekstrudowanej słomy zbóż, który wyniósł $7,29 \text{ g g}^{-1}$, pomiar ten zaobserwowano podczas analizy ekstrudatu dowilżonego do poziomu wilgotności 30% (rys. 6). Generalnie stwierdzić można, że zwiększanie poziomu dowilżenia substratów przed ekstruzją powodowało uzyskanie wyższej wodochłonności, co w przypadku zastosowania materiałów lignocelulozowych do biogazowni jest korzystne.

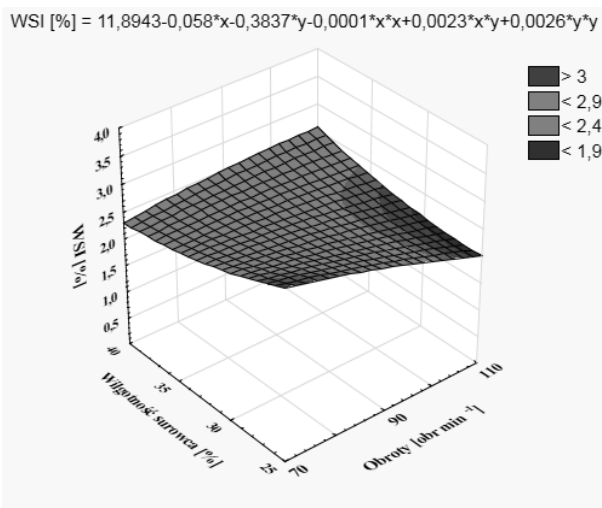
Kolejny etap obejmował pomiar wskaźnika rozpuszczalności w wodzie. W przypadku tego badania najniższe obserwacje odnotowano dla ekstrudowanej słomy kukurydzianej, dla której wraz ze wzrostem poziomu wilgotności surowca oraz zwiększaniem prędkości obrotowej ślimaka ekstrudera wskaźnik rozpuszczalności WSI obniżał się (rys. 7).



Rys. 5. Wyniki pomiaru wskaźnika WAI ekstrudowanych otrąb z młyna.



Rys. 6. Wyniki pomiaru wskaźnika WAI ekstrudowanej słomy zbóż.



Rys. 7. Wyniki pomiaru wskaźnika WSI ekstrudowanej słomy kukurydzianej.

4. Podsumowanie

Na podstawie przeprowadzonych badań zaobserwowano, że zastosowanie techniki ekstruzji do wstępnej obróbki surowców lignocelulozowych wpłynęło w zróżnicowany sposób na właściwości potencjalnych substratów do biogazowni. Na uwagę z punktu widzenia eksploatacji biogazowni zasługuje zwłaszcza fakt, że biomasa poddana procesowi ekstruzji tonie i nie tworzy kożucha, a zastosowanie odpowiedniego poziomu dowilżenia materiałów przed ekstruzją oraz dostosowanej do obrabianego materiału prędkości ślimaka podczas ekstruzji może być wykorzystane do regulowania właściwości ekstrudowanych surowców lignocelulozowych, takich jak gęstość usypowa, wodochłonność czy rozpuszczalność. Zastosowanie zbyt wysokiego poziomu dowilżenia może spowodować płynięcie obrabianego materiału co może wpłynąć negatywnie na późniejsze wykorzystanie ekstrudatu. Ekstrudowana biomasa lignocelulozowa opada na dno dzięki czemu nie zalega w komorze fermentacyjnej, przez co wsad jest w ciągłym ruchu i nie dochodzi do zatkania komory. Powstający kożuch mógłby przyczynić się do zatkania komory, konsekwencją czego byłoby zatrzymanie pracy biogazowni, konieczność demontażu i ponowny montaż wraz z uruchomieniem. Całość tych prac jest czasochłonna i kosztowna. W przyszłych badaniach należałoby się skupić na różnicy w poziomie rozdrobnienia surowców oraz jego wpływie na wydajność procesu ekstruzji, a także różnicę w uzysku metanu. Wśród biomasy lignocelulozowej jest wciąż spory potencjał niewykorzystywanych surowców, które mogłyby znaleźć swoje zastosowanie w biogazowniach rolniczych.

5. Literatura

- Anderson RA, Griffin EL (1969) Gelatinization of corn grits by roll and extrusion cooking. *Cereal Science Today* 14:14-12.
- BN-87/9135-09 Pasze prasowane. Oznaczanie gęstości w stanie usypowym granul i brykietów
- Mościcki L (2011) *Extrusion-cooking techniques. Applications, Theory and Sustainability*, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany.
- Niedziółka I, Szymanek M, Zuchniarz A (2006) Analiza wartości opałowej resztek poźniwnych kukurydzy pastewnej. *Inżynieria Rolnicza* 11(86): 343-349.
- Tys J (2006) *Rzepak, zbiór, suszenie, przechowywanie*. Wydawnictwo Instytut Agrofizyki PAN, Lublin.
- Wójtowicz A, Mitrus M, Oniszczyk T et al. (2015) Selected physical properties, texture and sensory characteristics of extruded breakfast cereals based on wholegrain wheat flour. *Agriculture and Agricultural Science Procedia* 7:301-308.

6. Surowce lignocelulozowe stosowane w biogazowniach rolniczych

Lignocellulosic raw materials used in agricultural biogas plants

Kupryaniuk Karol⁽¹⁾, Oniszczyk Tomasz⁽¹⁾, Rodzeń Anna⁽²⁾, Kasprzak Kamila⁽³⁾

⁽¹⁾ Katedra Techniki Ciepłej i Inżynierii Procesowej, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

⁽²⁾ Katedra Energetyki i Środków Transportu, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

⁽³⁾ Katedra Chemii Nieorganicznej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

Opiekun naukowy: Tomasz Oniszczyk

Kupryaniuk Karol: karol.kupryaniuk@o2.pl

Słowa kluczowe: biomasa, ekstruzja, lignoceluloza

Streszczenie

W rolnictwie wciąż generowane są odpady w postaci tzw. biomasy lignocelulozowej, do której można zaliczyć między innymi słomę kukurydzianą, siano oraz łądygi zdrewniałych traw. Surowcami najczęściej stosowanymi w biogazowniach rolniczych są kiszonki z roślin, np. traw z kukurydzy, która ze względu na zawartość cukru ma znaczący udział w procesie fermentacji prowadzonym w biogazowniach rolniczych. Pełne zagospodarowanie tych surowców jako substratu do produkcji biogazu możliwe jest dopiero po przeprowadzeniu obróbki wstępnej, której przykładem może być proces ekstruzji. Przeprowadzenie tego procesu umożliwia zerwanie wiązań lignocelulozowych, dzięki czemu substrat jest efektywniej fermentowany.

1. Wprowadzenie

Sektor rolniczy w dalszym ciągu nie w pełni wykorzystuje odpady organiczne w postaci tzw. biomasy lignocelulozowej, do której można zaliczyć słomę kukurydzianą, słomę rzepakową, zdrewniałe łądygi traw, liście oraz siano (Bruni i in. 2010). W ostatnich latach coraz prężniej rozwijają się technologie pozwalające zagospodarować te odpady. Jako przykład można podać możliwość ich wykorzystania w biogazowniach rolniczych, w których produkowana może być energia cieplna lub elektryczna. Poprzez przeprowadzenie procesu fermentacji metanowej możliwe jest zutilizowanie substancji biodegradowalnych stanowiących obciążenie dla ekosystemu. Pełne zagospodarowanie tych surowców jako substratu do produkcji biogazu możliwe jest dopiero po przeprowadzeniu obróbki wstępnej, która umożliwia zerwanie wiązań lignocelulozowych, co wpływa na zwiększenie wydajności wytwarzania biogazu, w tym metanu (Tong i in. 1990, Kozłowski i in. 2018, Dach i in. 2014). Pozyskiwanie biogazu na drodze fermentacji metanowej jest skomplikowanym procesem, wymagającym optymalizacji czasu przebiegu procesu oraz pełniejszego wykorzystania biomasy przez bakterie beztlenowe, dlatego wciąż trwają poszukiwania alternatywnych rozwiązań wpływających bezpośrednio na ilość oraz skład jakościowy biogazu.

Lignoceluloza jest polimerem składającym się z trzech głównych frakcji: celulozowej (40-55% suchej masy), hemicelulozowej (24-40% suchej masy) i ligninowej (18-25% suchej masy). Dzięki temu, że należą one do długołańcuchowych polisacharydów, które są hydrolizowane do mieszaniny pentoz i heksoz, mogą być wykorzystywane jako substrat do produkcji biogazu (Tan i in. 2008). Wśród metod obróbki wstępnej biomasy lignocelulozowej wyróżniamy cztery podstawowe: biologiczną, chemiczną, mechaniczną oraz ciśnieniowo-termiczną. Każda z metod obróbki wstępnej ma wpływ zarówno na surowiec, jak i na późniejszy proces technologiczny, przez co nie da się jednoznacznie określić, która z technik jest najlepsza. Istnieje też możliwość połączenia kilku metod obróbki wstępnej, uzyskując tym samym lepsze efekty podczas przeprowadzania kolejnych procesów technologicznych. Wykorzystanie kilku metod obróbki wstępnej wiąże się z wydłużeniem czasu oraz ze zwiększeniem nakładów energetycznych. Wzrost zależności ekonomicznej krajów nieposiadających naturalnych złóż energetycznych od krajów posiadających je oraz zwiększenie cen surowców kopalnych wpływają na fakt, że wykorzystanie odnawialnych źródeł energii (OZE), w tym biomasy lignocelulozowej, jest priorytetem gospodarczym państw członkowskich Unii Europejskiej

oraz Stanów Zjednoczonych (Balat i in. 2008, Gizińska-Górna i in. 2016, Kowalczyk-Juśko i in. 2017).

2. Obróbka wstępna

Do przeprowadzenia obróbki mikrobiologicznej wykorzystywane są mikroorganizmy występujące w warunkach naturalnych. Można tu wyróżnić drożdże, bakterie celulozowe oraz bakterie i grzyby występujące w procesie kompostowania. Ich działanie koncentruje się głównie na celulozie i hemicelulozie, praktycznie nie trawiąc przy tym ligniny. W obróbce enzymatycznej używa się mieszanin β -glukozydazy i pektynazy oraz celulazy i hemicelulazy. Konsekwencją tego procesu jest hydroliza biomasy lignocelulozowej. Udział grzybów powoduje degradację ligniny i hemiceluloz, podczas gdy celuloza pozostaje odporna na ich działanie. Proces ten odbywa się w określonych warunkach środowiskowych, zależnych od rodzaju zastosowanej grzybni. Jednak ze względu na niewielki uzysk biogazu oraz znaczny koszt ich zakupu, rozwiązanie to jest rzadko stosowane w biogazowniach rolniczych. Metoda biologiczna wykorzystuje bakterie, grzyby oraz produkowane przez nie enzymy. Metoda ta charakteryzuje się znacznie niższymi nakładami energetycznymi niż metody związane z obróbką mechaniczną lub termiczną. Jednak ze względu na czas (nawet do kilku miesięcy), w którym ten proces zachodzi, nie ma możliwości racjonalnego stosowania go w skali rzeczywistej.

W chemicznej obróbce wstępnej wykorzystuje się środki chemiczne, których działanie prowadzi do zachodzenia wstępnej hydrolizy biomasy. W chemicznej obróbce wstępnej można wyróżnić dwie metody: alkaliczną i kwasową. W metodzie alkalicznej wykorzystywane są związki zasadowe, takie jak wodorotlenek sodu, wapnia, potasu czy też woda amoniakalna. Metoda alkaliczna prowadzi do depolimeryzacji oraz rozpuszczenia ligniny, może też nastąpić zwiększenie powierzchni aktywnej biomasy poprzez spęcznienie i zmniejszenie stopnia krystaliczności ligniny. W kwasowej obróbce wstępnej wykorzystuje się działanie kwasów organicznych i nieorganicznych. Proces ten wymaga zastosowania odpowiednich niemetalicznych zbiorników oraz odzysku kwasu po zakończonym procesie.

Obróbka mechaniczna, do której należy mikronizacja (rozdrobienie) jest jednym z procesów szeroko stosowanych w przemyśle rolno-spożywczym. Rozdrobnione cząstki mają rozmiary kilku mikrometrów, a niekiedy nawet nanometrów. Mikronizacja znajduje zastosowanie w przemyśle farmaceutycznym do produkcji leków, a w przemyśle rolniczym stosuje się ją przy produkcji pasz lub spalania biomasy (Opielak 1996). Dochodzi wtedy do zwiększenia całkowitej powierzchni cząstek rozdrabnianego surowca, następuje zmniejszenie stopnia krystaliczności celulozy oraz stopnia polimeryzacji celulozy, co pozwala intensyfikować proces spalania biomasy. W zależności od zawartości wilgoci w surowcu, proces rozdrobnienia biomasy przeprowadzany jest za pomocą młynów kulowych, koloidalnych, pałcowych, wibracyjnych, fluidalno-strumieniowych, wylączarek oraz śrutowników. Zdaniem naukowców, wraz ze zmniejszeniem wielkości cząstek surowca (słoma pszeniczna, skoszona trawa) do wielkości od 30 do 0,088 mm następuje wzrost produkcji metanu. Zmniejszenie wielkości cząstek w czasie zbiorów wpływa pozytywnie na proces zakiszania materiału oraz na późniejszy proces fermentacji metanowej (Herrmann i in. 2012). W przypadku zmniejszenia cząstek wylóków z włókien kokosowych i łodyg trzciny cukrowej z 5 mm do wielkości poniżej 0,85 mm, wydajność wydzielania metanu zwiększyła się o 30% (Kivaisi i Eliapenda 1994). Pozytywnym aspektem stosowania rozdrabniania mechanicznego jest fakt, że podczas tego procesu nie są wytwarzane inhibitory fermentacji (furfural i hydroksymetylofurfural – HMF), dzięki czemu proces ten może być stosowany przy produkcji biometanu i etanolu.

Ekstruzja należy do procesów ciśnieniowo-termicznych, która wykorzystuje wysoką temperaturę, ciśnienie oraz powstające podczas obrotów ślimaka siły ścinające, działające na przetwarzany materiał. Wewnątrz cylindra ekstrudera następuje przekształcenie materiału i transport do dyszy, po opuszczeniu której następuje ekspandowanie biomasy (Hjorth i in. 2011, Oniszcuk i in. 2012a, Oniszcuk i in. 2012b). Do procesu ekstruzji wykorzystywane są ekstrudery jednoślিমakowe lub dwuślímakowe. Podczas tego procesu wewnątrz cylindra urządzenia panuje wysoka temperatura, sięgająca nawet do 200°C, a ciśnienie wynosi od kilku do kilkunastu MPa. W zależności od zastosowanego układu plastyfikującego oraz prędkości obrotowej ślimaka/ślímaków ekstrudera,

biomasa przebywa wewnątrz komory od kilkunastu do kilkudziesięciu sekund. Działające siły ścinające, wysokie ciśnienie i temperatura powodują rozerwanie wiązań ligniny oraz uwolnienie celuloz i hemiceluloz (Pilarska i in. 2014, Oniszczuk i in. 2014). Następuje zwiększenie powierzchni aktywnej biomasy oraz jej wstępna hydroliza, co skutkuje wyższym uzyskiem biogazu. Podczas przeprowadzania procesu ekstruzji ważnym czynnikiem jest dobór odpowiedniej wilgotności surowca oraz stopień jego rozdrobnienia. Większe rozdrobnienie wpływa na efektywniejsze wymieszanie surowców, dzięki czemu można otrzymać jednorodną mieszaninę. Natomiast zastosowanie niskich wilgotności surowców może spowodować nagromadzenie się surowca na ściankach cylindra oraz ślimaka ekstrudera, przez co może dojść do przegrzania. W tym wypadku konieczne jest zatrzymanie całego procesu oraz rozbrojenie, oczyszczenie i przebrojenie maszyny. Odpowiednie dowlżenie surowca umożliwia jego przetworzenie, niezależnie od struktury. Surowiec po opuszczeniu matrycy, w wyniku gwałtownej przemiany wody w parę wodną bardzo szybko pęcznieje, przybierając porowatą strukturę. W tym czasie surowiec zostaje otoczony przez uplastycznione struktury białkowe, które tworzą strukturę zbliżoną do plastra miodu, powstającego z połączenia skrobi i stopionych włókien białkowych. Procesy termiczne towarzyszące obróbce sprawiają, że surowiec staje się sterylny, dzięki czemu może być przechowywany w niezmienionej jakości przez 12 miesięcy. W zależności od wysokości zastosowanej temperatury obróbki, surowiec podlega zmianie barwy. Wraz ze wzrostem temperatury barwa ekstrudatu staje się ciemniejsza. Stopień przemiany włókien w procesie ekstruzji może zostać poddany ocenie poprzez pomiar wskaźnika absorpcji wodnej ekstrudatów (water absorption index – WAI) oraz pomiar rozpuszczalności ekstrudatów w wodzie (water solubility index – WSI) (Mitrus i in. 2016). Na końcowy efekt, oprócz wilgotności mieszanek oraz stopnia rozdrobnienia surowca, wpływa także wykorzystanie dodatków funkcjonalnych lub zastosowanie zróżnicowanych zmiennych parametrów podczas procesu ekstruzji. Proces ekstruzji znalazł szerokie zastosowanie w przemyśle spożywczym, do produkcji galanterii śniadaniowej, makaronów błyskawicznych, przekąsek takich jak chrupki lub smaki, wytwarzania odżywek oraz kaszek błyskawicznych dla dzieci czy też różnego rodzaju karm dla zwierząt. Dzięki procesowi ekstruzji możliwe jest także wytworzenie granulatów skrobi termoplastycznej, które są półproduktem do produkcji folii lub form sztywnych materiałów opakowaniowych (Mościcki i in. 2012, Oniszczuk i Pilawka 2013).

3. Surowce lignocelulozowe

Biomasa lignocelulozową stanowią podatne na rozkład biologiczny frakcje produktów, odpadów i pozostałości z przetwórstwa rolniczego, a także podatne na rozkład biologiczny frakcje odpadów miejskich i przemysłowych (Grobe i Scholwin 2008). Biomasa roślinną stanowią zarówno rośliny, jak i ich części (słoma, drewno, trawy, liście). Biomasa wykorzystywana do produkcji biogazu zbudowana jest z trzech podstawowych grup związków organicznych: węglowodanów, białek i tłuszczu. Jednym ze sposobów pozyskiwania surowców na cele energetyczne jest wykorzystanie nieużytków rolnych w postaci zdrewniałych traw. Jednak coraz częściej prowadzone są specjalne hodowle roślin energetycznych, do których możemy zaliczyć zieloną kukurydzą, słonecznik bulwiasty (topinambur) oraz rzepak.

Jednym z najczęściej stosowanych substratów wykorzystywanych w biogazowniach rolniczych, jest kiszonka kukurydziana. Surowiec ten, oprócz uzysku wysokiej wydajności biogazu, charakteryzuje się najwyższym plonem suchej masy z jednego hektara. Dzięki zakiszaniu może być wykorzystywany w biogazowniach rolniczych przez cały rok. Coraz częściej stosuje się specjalne odmiany tego surowca, które charakteryzują się wysokim plonem suchej masy oraz wyższą wydajnością produkcji biogazu w porównaniu z odmianami paszowymi. Kiszonki przeznaczone na biogaz powinny charakteryzować się wysoką zawartością polisacharydów. Podstawowym kryterium odpowiadającym za stosowanie tego surowca w biogazowniach rolniczych jest liczba FAO, która charakteryzuje klasę wczesności odmiany. Liczba FAO mieści się w przedziale od 100 do 1000, z czego odmiany wykorzystywane w biogazowniach powinny znajdować się w przedziale od 250 do 370. Najlepszym surowcem do produkcji biogazu są te, w których zawartość suchej masy wynosi około 30%. Natomiast rośliny zbierane w okresie pełnej dojrzałości ziarna, posiadające zawartość

suchej masy zbliżoną do 40%, mają niższą przydatność do produkcji biogazu, dlatego najkorzystniejszą porą zbioru jest faza wegetacji, zwana też woskową dojrzałością ziarna.

Do celów biogazowych stosowane są zarówno zboża ozime (pszenica, żyto, pszenżyto), jak i jare (jęczmień, owies). Zbiory przeprowadzane są w lipcu, gdy ziarna osiągną fazę dojrzałości mlecznej. Zielonki w tym czasie zawierają około 25% suchej masy, dzięki czemu nie trzeba ich podsuszać, a sam proces zakiszania przebiega dobrze. Do rozdrobienia zbóż zaleca się stosowanie siewczkarni wyposażonych w walce zgniatające ziarna. Słoma zbóż w głównej mierze wykorzystywana jest jako ściółka przy chowie zwierząt gospodarskich. Jako surowiec energetyczny słomę rozpatruje się pod względem zawartości wilgotności, składu chemicznego oraz stopnia zwiędnięcia. Ze względu na stopień zwiędnięcia można podzielić słomę na żółtą i na szarą. Słoma żółta zbierana jest bezpośrednio po żniwach, a słomę szarą pozostawia się na polu, gdzie poddawana jest zmiennym warunkom atmosferycznym, a następnie suszona. Słomą bardziej przydatną do celów energetycznych jest słoma szara, której spalanie zmniejsza wytwarzanie popiołu (Liao i in. 2004, Lantza i in. 2007). Rośliną zbożową, w całości używaną do produkcji kiszonek (GPS – Ganzpflanzensilage), jest żyto, które ma niewielkie wymagania glebowe oraz klimatyczne, dzięki czemu może być uprawiane na zimniejszych i mniej żyznych glebach. Na cele biogazowe wykorzystuje się kilka długości siewczki słomy żytniej: 1-3 mm, 8-11 mm, 10-15 mm oraz 20-40 mm.

W Polsce wśród roślin uprawianych w takich warunkach można wymienić słonecznik bulwiasty (*Helianthus tuberosus*), powszechnie zwany topinamburem, oraz wierzbę energetyczną. Pierwszy z nich należy do roślin astrowatych, którego wysokość waha się od 2 do 4 m, a wzniesiona łodyga osiąga średnicę do 3 cm (Góral 1999). Zaletą topinamburu jest to, że na cele energetyczne może być wykorzystana zarówno łodyga, jak i jej bulwy. Wierzba krzewiasta jest rośliną, której całkowity areal szacuje się na około 3000 ha. Do najczęściej występujących w Polsce wierzb zaliczamy formy krzewiaste (wiciowa, szara migdałowa i purpurowa) oraz drzewiaste (krucha, siwa i biała). Przed rozpoczęciem uprawy wierzb krzewiastej należy odpowiednio przystosować glebę. W tym celu stosuje się różnego rodzaju ochronę chemiczną lub nawożenia.

Polskie rolnictwo jest postrzegane jako liczący się producent biomasy na cele energetyczne. Według ekspertów Polska, ze względu na posiadanie dużych powierzchni odlogowych i nieużytkowych wynoszących 0,41 ha/osobę, jest w stanie przeznaczyć na ten cel od 1 do 4 mln ha (Gańko 2008, Czekala i in. 2016a, Czekala i in. 2016b). Należy jednak pamiętać o racjonalnym podejściu do planowania produkcji biomasy, której nasadzanie nie będzie negatywnie oddziaływać na produkcję żywności. Podczas planowania potencjalnej produkcji upraw wieloletnich roślin energetycznych powinno się uwzględniać: gleby gorsze wraz z maksymalnym udziałem tych gruntów, bioróżnorodność, a także obszary, na których produkcja nie może się odbywać, np. obszary chronione lub tereny, na których roczna suma opadów nie przekracza 550 mm.

4. Podsumowanie

W ostatnich latach coraz prężniej rozwijają się technologie pozwalające zagospodarować odpady. Jako przykład można podać możliwość ich wykorzystania w biogazowniach rolniczych, w których produkowana może być energia cieplna lub elektryczna. Poprzez przeprowadzenie procesu fermentacji metanowej możliwe jest zutylizowanie substancji organicznych stanowiących obciążenie dla ekosystemu. Pełne zagospodarowanie tych surowców jako substratu do produkcji biogazu, możliwe jest dopiero po przeprowadzeniu obróbki wstępnej, która umożliwi rozerwanie wiązań lignocelulozowych, a to wpływa na zwiększenie wydajności wytwarzania biogazu, w tym metanu. Obróbkę wstępną uznaje się za efektywną, gdy: poprawia się biodegradacja biomasy poprzez polepszenie dostępu substratów dla bakterii anaerobowych, cechuje się niskim zużyciem wody, energii oraz środków chemicznych, nie powoduje powstawania nowych odpadów, ogranicza straty cennych składników oraz zapewnia opłacalność procesu fermentacji metanowej. Udowodniono, że ekstrudowana biomasa lignocelulozowa tonie nie tworząc kożucha, dzięki czemu nie dochodzi do zatykania się komory fermentacyjnej. Zastosowanie obróbki wstępnej wpływa na skrócenie czasu fermentacji, dzięki czemu w krótszym okresie czasu możliwe jest uzyskanie większej ilości biogazu, a nadwyżki wyprodukowanej energii mogą być przeznaczone na pokrycie nakładów energetycznych stosowanej obróbki. W dalszym ciągu do najpopularniejszych substratów należą kiszonki, głównie

kukurydziana, którą zakisza się w silosach lub poprzez zastosowanie owinięć z folii. Do pozostałych cennych substratów można zaliczyć: zboża ozime (żyto), słomę zbóż lub wieloletnie rośliny energetyczne, a w tym słonecznik bulwiasty (topinambur) lub wierzbę energetyczną.

5. Literatura

- Balat M, Balat H, Oz C (2008) Progress in bioethanol processing. *Progress in Energy and Combustion Science* 34: 551-573.
- Bruni E, Jensen AP, Angelidaki I (2010) Comparative study of mechanical, hydrothermal, chemical and enzymatic treatments of digested biofibers to improve biogas production. *Bioresource Technology* 101(22): 8713-8717.
- Czekała W, Malińska K, Janczak D, i in. (2016a) Composting of poultry manure mixtures amended with biochar – the effect of biochar on temperature and duration of thermophilic phase. *Bioresource Technology* 200: 921-927.
- Czekała W, Smurzyńska A, Cieślak M, i in. (2016b) Biogas efficiency of selected fresh fruit covered by the Russian embargo. In: *Energy and Clean Technologies Conference Proceedings, III*: 227-233.
- Dach J, Czekała W, Boniecki P, i in. (2014) Specialised internet tool for biogas plant modelling and marked analyzing. *Advanced Materials Research* 909: 305-310.
- Gańko E (2008) Dostępne grunty oraz odpowiadający im potencjał produkcji upraw energetycznych w perspektywie 2020. *Pamiętnik Puławski* 2-17.
- Gizińska-Górna M, Czekała W, Józwiakowski K, i in. (2016) The possibility of using plants from hybrid constructed wetland wastewater treatment plant for energy purposes. *Ecological Engineering* 95: 534–541.
- Góral S (1999) Topinambur – słonecznik bulwiasty – *Helianthus tuberosus*. W: *Nowe rośliny uprawne na cele spożywcze, przemysłowe i jako odnawialne źródło energii*, (red) Nalborczyk E., Wyd. SGGW, Warszawa, 76-86.
- Grobe L, Scholwin F (2008) Seminarium – Biomasa – źródło zielonej energii. *Strzelin* 7-10.
- Herrmann C, Heiermann M, Idler C, i in. (2012) Particle size reduction during harvesting of crop feedstock for biogas production I: Effects on ensiling process and methane yields. *BioEnergy Research*, 5: 926-936.
- Hjorth M, Gränitz K, Adamsen APS, Møller HB (2011) Extrusion as a pretreatment to increase biogas production. *Bioresource Technology*, 102: 4989-4994.
- Kivaisi AK, Eliapenda S (1994) Pretreatment of bagasse and coconut fibres for enhanced anaerobic degradation by rumen microorganisms. *Renewable Energy* 5: 791-795.
- Kowalczyk-Juško A, Kupryaniuk K, Oniszczyk T, i in. (2017) Applicability of Jerusalem artichoke in agricultural biogas plants as maize silage alternative. *Proceedings of 3rd International Conference on Energy and Environment, University of Porto, Porto, Portugal*, https://www.fep.up.pt/conferences/icee2017/images/ICEE2017_0808_VF.pdf
- Kozłowski K., Dach J, Lewicki A, i in. (2018) Laboratory simulation of an agricultural biogas plant start-up. *Chemical Engineering & Technology* 41(4): 711-716.
- Lantza M, Svensson M, Björnsson L, i in. (2007) The prospects for an expansion of biogas systems in Sweden-Incentives, barriers and potentials. *Energy Policy* 35: 1830-1843.
- Liao C, Yan Y, Huang H (2004) Chemical elemental characteristics of biomass fuels in China. *Biomass and Bioenergy* 27: 119-130.
- Mościcki L, Mitrus M, Wójtowicz A, i in. (2012) Application of extrusion-cooking for processing of thermoplastic starch (TPS). *Food Research International* 47: 291-299.
- Mitrus M, Combrzyński M, Kupryaniuk K, i in. (2016) A study of the solubility of biodegradable foams of thermoplastic starch. *Journal of Ecological Engineering* 17(4): 184-189.
- Oniszczyk T, Wójtowicz A, Mitrus M, i in. (2012a) Influence of process conditions and fillers addition on extrusion-cooking efficiency and SME of thermoplastic potato starch. *TEKA Commission of Motorization and Energetics in Agriculture*, 12(1): 181-184.

- Oniszczyk T, Wójtowicz A, Mitrus M, i in. (2012b) Biodegradation of TPS mouldings enriched with natural fillers. TEKA Commission of Motorization and Energetics in Agriculture 12(1): 175-180.
- Oniszczyk T, Wójtowicz A, Mościcki L, i in. (2014) Characteristics of selected rheological properties of water suspensions of maize TPS biocomposites. TEKA Commission of Motorization and Energetics in Agriculture 14(4): 119-124.
- Oniszczyk T, Piławka R (2013) Wpływ dodatku włókien celulozowych na wytrzymałość termiczną skrobi termoplastycznej. Przemysł Chemiczny 2: 265-269.
- Opielak M (1996) Rozdrabnianie materiałów w przemyśle rolno-spożywczym. Cz. II., Wydawnictwo Politechniki Lubelskiej.
- Pilarska A, Pilarski K, Dach J, i in. (2014) Wpływ rozwoju biogazowni na dywersyfikację dochodów w rolnictwie. Technika Rolnicza Ogrodnicza i Leśna 1: 10-12.
- Tan KT, Lee KT, Mohamed AR (2008) Role of energy policy in renewable energy accomplishment: The case of second-generation bioethanol. Energy Policy 36(9): 3360-3365.
- Tong M, Smith LH, McCarty PL (1990) Methane fermentation of selected lignocellulosic materials. Biomass 21: 239-255.

7. Aeroponic cultivation systems in space application

Joanna Kuźma⁽¹⁾, Anna Jurga⁽²⁾

⁽¹⁾ Faculty of Mechanical and Power Engineering, Wrocław University of Science and Technology, Wyb. Wyspińskiego 27, 50-370 Wrocław, Poland

⁽²⁾ Faculty of Environmental Engineering, Wrocław University of Science and Technology, Wyb. Wyspińskiego 27, 50-370 Wrocław, Poland

Opiekun naukowy⁽¹⁾: Krzysztof Tomczuk

Opiekun naukowy⁽²⁾: Ryszard Szetela

Kuźma Joanna: joanna.kuzmaa@gmail.com

Keywords: plants cultivation, space environmental, microgravity condition

Abstract

Plant cultivation in the future extraterrestrial outpost is essential. Although, conventional soil cultivation was tested in some colony analogues (e.g. Biosphere 2), another type – a soilless cultivation might be taken into consideration. Aeroponic belongs to those group. In this system plants are kept in the air. The nutrient solution is delivered by nozzles directly to the roots. Advantages of aeroponics are: lower water and energy consumption, a lower equivalent mass and bigger yield in comparison to other types of cultivations. This study aims to provide a broad description of essential factors, which must be considered in development process of the aeroponic system and further examination of such a process in microgravity condition.

1. Introduction

Future extraterrestrial missions, especially those aimed at the long-term habitation on other celestial bodies are a matter of time. The simultaneous development of many fields of technology and science is required, with a special focus to the systems responsible for environmental condition control, which enable human habitation in unfavourable conditions. The set of such systems is called the Life Support System (Anderson et al. 2018). It includes atmosphere control system, water circulation system, waste management system and biomass cultivation system, intended for food production. This paper focuses on the last mentioned system.

Since the first shuttle flights with the science module on board, the most effective solutions for cultivating plants in conditions other than terrestrial are being sought. There are many factors that should be considered in the context of the productivity of biomass systems. And they are presented in the further part of the article.

So far, scientists have studied the widespread use of traditional soil cultivation and hydroponic cultivation considering the long-term extraterrestrial human habitation. The most important projects were carried out on Earth, such as *BIOSPHERE 2*, *BIOS-3*, *EDEN ISS* (Guo et al. 2017). However, there were also projects carried out in space environment, e.g. on Salayut, Mir Station, on a spaceship shuttle or on the International Space Station (Zabel et al. 2016). The aeroponic method of cultivating plants has not yet been widely described in relation to space systems. The purpose of this study is to describe the issues of this type of cultivation and focus on the parameters that can be affected by space environment conditions.

2. General overview

Aeroponic is a type of soilless cultivation. Its main distinction is no soil as a substrate for plant growth. However, if a substrate is defined as a root zone environment, it can be assumed that air is the substrate for aeroponic cultivation. An example of an aeroponic system is shown in Fig. 1.

In the classic aeroponic installation, the plants are grown in the cultivation bed, and their roots necks are attached to the steel frame, which allows greater oxygenation of a root zone (Komosa 2004). It should be noted that the roots zone must be located in such place, which is completely shielded from sunlight. The roots environment is regularly irrigated by spraying the nutrient solution

in a form of aerosol at specific intervals. It is essential that the injected solution contains all the macro and microelements necessary for the proper growth and development of the plants. The nutrient solution is supplied to the roots in amounts greater than the demand, therefore the unused mixture is collected in a waste tank from which after filtering, sterilization and composition correction, is recycled to the system. Thus, system is working in a quasi-closed loop. Aeroponic system enables cultivation of leafy vegetables (lettuce, spinach etc.), cucumbers, tomatoes, potatoes, cranberries, carrots, edible herbs, strawberries, but also medicinal plants, therefore it is an ideal solution for a closed loop system (Breś et al. 2016).

Comparing with classic methods of growing plants the aeroponics, has many advantages, which are primarily higher yields, better quality, greater use of the greenhouse area (through greater crop density in cultivation), greater plant growth cycle, better phytosanitary conditions, much less water consumption, eliminating the need for pesticides, and the ability of this system to regulate the temperature of the root environment, which further can improve the production efficiency of such a system.

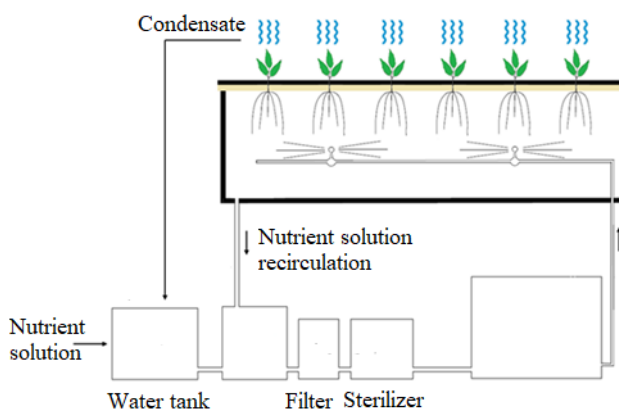


Fig. 1. Aeroponic system scheme (Komosa 2004).

An additional advantage of aeroponic cultivation is the fact that it does not use any substrate for growing. Thus, it results in a lower weight of a system, which decreases transportation costs and eliminates the problem of the substrate (e.g. coconut wool, coconut fibres) utilization, which will occur in hydroponic cultivation (Breś et al. 2016).

In comparison to other cultivation techniques, aeroponics is characterized by an increased development of a root zone, which is caused by its maximal oxygenation. It is facilitated by the fact that the roots in aeroponic do not encounter resistance to the substrate. In fact, this is the only type of cultivation in which maximum humidity does not exclude the maximum oxygenation of the root zone. As a comparison, in the case of soil cultivation, the time of optimal contact of the root zone with oxygen is lower than 45%, for aeroponic cultivation optimal contact could reach up to 100% (Breś et al. 2016).

For stimulation the physiological and metabolic processes occurring in the roots zone, the stability of the oxygenation and humidification is required. It corresponds directly to the size of the root zone, which results in increased water and mineral uptake, and thus faster and abundant yield.

Lastly, aeroponic has the ability to completely control the composition of nutrient solution supplied to the plants. This eliminates the risk of undesirable substances (such as pathogens, micropollutants ect.) entering the cultivation, which is essential for, the closed loop systems.

In conclusion, aeroponics are characterized by the best aeration of the root zone, the lowest water consumption, the lowest occurrence of pathogens probability and the highest crop yield.

3. Factors affecting the cultivation

Scientific research on soilless culture mostly focuses on hydroponics. However, currently, aeroponic is gaining more and more interest, due to the mentioned above advantages. Research focuses mainly on the possibility of using aeroponics in developing countries (Chiipanthenga et al.

2006; Mateus-Rodriguez et al. 2013) and in closed loop systems in the space environment - EDEN ISS project (Boscheri et al. 2016). While this type of cultivation is beneficial, it should be noted, that on the other hand, there are many factors that affect the quality and efficiency of cultivation carried out in this system. This is especially important for a closed life support systems.

The main factors affecting crop cultivation are:

- plant density in growing,
- gravity,
- tropism,
- cosmic rays,
- composition of the medium that plants are sprinkled with,
- temperature and oxygenation of the root zone,
- ambient temperature,
- the composition of the ambient air (content of oxygen and carbon dioxide),
- type and intensity of the lighting used,
- the size of droplets spraying the root zone and the contact time,
- air movement in the room with cultivation.

In the context of plant cultivation in a space condition, the first factor to be considered is the state of reduced gravity. The reduced gravity prevents thermal convection, which in normal conditions is driven by the difference in density of the solution surrounding the plants. Thus, it affects the exchange of gases and liquids between the plant and its surroundings. In experiments carried out in the microgravity state (Wolff et al. 2013) it is shown that hypoxia of the root zone often appears. This is because of the lack of air movement due to the difference in density (Wolff et al. 2013).

However, some studies indicate that potassium uptake in the state of reduced gravity is elevated, which seems to be a desirable phenomenon because potassium has a beneficial effect on the growth of the root zone and the development of the above-ground part of the plant. Moreover, potassium improves the taste, smell, color, size and nutritional value of the crop by increasing the content of carbohydrates, proteins, vitamins B1 and C and organic acids, which can be primarily seen in the case of plants in which the root is part of the edible (Liao et al. 2004). On the other hand, increased potassium uptake might decrease the content of sodium, calcium, magnesium, carotene and vitamin C in the plant (Bréš et al. 2016).

Another concern might be a possible formation of globules, which may float inside of the container and it could tend to adhere to the corners of the container's walls (Dreschel et al. 1994).

Gas exchange, metabolism and photosynthesis appears to be similar in terrestrial and low-gravity conditions. However, the similar environmental conditions are required. Plants should be grown in a suitably selected gas mixture simulating Earth conditions and be grown at a moderate light intensity (Porterfield 2002).

Cosmic rays may be another factor that may affect plants cultivation. This type of research was mainly conducted in terrestrial conditions with attempt to recreate the environment in which such radiation occurs. The experiment consisted in shielding the Earth's magnetic field and showed that it affects the exchange of gases in plants and their metabolism, however, the exact influence of radiation on plant growth is still unknown. Additionally, there is no information on possible mutations, which might be induced by the cosmic rays (Shakhov 1962).

In microgravity conditions gravitropism is disturbed. Which is defined as is a coordinated process of differential growth by a plant in response to gravity pulling on it. While, orientation of root is guided only by the gravity (Halstead et al. 1987), the shoot orientation is also influenced by the light. It induces possibility of simulating the direction of shoots growth by a light factor.

The transport of water and nutrients in plants in the microgravity state is one of the most important aspects. However, knowledge about the impact of space environment conditions on the absorption, transport and distribution of water and nutrients in plants at the current time is relatively small. It has been shown, that under microgravity conditions mass transport, exchange of gases, water and ions is very limited unless the forces that induce the movement are applied (Porterfield 2002). Transpiration, which is one of the main driving forces of water transport in the plant's conducting tissue is reduced and affected by diminished convection. It has been shown that for transpiration and

water transport to occur normally, air movement around the plants must be forced (Wolff et al. 2013; Porterfield 2002). Another inconvenience relies on a water droplet size (Stoner et al. 1998). Larger droplets might prevent required oxygen delivery to the root zone. Meanwhile, fine droplets produce excessive root hair without developing a lateral root system for sustained growth

Nutrient solution composition is a further factor, which will be affecting aeroponic cultivation. It must be adapted to the particular type of a plant cultivated and the stage of its development (Komosa 2004). In each nutrient solution micro (Cl, Mo, B, Mn, Zn, Cu, Fe, Ni) and macro elements (N, S, K, P, Ca, Mg) must be provided.

However, regarding the nutrient solution and microgravity condition one of the concerns is a possible accumulation of solution in root zone. Fluids might agglomerate and create water film on the root's surface, which in turn will cause problems with effluent of nutrient solution recovery.

Another factor that can be significant in the case of aeroponic cultivation carried out in an extraterrestrial colony is the source of water used for cultivation. Which could be used for dilution of the concentrated solution. In fact, the wastewater treatment system currently used at the International Space Station is primarily designed to recover drinking water for the crew. However, in future extraterrestrial colonies it will be necessary for this system to function as a source of water or nutrients for biomass production. In aeroponic, the main component of the required nutrient solution is nitrogen in the form of nitrates (Breś et al. 2016). Therefore, the use of the nitrification process for wastewater treatment technology and then the use of a purified stream as a nutrient solution is highly probable. During this process, the conversion of ammonia to nitrates takes place.

From the ammonia-rich urine, it is possible to obtain a stream of nutrients suitable for aeroponic cultivation. However, it should be borne in mind that ammonia concentrations in urine may reach $1.18 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (Anderson et al. 2018), and the sample concentration of nitrates in the medium is $0.21 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (Komosa et al. 2014), therefore it may be necessary to dilute the stream of treated wastewater. The issue of the possibility of using untreated grey water for cultivation should be the subject of future research.

Other crucial factors are the CO_2 concentration and lighting, which can significantly improve crop productivity. The experiments showed a significant increase in plant productivity with simultaneous increase in photons flow for photosynthesis and in CO_2 concentration (Polyakov et al. 2010). Polyakov's (Polyakov et al. 2010) research shows increase of cultivation yield at five times higher CO_2 content in the air compared to standard terrestrial conditions. As it can be seen above, by changing one parameter, whole cultivation yield could be increased. However, it is important to not create conditions, which are going to be limiting other parameters of cultivation concurrently. An example can be research conducted by Wheeler et al. (Wheeler et al. 2008), which showed that the low efficiency index may be caused by the accumulation of ethylene or other trace gases (NO_x , N_2O , CH_4 , hydrogen sulfide, CO, ozone).

The misting system is also essential for the aeroponics. The size of droplets and their contact with the root zone are of significant importance. In the classic aeroponic system the drops have a size of about 7-100 μm , however, it has been proven that the use of smaller drops promotes better water absorption in the root zone, it is not known whether it is affected by droplet size or floating time in the form of fog, which their size is suitably longer. To investigate this factor in microgravity it is suggested to use the experimental platform, proposed in a chapter 3 (Weathers et al. 1992).

Aeroponic is a young subject and requires further research, especially in microgravity condition. It is shown that by the poor understanding of the effect of reduced gravity on droplet deposition in the root zone. The problem may be the phenomenon of creating a liquid film around the root that can cut off the root from oxygen and fresh solution. At the same time, the aforementioned parameters can enable optimization of crop yield, however, as already mentioned, this requires further research, especially those carried out in conditions of reduced gravity.

4. Concept of the experimental platform aimed aeroponic study on microgravity conditions

The main objective of the study, which could be conducted in a proposed platform is to investigate the droplet behavior (wetting, adhesion forces) on roots' surface in microgravity

conditions. The experimental rack is suitable for application in Zero-G plain, thus it could be used in Parabolic flight programs or Drop tower.

The general view of the experiment is presented in the Figure 2. As it can be seen, roots of a previously selected plant are sprayed with water containing small amount of nutritious elements e.g. nitrate, phosphates. The magnified picture of root's surface is captured by camera vision system. It provides high quality 3D slow motion video, which enables the observation of the droplets' motion and process of their attaching to the roots. The images allow estimation of the value of a contact angle as well as acting forces and a percentage of attached drops. To obtain reliable data, velocity of the drops is manipulated by changing a throughput of nozzle. The varying parameter is the angle of impact of the drops. Additionally, the experiment should be performed with an investigation on different parameters. This is due to parabolic flight cycle, which has consecutively repetitive stages.

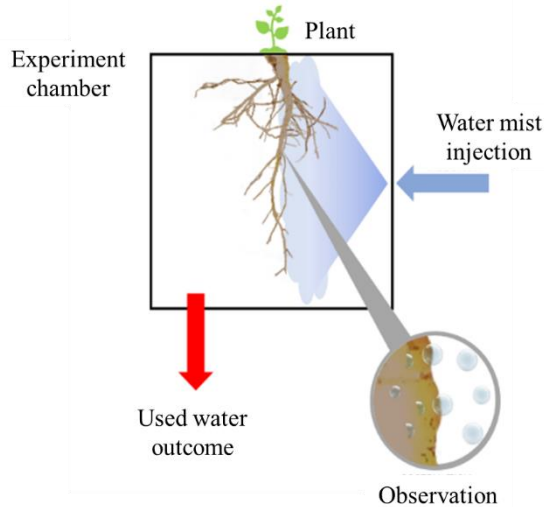


Fig. 2. Experimental procedure scheme.

5. Discussion and conclusions

To sum up the above information, a few conclusions can be drawn. Especially, with regard to the possibility of using the cultivation both in terrestrial and extraterrestrial conditions.

1. Aeroponic has many advantages over other methods that may be particularly relevant to extraterrestrial systems. These include: higher yields, better quality of crops, more optimal use of the greenhouse area through the possibility of crop density, faster plant growth cycle, better phytosanitary conditions, less water consumption, eliminating the need for artificial fertilizers and the ability to regulate the temperature of the root environment, which improves efficiency production of such a system. These advantages are important in the case of food production opportunities in developing countries with limited freshwater resources.

2. Factors that can affect aeroponic cultivation are primarily: crop density in the crop, gravity, cosmic rays, composition of the medium that plants are sprinkled with, temperature and oxygenation of the root zone, ambient temperature, the composition of the ambient air (content of oxygen and carbon dioxide), type and the intensity of the applied lighting, the size of droplets spraying the root zone and the time of contact, air movement in the room with cultivation.

3. In extraterrestrial systems, the attention should be primarily paid to the reduced thermal convection caused by reduced gravity, which may cause hypoxia of the root zone. At the same time, a very reduced gravity (microgravity) may result in a higher uptake of potassium by the plant, which increases root zone growth, improves the organoleptic properties of the plant, but on the other hand it may reduce the content of sodium, calcium, magnesium, carotene and vitamin C in the plant. In order to the gas to exchange, metabolism and photosynthesis to occur similarly as in the Earth systems, it is necessary to choose the appropriate gas mixture simulating the earth conditions, as well as to provide the appropriate amount of light. Cosmic radiation, which may affect the exchange of

gases in plants and their metabolism, is not less important. Not without significance is the possibility of mutations. Transpiration and water transport should be supported by forced air movement around the plants.

6. References

- Anderson MS, Ewert MK, Keener JF (2018) Life Support Baseline Values and Assumptions Document, National Aeronautics and Space Administration Washington, D.C. Report No. NASA/TP-2015-218570: 93-137
- Guo SS, Mao RX, Zhang L, Tang YK, et al. (2017) Progress and prospect of research on controlled ecological life support technique, REACH-Reviews in Human Space Exploration 6: 1–10
- Zabel P, Bamsey M, Schubert D, et al. (2016) Review and analysis of over 40 years of space plant growth systems. Life Science in Space Research 10: 1–16
- Komosa A, (2004) Aeroponiczna uprawa roślin ogrodniczych, X Ogólnopolskie Sympozjum Naukowe: Efektywność stosowania nawozów w uprawach ogrodniczych
- Breś W, Golcz A, Komosa W, et al. (2016) Żywnienie roślin ogrodniczych, Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego: 310-315
- Chiipanthenga M, Maliro M, Demo P, et al. (2012) Potential of aeroponics system in the production of quality potato (*Solanum tuberosum* L.) seed in developing countries, African Journal of Biotechnology 11: 3993–3999
- Mateus-Rodriguez JR., de Haan S, Andrade-Piedra JL. (2013) Technical and economic analysis of aeroponics and other systems for potato mini-tuber production in Latin America, American Journal of Potato Research 90: 357–368
- Boscheri G, Lobascio C, Lamantea MM, et al. (2016) The EDEN ISS Rack-Like Plant Growth Facility, 46th International Conference on Environmental Systems
- Wolff SA, Coelho LH, Zabrodina M, et al. (2013) Plant mineral nutrition, gas exchange and photosynthesis in space: A review, Advances in Space Research 51: 465–475
- Liao J, Liu G, Monje O, et al. (2004) Induction of hypoxic root metabolism results from physical limitations in O₂ bioavailability in microgravity, Advances in Space Research 2004: 1579–1584
- Dreschel TW, Brown CS, Piastuch WC, et al. (1994) Tube plant nutrient delivery system development: A device for nutrient delivery in microgravity, Advances in Space Research 14: 47–51
- Porterfield DM (2002) The biophysical limitations in physiological transport and exchange in plants grown in microgravity, Journal of Plant Growth Regulation 21: 177–190
- Shakhov A (1962) The effect of cosmic radiation on plant activity, Zhurnal Obshchei Biologii 23: 1–20
- Halstead TW, Dutcher FR (1987) Plants in space, Annual Review of Plant Physiology 38: 317–345
- Stoner R, Clawson JM (1998) A High Performance, Gravity Insensitive, Enclosed Aeroponic System for Food Production in Space, Phase I SBIR Final Report, NAS10- 98030 Envirogen Technologies Inc. 57-73
- Komosa A, Kleiber T, Markiewicz B (2014) The effect of nutrient solutions on yield and macronutrient status of greenhouse tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) grown in aeroponic and rockwool culture with or without recirculation of nutrient solution, Hortorum Cultus - Acta Scientiarum Polonorum 13: 163–177
- Polyakov YS, Musaev I, Polyakov SV (2010) Closed bioregenerative life support systems: Applicability to hot deserts, Advances in Space Research 46: 775–786
- Wheeler RM, Stutte GW, Mackowiak CL, et al. (2008) Gas exchange rates of potato stands for bioregenerative life support, Advances in Space Research 41: 798–806
- Weathers PJ, Zobel RW (1992) Aeroponics for the culture of organisms, tissues and cells, Biotechnology Advances 10: 93–115

8. Uprawa i wykorzystanie ziarna owsa

Cultivation and use of oat grain

Monika Ogórkiewicz, Marcin Różewicz

Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – Państwowy Instytut Badawczy, Zakład Uprawy Roślin Zbożowych, Puławy

Opiekun naukowy: Alicja Sułek

Monika Ogórkiewicz: mogorkiewicz@iung.pulawy.pl

Słowa kluczowe: owies, ziarno, uprawa, jakość, pasza

Streszczenie

W pracy przedstawiono charakterystykę owsa i jego wymagania agrotechniczne. Opisano różne kierunki wykorzystania tej rośliny. W największej ilości owies wykorzystywany jest na cele paszowe. Ma zastosowanie w żywieniu koni, drobiu i świń. Na cele spożywcze przeznaczają się tylko 5% zbiorów ziarna owsa. Owies różni się w istotny sposób od innych zbóż, zarówno ogólnym składem chemicznym, jak i wartością fizjologiczno- żywieniową. Ziarno owsa charakteryzuje się wysoką zawartością białka o korzystnym składzie aminokwasowym, znaczną zawartością tłuszczu, w tym nienasyconych kwasów tłuszczowych, wysoką zawartością rozpuszczalnej frakcji włókna pokarmowego. Najważniejszym rozpuszczalnym składnikiem włókna pokarmowego owsa są β -glukany. Frakcja ta korzystnie wpływa na układ pokarmowy, przyczynia się do zmniejszenia zawartości wskaźnika glikemicznego, normalizując poziom glukozy we krwi oraz wpływa na gospodarkę lipidową, obniżając poziom cholesterolu we krwi. Ziarno owsa jest bogatym źródłem składników bioaktywnych o właściwościach przeciwutleniających.

1. Wstęp

Owies siewny, zwany też zwyczajnym (*Avena sativa* L.), należy do rodziny wiechlinowatych (Poaceae). Jest stosunkowo młodą rośliną uprawną, podobnie jak żyto, gdyż do Europy dotarł z Azji jako chwast towarzyszący uprawom jęczmienia i pszenicy. Owies jest zbożem od dość dawna uprawianym przez ludzi. Na terenie Polski jego uprawę rozpoczęto w VIII– IX w., a świadomą hodowlę odmian datuje się na koniec XIX w. (Budzyński i Szempliński 1999). Według danych GUS (2018) powierzchnia uprawy owsa zajmowała w 2017 roku 492 tys. ha, a zbiory ziarna 1464,6 tys. ton. W ogólnej strukturze upraw zbóż w Polsce, owies jest na piątej pozycji pod względem areалу powierzchni (tuż po pszenicy, pszenżycie, życie i jęczmieniu). Głównym kierunkiem jego wykorzystania jest przeznaczenie na paszę. W mniejszym stopniu jest wykorzystywany jako zboże konsumpcyjne, głównie na płatki. W ostatnich latach obserwuje się wzrost zainteresowaniem ziarnem owsa w diecie ludzi, co związane jest z jego prozdrowotnymi właściwościami.

2. Opis zagadnienia

Do niedawna owies był gatunkiem typowo pastewnym, na paszę przeznaczano ponad 80% ziarna, zaś na konsumpcję tylko 2-3%. W ostatnich latach nastąpił wzrost wykorzystania ziarna na cele konsumpcyjne do około 5%, natomiast w krajach Unii Europejskiej na cele spożywcze przeznaczają się ponad 10%. Obecnie prowadzone prace hodowlane w obrębie tego zboża koncentrują się w większym stopniu na potrzebach żywieniowych i prozdrowotnych konsumentów. Zarówno słoma jak i plewy, mogą zostać wykorzystane na paszę, która charakteryzuje się małą zawartością trudno strawnego włókna w stosunku do słomy pozostałych gatunków zbóż. Obecnie na Krajowej Liście Odmian Roślin Uprawnych (COBORU 2017) znajduje się 26 odmian owsa zwyczajnego i 5 odmian owsa nagoziarnistego. Zainteresowanie tym zbożem wynika głównie z faktu, że charakteryzuje się ono dużymi zdolnościami przystosowawczymi do niekorzystnych warunków

siedliskowych. W połowie XX wieku owies w naszym kraju uprawiano na powierzchni ponad dwóch milionów hektarów, co było związane z wykorzystaniem ziarna jako paszy dla znaczącego погоłowia koni.

3. Przegląd literatury

3.1 Charakterystyka wymagań uprawowych owsa

Owies w stosunku do pozostałych zbóż uprawianych w Polsce charakteryzuje się większymi wymaganiami wodnymi. Zalecane jest więc wykonanie jak najwcześniejszego siewu, aby wykorzystać dostępność zgromadzonej po okresie zimy wody w glebie. W ten sposób zapewnia się prawidłowe warunki do skielkowania i początkowego rozwoju młodych siewek. Niższe temperatury wiosenne nie wpływają negatywnie pod warunkiem braku nadmiaru wody w glebie. Dodatkowo okres niższej temperatury wpływa korzystnie na proces krzewienia roślin, a krótkotrwałe obniżenie temperatury poniżej zera nie wpływa negatywnie na wzrost i rozwój tego gatunku. Atutem owsa zachęcającym do jego uprawy są także stosunkowo małe wymagania glebowe. Uprawę owsa można prowadzić na wszystkich glebach. Wykluczyć należy jednak gleby o słabej zasobności wodnej, bardzo lekkie i piaszczyste. Przy niedoborach wodnych owies reaguje obniżką plonu. Optymalny dla najwyższego poziomu plonowania, rozkład opadów wynosi: 10 mm i przypada przed siewem, 11 mm w okresie od siewów do wschodów, 16 mm od wschodów do fazy krzewienia, 23 mm w okresie strzelania w źdźbło i 27 mm od kłoszenia do dojrzałości woskowej (Budzyński 1999). Krytycznym okresem dla wysokości plonów pod względem zapotrzebowania na wodę jest faza kłoszenia i dojrzwiania ziarna. Należy w czasie przygotowywania roli pod siew tego gatunku szczególnie dbać o ograniczanie strat wodnych w glebie. W celu osiągnięcia wyższych plonów zaleca się uprawę owsa na glebach zasobnych w składniki pokarmowe – szczególnie na stanowiskach, gdzie przedplonem były rośliny pozostawiające glebę bogatą w resztki poźniwne, stanowiące rezerwuaz azotu. Na glebach kompleksu żytniego dobrego, bardzo dobrym przedplonem jest uprawa ziemniaków, które uprzednio były nawożone obornikiem. Uprawa owsa na tym samym stanowisku rok po roku wiąże się z ryzykiem zwiększonej liczebności nicieni. Możliwa jest jednak uprawa w monokulturze po innych gatunkach zbóż, przy jednoczesnym zastosowaniu intensywniejszego nawożenia mineralnego. Uprawa owsa w monokulturze zbożowej spełnia rolę fitosanitarną, zmniejszającą nasilenie występowania chorób podsuszkowych. Owies nie jest podatny na choroby podstawy źdźbła, a więc patogeny nie mają szans namnażania się i nie są przenoszone na rośliny następcze. Jednym z podstawowych elementów agrotechniki w aspekcie wielkości uzyskiwanego plonu i jakości ziarna owsa jest nawożenie. Kompleksowe, a zarazem pełne zaopatrzenie roślin w łatwo dostępne składniki pokarmowe decyduje o prawidłowym przebiegu procesów fizjologicznych i rozwoju systemu korzeniowego, co przekłada się bezpośrednio na tworzenie plonu oraz odpowiednią jego jakość. Efektywność zastosowanego nawożenia zależy między innymi od warunków glebowych (kategorii agronomicznej, odczynu, zawartości próchnicy czy składników pokarmowych) oraz pogodowych w okresie wegetacji (opadów, temperatury powietrza). Do wyprodukowania 1 tony ziarna i odpowiedniej ilości słomy gatunek ten pobiera z gleby około 24 kg N, 12 kg P₂O₅, 36 K₂O, 11 kg CaO i 7 kg MgO. Nawożenie powinno uwzględniać przyswajalność i dostępność składników pokarmowych w glebie. Zaleca się następujące nawożenie (kg·ha⁻¹): 40 – 50 P₂O₅, 60 – 100 K₂O. Wysokość nawożenia azotem nie powinno przekraczać 50 – 70 kg·ha⁻¹. Pyrek-Bajcar (2018) badając wpływ zróżnicowanego nawożenia azotem (w ilości: 40 kg·ha⁻¹, 80 kg·ha⁻¹, 120 kg·ha⁻¹) stwierdziła istnienie różnic w reakcji odmian owsa na nawożenie azotem. Nawożenie azotem należy podzielić na dwie dawki – 2/3 przedsięwnie i 1/3 w fazie strzelania w źdźbło. Wyższe dawki wpływają na wzrost zawartości białka w ziarnie i poprawiają jego wskaźniki odżywcze, zwiększając zawartość składników mineralnych i β-glukanów oraz nie wpływają, a czasem obniżają zawartość tłuszczu ogólnego (Tobiasz-Salach i Bobrecka-Jamro 2016). Zbyt duża dawka azotu powoduje intensywny wzrost roślin i może przyczynić się do wylegania, co znacząco utrudnia zbiory, ma niekorzystny wpływ na jakość ziarna, obniża użyteczność słomy i jest przyczyną strat plonu (Sułek i in. 2005, Leszczyńska i in. 2007). Jedną z metod zapobiegającą temu negatywnemu zjawisku jest także hodowla odmian półkarłowatych, które wykazują zwiększoną odporność na wyleganie wynikającą

z ograniczenia wysokości roślin (Paczos-Grzęda i Nowak 2017). Ilość wysiewu nasion owsa waha się, w zależności od kompleksu glebowego, terminu siewu, przedplonu, nawożenia, odmiany i wynosi od 160 do 210 kg·ha⁻¹. W warunkach wilgotniejszych i na glebach, gdzie wierzchnia warstwa ulega zasklepieniu należy wykonać płytszy siew. Natomiast na glebach lżejszych i suchych – głębiej, zalecana obsada to 400 – 500 roślin na 1m². W (Tab.1) przedstawiono obsadę roślin po wschodach w zależności od kompleksu przydatności rolniczej gleby. Owies cechuje się dużą krzewistością i stanowi silną konkurencję dla chwastów. Poprzez zacienienie skutecznie tłumi rozwój wielu chwastów segetalnych, dzięki czemu nie ma konieczności stosowania dużej liczby zabiegów herbicydowych. W badaniach prowadzonych przez Andruszczak i in. (2017) zastosowano ochronę herbicydową preparatami Lintur 70 WG lub mieszaninę środków Lintur 70 WG i Chwastox Extra 300 SL oraz nawozy dolistne Insol 3 i FoliCare w stosunku 18:18:18. Uzyskane wyniki wykazały, że herbicydy istotnie ograniczyły suchą masę chwastów w łanie owsa nagoziarnistego w zakresie od 50 do 64%, a w uprawie owsa oplewionego od 53 do 61%. Autorzy stwierdzili istotny wzrost plonów ziarna, odpowiednio o 20–22% i 13–23%, w porównaniu z obiektem kontrolnym (bez stosowania herbicydów). Nawozy dolistne zwiększyły presję chwastów w łanie obu form owsa, natomiast nie stwierdzono istotnego oddziaływania zastosowanych preparatów na plonowanie owsa. Zastosowane czynniki doświadczalne w niewielkim stopniu różnicowały jakość ziarna owsa.

Pomimo wysokiego stopnia krzewistości, znaczna liczba pędów bocznych jest mało produktywna. W stosunku do pędu głównego, boczne wiechy mają mniejsze uziarnienie. Odmiany nie oplewione należy możliwie szybko zbierać z pola, tuż po osiągnięciu dojrzałości ziarna, co związane jest z osypywaniem ziarna i stratą plonu. W przypadku zbioru ziarna w okresie niekorzystnych warunków pogodowych należy je dosuszyć do wilgotności 15%. Ziarno o wyższym stopniu wilgotności łatwo się zagrzewa i pleśnieje. Na skutek tego zawarte w nim białko ulega denaturacji, a grzyby pleśniowe produkują mikotoksyny, będące toksycznymi metabolitami dla ludzi i zwierząt.

Tab. 1. Optymalna obsada kielkujących ziarniaków owsa na 1 m² w zależności od kompleksu glebowego (Budzyński i Szempliński 2003).

Kompleks glebowy	Obsada
Żytni bardzo dobry	500-550
Zbożowo-pastewny mocny	
Zbożowo górski	
Żytni dobry	560-620
Owsiano-ziemniaczany górski	
Żytni słaby	
Zbożowo-pastewny słaby	600-650
Owsiano-pastewny górski	

3.2 Wartość odżywcza i spożywcza a wykorzystanie owsa

Ziarno owsa w większości wykorzystywane jest na cele paszowe. Jednak ze względu na wysokie walory odżywcze i prozdrowotne coraz częściej wykorzystywane jest w żywieniu ludzi. Najczęściej ziarno przetwarzane jest na płatki owsiane. Grupa docelową są konsumenci, którzy zwracają większą uwagę na wartość odżywczą, a zwłaszcza osoby z chorobami cywilizacyjnymi oraz sportowcy. Ziarno owsa zawiera w swoim składzie wiele substancji i związków, które mają duże znaczenie pod względem odżywczym i dietetycznym, a także prozdrowotnym. W stosunku do innych zbóż, ziarno owsa ma mniejszą zawartość węglowodanów (owies 53%, pszenica 65%, żyto 69%, jęczmień 64%), ale wyższą zawartość tłuszczu (owies 4–9%, pszenica 2%, żyto 1,7%, jęczmień 2%) (Pisulewska 2005, Korzeniowska-Ginter i Kamińska 2014). W porównaniu do innych ziaren zbóż, ziarno owsa zawiera najwięcej tłuszczu, do 5% w ziarnie odmian tradycyjnych, do ponad 9% w odmianach nagoziarnistych (3–4 razy więcej niż w innych zbożach), a w płatkach owsianych nawet 10%. Z punktu widzenia konsumentów wyższa zawartość tłuszczu jest niepożądana, jednak składnik ten zawarty w ziarnie owsa charakteryzuje się korzystnym profilem kwasów tłuszczowych. Zawiera

niezbędne nienasycone kwasy tłuszczowe (NNKT), których organizm człowieka nie syntetyzuje, a więc muszą one zostać dostarczone wraz z pożywieniem. W tłuszczu owsianym dominują kwas linolowy (24–53%), oleinowy (35%) i palmitynowy (20%), stanowiąc łącznie około 80% jego składu (Zhou i in. 1999; Kawka i Achremowicz 2014). Niski udział kwasu palmitynowego przy wysokim udziale linolowego i oleinowego sprawiają, że produkty z owsa stanowią bardzo ważne ich źródło w diecie człowieka. Spożycie 100 g płatków pokrywa w 30% dzienne zapotrzebowanie człowieka na kwas linolowy (Gąsiorowski 2003). Zawarte w ziarnie owsa nienasycone kwasy tłuszczowe są związkami o prozdrowotnym działaniu. Działanie ich polega na udziale w przemianach biochemicznych w organizmie i pełnieniu szeregu ważnych funkcji fizjologicznych. Ich prozdrowotne działanie polega na zapobieganiu agregacji płytek i powstawaniu zakrzepów, usprawnianiu pracy układu krążenia i serca. Zawarty we frakcji lipidowej kwas oleinowy, ma działanie przeciwnowotworowe (Gąsiorowski 2003, Lange 2010, Piątkowska i in. 2010). Owies cechuje się wysoką zawartością białka w stosunku do pozostałych gatunków zbóż. Ma ono wysoką wartość biologiczną i odżywczą, ze względu na profil aminokwasowy. Zawartość aminokwasów egzogennych (nie syntetyzowanych przez organizm) jak: treonina, metionina, lizyna, fenyloalanina, tyrozyna, walina, leucyna, sprawia, że przetwory z ziarna owsa stanowią ich bogate źródło. Stąd produkty owsiane, a zwłaszcza płatki i owsianka stanowią nieodłączny element zbilansowanej diety. W białku owsa aminokwasy egzogenne stanowią 41%, natomiast w białku pszenicy i żyta tylko 33% (Czubaszek 2003; Gibiński i in. 2005). Gibiński i in. (2005) stwierdzili, że spożycie 100 g płatków owsianych pokrywa dzienne zapotrzebowanie człowieka na siedem aminokwasów egzogennych. Głównym białkiem (około 50-80% ogółu) występującym w ziarnie owsa są globuliny. Mają one znaczenie prozdrowotne poprzez wspieranie mechanizmów obronnych układu odpornościowego, ale także stabilizują poziom trójglicerydów i glukozy we krwi (Korzeniowska-Ginter i Kamińska 2014). Pozostałe ziarna zbóż są znacznie uboższe w ten cenny składnik, zawierają do 12% globulin w ziarnie. Ziarno owsa jest natomiast uboższe w białka typu awenin (prolaminy) i glutelin, które stanowią około 20% białka ogólnego. U pozostałych ziaren zbóż stanowią do 75–94% (Kawka i Achremowicz 2014). Owies może być więc włączony do diety dla osób chorych na celiakię. Wartość odżywcza białka pokarmowego owsa wykorzystywanego na cele budulcowe oceniana wskaźnikami biologicznymi, plasuje owies na pierwszym miejscu, a w dalszej kolejności są: żyto, jęczmień, pszenica (Jurga 2011, Kawka i Achremowicz 2014). Zawartość białka, a także innych składników w ziarnie, płatkach owsianych i innych przetworach zależą od wielu czynników, m.in. od: odmiany owsa (oplewione i nieoplewione), zabiegów agrotechnicznych, warunków klimatyczno-glebowych. Poza zawartością makroskładników, ziarno owsa i jego przetwory zawierają znaczne ilości witamin z grupy B, zwłaszcza B₁ oraz A, D, E i K (Myszka i Boros 2013). Jest ono także źródłem ważnych mikroelementów takich jak: wapń, magnez, fosfor, potas, żelaz, miedź i mangan. Ziarno owsa i jego przetwory zawierają także błonnik pokarmowy. Pod względem jego zawartości przewyższa on pozostałe gatunki zbóż. Występuje jednak zróżnicowanie pod względem zawartości błonnika wśród odmian. Najwięcej zawierają go odmiany tradycyjne, mniej natomiast nagoziarniste. Błonnik rozpuszczalny, z dietetycznego punktu widzenia, jest bardziej pożądany, gdyż korzystnie wpływa na układ pokarmowy, daje uczucie sytości, reguluje poziom glukozy we krwi, obniża także zawartość cholesterolu. Ponadto ziarno owsa zawiera inne substancje prozdrowotne m.in.: polifenole, kwas fitynowy, awentramidy i kwasy fenolowe.

3.3 Paszowe wykorzystanie owsa

W Polsce ziarno owsa od dawna uznawane było za wartościowy surowiec paszowy, w szczególności dla koni. Dlatego też jego areal był znacznie większy, gdy krajowe pogłowie koni użytkowanych zwłaszcza w rolnictwie jako siła pociągowa było znaczące. Obecnie jest on wykorzystywany głównie w żywieniu gęsi. W Polsce podczas ostatnich 3 tygodni tuczu, (od 15. do końca 17. tygodnia życia) gęsi karmione są wyłącznie owsem i wodą (Kłopotek i Brzóska 2018). Taki sposób żywienia tych ptaków sprawia, że pozyskane od nich mięso posiada specyficzne walory sensoryczne i odżywcze. Zawarte w profilu tłuszczu, nienasycone kwasy tłuszczowe są deponowane w tłuszczu śródmięśniowym ptaków, a poprzez to stanowią ich źródło w diecie człowieka (Brzóska i in. 2017). W przypadku pozostałych gatunków drobiu wykorzystanie owsa w paszy jest utrudnione

ze względu na duży udział łuski w ziarnie, a tym samym włókna. Sprawia to, że strawność i wartość żywieniowa tego zboża jest niższa, aniżeli pozostałych gatunków. Dlatego w mniejszych ilościach może być wykorzystywane w żywieniu kurcząt brojlerów. Stanowić może dodatek w żywieniu stad reprodukcyjnych kur mięsnych. Wysypywane na ściółkę ziarno sprawia, że kury poszukując go w podłożu mają zajęcie, poruszają się po budynku, co niweluje możliwość zatuczania ptaków. Otluszczenie ptaków w stadach reprodukcyjnych powoduje obniżenie wyników reprodukcyjnych. Zawartość łuski sprawia, że pęczniąc daje ptakom uczucie sytości. Mimo, że łuska jest źródłem włókna, co jest niekorzystną cechą z punktu żywienia drobiu, to jednak w swoim składzie posiada także korzystne związki, m.in. celulozę, dodatnio wpływającą na gospodarkę wodną przewodu pokarmowego kurcząt oraz poprawia perystaltykę jelit. Odmiany nagoziarniste owsa zawierają ponad czterokrotnie mniej włókna, więcej tłuszczu i białka, a wartością energetyczną dorównują kukurydzy, co sprawia, że można je wprowadzać do mieszanek dla kurcząt rzeźnych. Pod względem zawartości tłuszczu owies zdecydowanie przewyższa inne zboża, kształtując się na poziomie 40–100 g·kg⁻¹ w odmianach krajowych. Tłuszcz owsiany bogaty jest w nienasycone kwasy tłuszczowe, stanowiące około 80% całkowitego składu tłuszczu. Ma on więcej NNKT, a to prowadzi do uzyskania mięsa o dobrym smaku oraz delikatnej konsystencji tłuszczu. Niekorzystną cechą owsa zarówno oplewionego, jak i nagiego jest duża zawartość β -glukanów – substancji o charakterze antyodżywczych, które mogą być przyczyną zmian w budowie morfologicznej ścian przewodu pokarmowego i mogą wpływać na obniżenie strawności oraz wchłaniania składników pokarmowych. Uzupelnienie dawek enzymem β -glukanazą niweluje niekorzystne działanie tych substancji (Pranczk i Kosieradzka 1997). Jednak dzięki smakowitości owsa, jak i właściwościom pobudzającym przemianę metaboliczną oraz dobrym walorom dietetycznym jest on bardzo pożądanym komponentem mieszanek.

Owies stanowi także składnik dawek pokarmowych dla trzody chlewnej. Lepszym komponentem są odmiany nagoziarniste, których udział do 50% (ogółu zbóż) w mieszance wpływa korzystnie na przyrosty masy ciała. Zastosowanie tego zboża w mieszankach dla tuczników wpływa na uzyskanie dobrych wyników rzeźnych (Semeniuk 2011). Ponadto zastosowanie owsa jako komponentu mieszanek dla tuczników powoduje korzystny wpływ na odżywczość i prozdrowotną wartość pozyskiwanego mięsa. Wpływa na wzrost zawartości wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (PUFA), a zwłaszcza kwasu linolowego, który jest szczególnie cenny ze względu na swoje właściwości prozdrowotne (Milczarek i Osek 2009).

Owies wykorzystywany jest także w żywieniu bydła, zarówno mlecznego jak i opasowego. Stanowi komponent mieszanek treściwych, zwłaszcza dla wysokowydajnych krów mlecznych.

3.4 Inne kierunki wykorzystania ziarna owsa

Poza dwoma podstawowymi kierunkami wykorzystania (spożywczym i paszowym) ziarno owsa ze względu na zawartość wielu cennych związków bioaktywnych może być wartościowym surowcem i ich źródłem w przemyśle kosmetycznym i farmaceutycznym. Na jego bazie można produkować odżywkę, kremy, mydła toaletowe. Kosmetyki owsiane z substancjami śluzowymi tworzą na skórze cienutką i niewyczuwalną barierę ochronną, która osłania ją przed niekorzystnym oddziaływaniem czynników zewnętrznych (bariera naskórkowa). Działają nawilżająco i wygładzająco, posiadają właściwości zbliżone do kwasu hialuronowego odpowiedzialnego za elastyczność skóry, a więc opóźniają efekty jej starzenia (Kawka i Achremowicz 2014). Produkty owsiane są wykorzystywane w farmacji, m.in. jako składniki leków, suplementy diety. Beta-glukany owsiane przyspieszają gojenie się ran, szczególnie poparzeniowych, redukują ból i powodują zabliźnianie ran z defektami kosmetycznymi. Istnieje także możliwość produkcji suplementów diety i preparatów leczniczych. Wodne wyciągi z ziarna owsa działają wykrztuśnie oraz przeciwbólowo w schorzeniach reumatycznych, kamicy moczowej i chorobach nerek. Ponadto, stanowią dobry środek mineralizujący, bogaty w rozpuszczalną w wodzie krzemionkę, wpływającą dodatnio na przemianę materii, stan naczyń krwionośnych, narządów wewnętrznych, kości, skóry, włosów i paznokci. Ziarno stanowi także źródło polifenoli, białek, aminokwasów i składników mineralnych. Jednak ich zawartość jest uzależniona od odmiany (Witkowicz i in. 2015).

Ziarno owsa niespełniające wymogów jakościowych może być wykorzystane również na cele energetyczne. Ma to uzasadnienie ekonomiczne, zwłaszcza jeśli ziarno jest produkowane we własnym gospodarstwie z wykorzystaniem technologii niskonakładowych. Daje to również korzyści środowiskowe, gdyż pozwala na ograniczenie zużycia surowców kopalnych oraz zmniejsza emisję uciążliwych gazów i pyłów do atmosfery (Głowacka i in. 2016). Owies ma wyższą wartość opałową w porównaniu do żyta i pszenżyta, co potwierdza słuszność jego przeznaczenia na cele energetyczne (Piasecka i in. 2017). W stosunku do węgla kamiennego ma o połowę niższą efektywność energetyczną. Jego atutem jest jednak mniejsza ilość popiołu powstającego po spaleniu (2,2%), który może być wykorzystywany jako nawóz (Popczyk 2011).

4. Podsumowanie

Owies jest zbożem, które charakteryzuje się stosunkowo niskimi wymaganiami uprawowymi. Pozyskiwany surowiec w postaci ziarna charakteryzuje się bardzo dobrą wartością odżywczą. Wykorzystany może być na cele spożywcze i paszowe. W związku z zawartością substancji bioaktywnych stanowi także cenny surowiec do produkcji kosmetyków oraz farmaceutyków. Alternatywnym kierunkiem może być przeznaczenie ziarna niespełniającego wymogów jakościowych bądź jego nadwyżki na cele energetyczne.

5. Literatura

- Andruszczak S, Kraska P, Kwiecińska-Poppe E i in. (2017) Wpływ herbicydów i dolistnego dokarmiania roślin na plonowanie i zachwaszczenie oplewionej (*Avena sativa* L.) i nagoziarnistej (*Avena nuda* L.) formy owsa. *Agronomy Science*, 72(4): 13-26
- Brzóska F, Szymczyk B, Szolkowska A i in (2017) Skład aminokwasowy, profil kwasów tłuszczowych i wartość pokarmowa odmian i rodów ziarna owsa. *Rocz. Nauk. Zoot.*, 44, 2: 247–264
- Budzyński W (1999) Reakcja owsa na czynniki agrotechniczne—przegląd wyników badań krajowych. *Żywność*, 18: 11-25
- Budzyński W, Szempliński W, (2003) Owies [W:] Szczegółowa uprawa roślin. Tom 1. Jasińska Z., Kotecki A. (red.). Wyd. AWA, Wrocław: 235-262
- COBORU (2017) Lista odmian roślin rolniczych wpisanych do krajowego rejestru w Polsce, Słupia Wielka, 45
- Czubaszek A (2003) Wybrane cechy fizyczne i skład chemiczny ziarna kilku odmian owsa. *Biuletyn IHAR* 229: 307-315
- Gąsiorowski H (2003) Wartość fizjologiczno-żywnościowa owsa. *Przegląd Zbożowo-Młynarski* 3: 26-28
- Gibiński M, Gumul D, Korus J (2005) Prozdrowotne właściwości owsa i produktów owsianych. *Żywność Nauka Technologia Jakość* 4 (Supl.): 49-60
- Głowacka A, Zych M, Żolnierczuk J (2016) Środowiskowe i ekonomiczne skutki wykorzystania ziarna owsa na cele energetyczne. *Inżynieria Ekologiczna*. Vol. 49: 117–123
- Jurga R (2011) Skład chemiczny, wartość żywnościowa i możliwości wykorzystania owsa i jego przetworów. *Przegląd Zbożowo-Młynarski* 5: 28-31
- Kawka A, Achremowicz B (2014) Owies – roślina XXI wieku. Wykorzystanie żywnościowe i przemysłowe. *Nauka Przyroda Technologie* 8: 32-41
- Korzeniowska-Ginter R, Kamińska A (2014) Wiedza konsumentów na temat prozdrowotnych właściwości owsa oraz wykorzystanie przetworów owsianych w żywieniu. *Zesz. Nauk. Akademii Morskiej w Gdyni* 86: 125-132
- Kłopotek E., Brzóska F (2018) Produkcja, skład chemiczny i wartość pokarmowa ziarna owsa w żywieniu gęsi rzeźnych. *Wiad. Zoot. R. LVI* (4): 178–187
- Lange E (2010) Produkty owsiane jako żywność funkcjonalna. *Żywność Nauka Technologia Jakość* 3: 7-24

- Leszczyńska D, Noworolnik K, Grabiński J i in. (2007) Ilość wysiewu nasion jako czynnik kształtujący plon ziarna zbóż. *Studia i Raporty IUNG – PIB*, 17(9): 17–27
- Milczarek A, Osek M (2009) Wpływ wysokiego udziału owsa nieoplewionego w mieszance na efekty tuczu, wartość rzeźną i jakość mięsa świń. *Acta Scientiarum Polonorum. Zootechnica*, 8(3): 27-37
- Myszka K, Boros D (2013) Poszukiwanie genotypów owsa o poprawionej wartości odżywczej oraz wysokich właściwościach bioaktywnych. *Biul. IHAR* 268: 101-112
- Paczos-Grzęda E, Nowak M (2017) Analiza elementów plonu mieszańców międzyodmianowych owsa o zredukowanej długości źdźbła. *Annales UMCS sectio E Agricultura*, 72, 3:117-127
- Piasecka I, Knozowski P, Ropińska P i in. (2017) Badanie i ocena możliwości wykorzystania na cele energetyczne rozdrobnionych ziaren zbóż wiechlinowatych. *Acta Scientiarum Polonorum. Technica Agraria*, 16 (1-2): 47–57
- Piątkowska E, Witkowicz R, Pisulewska E (2010) Podstawowy skład chemiczny wybranych odmian owsa siewnego. *Żywność Nauka Technologia Jakość* 3: 88-99
- Pisulewska E (2005) Owies. [W:] *Rynki i technologie produkcji roślin uprawnych*. Chotkowski J (red.). Wyd. Wieś Jutra, Warszawa: 182-196
- Popczyk J (2011) *Energetyka alternatywna*. Wyd. Dolnośl. WSPT, Polkowice.
- Pranczk C, Kosieradzka I (1997) Wyniki produkcyjne kurcząt brojlerów żywionych mieszanką zawierającą owies nagi i dodatek enzymów. *Zeszyty Naukowe. Przegląd Hodowlany*, 32:340-341
- Pyrek-Bajcar E (2018) Wpływ nawożenia azotowego na plonowanie i jakość ziarna nowych odmian owsa oplewionego i nieoplewionego. Praca doktorska Uniwersytet Rzeszowski.
- Semeniuk W (2011) Wpływ owsa nagoziarnistego w żywieniu tuczników na efekty produkcyjne, wartość odżywczą mięsa i składniki biochemiczne krwi. *Zeszyty Naukowe Uniwersytetu Przyrodniczego*, 62: 393-401
- Sułek A, Leszczyńska D, Cyfert R (2005) Charakterystyka i technologia uprawy odmian owsa. IUNG–PIB Puławy, wyd. COBORU Słupia Wielka
- Tobiasz-Salach R, Bobrecka-Jamro D (2016) Wpływ nawożenia azotowego na plon i wartość żywieniową ziarna owsa. *Przegląd Zbożowo-Młynarski*, 60(4): 16-19
- Witkowicz R, Pisulewska E, Leszczyńska T i in. (2015) Podstawowy skład chemiczny oraz aktywność przeciwrodnikowa ziela wybranych genotypów owsa siewnego (*Avena sativa*). *Żywność Nauka Technologia Jakość* 4: 176-187
- Zhou M, Robards K, Glennie-Holmes M, i in. (1999) Oat lipids. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 76: 159-169

9. Udział wybranych cyklofilin we wzroście i rozwoju *Arabidopsis thaliana*

Role of chosen cyclophilins in *Arabidopsis thaliana* growth and development

Przemysław Olejnik

Katedra Biochemii i Biotechnologii, Wydział Rolnictwa i Bioinżynierii, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Promotor: Katarzyna Nuc

Olejnik Przemysław: przemyslaw.olejnik.92@gmail.com

Słowa Kluczowe: ekspresja genów, izomerazy peptydylo-prolilowe, domena cyklofilinowa

Streszczenie

Cyklofiliny to rodzina białek posiadających aktywność izomerazy peptydyloprolilowej, katalizującej reakcje izomeryzacji cis/ trans wiązania peptydowego pomiędzy proliną a dowolnym aminokwasem poprzedzającym ją w łańcuchu białkowym. W tkankach *Arabidopsis thaliana* zidentyfikowano 29 białek należących do tej rodziny, które zlokalizowane są w różnych przedziałach komórkowych i biorą udział w licznych procesach. Tak duże zróżnicowanie funkcji przy równoczesnym podobieństwie cyklofilin występujących u różnych gatunków wskazuje na uniwersalność mechanizmów regulacyjnych, w których biorą udział. Może to w znacznym stopniu ułatwić zastosowanie wiedzy uzyskanej w doświadczeniach z wykorzystaniem rośliny modelowej w hodowli roślin uprawnych. Celem niniejszej pracy jest zaprezentowanie funkcji wybranych cyklofilin w procesach wzrostu i rozwoju *A. thaliana*.

1. Wstęp

Rzodkiewnik pospolity (*Arabidopsis thaliana*) to niewielka roślina należąca do kapustowatych, która aktualnie jest jednym z najczęściej wykorzystywanych gatunków w badaniach dotyczących genetyki, procesów ewolucyjnych, wzrostu i rozwoju roślin oraz biologii molekularnej. Pomimo tego, że *A. thaliana* nie jest gatunkiem o dużym znaczeniu agronomicznym, jest uznanym modelem w badaniach nad procesami zachodzącymi w organizmach roślin uprawnych.

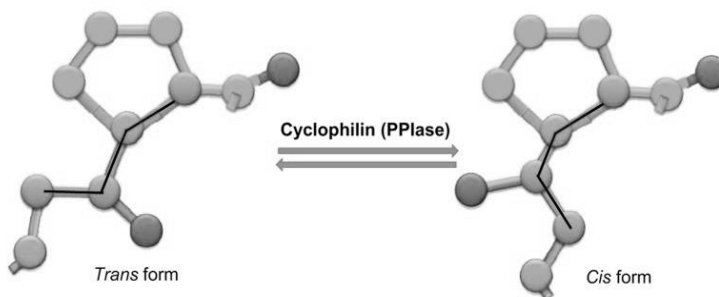
Aktualnie *A. thaliana* jest jednym z najczęściej wykorzystywanych organizmów modelowych. Zadecydowały o tym różne cechy tej rośliny. Pierwszą z nich jest niewielki, w pełni zsekwencjonowany, zbudowany z około 135 Mbp genom upakowany w 10 chromosomach ($2n=10$). Kolejną cechą, która decyduje o popularności tej rośliny wśród badaczy jest niewielki pokrój i wymagania glebowe, które ułatwiają prowadzenie doświadczeń w laboratoriach i fitotronach. Rośliny tego gatunku są ponadto samopylne i charakteryzują się krótkim cyklem życiowym (około 6 tygodni) dzięki czemu łatwiejsze jest prowadzenie badań dotyczących rozwoju generatywnego i rozmnażania. Dostępne są również protokoły dotyczące transformacji roślin tego gatunku i ich regeneracji. Dzięki temu badania nad funkcjonowaniem genów, białek i szlaków metabolicznych wymagające modyfikacji materiału genetycznego są ułatwione.

2. Opis zagadnienia

Cyklofiliny to rozpowszechniona rodzina białek, której przedstawiciele zidentyfikowano u organizmów należących do bakterii, grzybów, roślin wyższych oraz zwierząt. U organizmów eukariotycznych stwierdzono ich obecność w niemal wszystkich przedziałach komórkowych, w których pełnią zróżnicowane funkcje biorąc udział w takich procesach jak transport białek, stabilizacja receptorów, dojrzewanie mRNA czy apoptoza (Grebe i in. 2000; Leversson i Ness, 1998; Lin i Lechleiter, 2002; Romano i in. 2004)

Cyklofiliny, białka wiążące FK506 i parvuliny należą do białek nazywanych immunofilinami. Wiele z nich posiada aktywność izomerazy peptydyloprolilowej katalizującej izomeryzację wiązania peptydowego pomiędzy proliną a dowolnym poprzedzającym ją w pierwszorzędowej strukturze białka aminokwasem (X-Pro) z konformacji *cis* w *trans* i odwrotnie.

(Rys.1) Reakcja ta w warunkach naturalnych przebiega powoli i jest czynnikiem ograniczającym tempo nabywania przez białka struktury natywnej. Proces ten jest jednocześnie bardzo istotny, ponieważ około 90% białek posiada wiązanie peptydowe w konformacji *trans*. (Stewart i in. 1990)



Rys 1. Schemat reakcji polimeryzacji wiązania peptydowego X-Pro katalizowanej przez cyklofiliny (Kumari i in. 2013).

Cechą charakterystyczną cyklofilin jest występowanie w ich strukturze konserwatywnej domeny cyklofilinowej. Niski stopień zróżnicowania sekwencji białkowej tej domeny w obrębie różnych gatunków wskazuje na istotną rolę tych białek w podstawowych procesach komórkowych.

Pierwsze cyklofiliny w komórkach roślin zostały zidentyfikowane blisko 30 lat temu w tkankach pomidora, kukurydzy i rzepaku. Dzięki poznaniu sekwencji genomu *Arabidopsis thaliana* do dzisiaj udało się zidentyfikować w jej komórkach 29 białek należących do rodziny cyklofilin, spośród których można wskazać białka pełniące rolę we wzroście i rozwoju roślin.

3. Przegląd literatury

Ze względu na swoją wielkość materiał genetyczny, zawarty w jądrze komórkowym organizmów eukariotycznych, nie występuje w postaci nagiej cząsteczki DNA lecz jako wysoce upakowany i zorganizowany kompleks nukleoproteinowy zwany chromatyną. Podstawową jednostką organizacyjną tej struktury jest nukleosom zbudowany z oktameru białek histonowych, wokół którego owinięty jest fragment kwasu deoksyrybonukleinowego. Oktamer histonowy zbudowany jest z ośmiu cząsteczek białek histonowych (po dwa białka H2A, H2B, H3 i H4), których domeny globularne tworzą tak zwany rdzeń nukleosomu. Poza tym białka histonowe posiadają nieustrukturyzowane fragmenty N-końcowe wystające poza rdzeń nazywane ogonami. Zasadowy charakter białek histonowych umożliwia im silne oddziaływanie z genomowym DNA co z jednej strony zapewnia wysoki stopień upakowania materiału genetycznego wewnątrz jądra komórkowego. Z drugiej jednak strony obecność białek strukturalnych zmniejsza dostępność kwasu deoksyrybonukleinowego dla czynników białkowych biorących udział w ekspresji genów.

Jednym z głównych mechanizmów kontroli ekspresji genów na poziomie DNA, poza aktywnością kompleksu białek remodelujących chromatynę, jest kowalencyjna modyfikacja ogonów białek histonowych, która obejmuje procesy związane z acetylacją i metylacją. Acetylacja i deacetylacja dotyczy głównie reszt lizyny występujących w ogonach histonów H3 i H4 i polega odpowiednio na przyłączeniu bądź odłączeniu od reszt aminokwasowych grupy acetylowej. Acetylacja białek histonowych powoduje osłabienie dodatniego ładunku białek co prowadzi do dekondensacji struktury chromatyny skutkującej większą dostępnością informacji genetycznej zawartej w DNA dla czynników transkrypcyjnych. Natomiast metylacja dotyczy głównie reszt lizyny (Lys, K) i argininy (Arg, R) występujących w ogonach histonów H3 i H4. Proces ten, katalizowany przez metylotransferazy, może zarówno zwiększać jak i ograniczać dostępność DNA dla czynników transkrypcyjnych w zależności od tego, które aminokwasy ulegają metylacji oraz ile grup metylowych zostało przyłączonych. Metylacja białek histonowych ma szczególne znaczenie w kontroli ekspresji w komórkach tworzących różne tkanki i organy wpływając na ekspresję różnych fragmentów genomu.

Badania prowadzone na roślinie modelowej *Arabidopsis thaliana* wskazują, że w procesach metylacji poza metylotransferazami mogą brać udział również białka z rodziny cyklofilin. Przykładem tego jest zlokalizowana w jądrze komórkowym cyklofilina 71 (AtCYP71) należąca do grupy białek wielodomenowych czyli takich, które poza charakterystyczną dla tej rodziny domeną cyklofilinową posiadają w swojej strukturze co najmniej jedną inną domenę funkcyjną. W przypadku omawianego białka jest nią domena WD40, której jedną z funkcji jest tworzenie oddziaływań typu białko-białko lub białko-DNA (Xu i Min 2011). Wykazano, że za pośrednictwem domeny WD40 cyklofilina 71 *A. thaliana* oddziałuje z ogonami histonów H3 w regionach *loci* zajmowanych przez geny *STM* i *KNAT1*. *STM* (ang. *shoot meristemless*) to gen odpowiedzialny za formowanie merystemu wierzchołkowego i merystemów kwiatowych u roślin dwuliściennych pośrednio wpływający na dominację wierzchołkową i spowolnienie rozwoju pędów bocznych. Z kolei gen *KNAT1* odgrywa istotną funkcję w merystemach wierzchołkowych pędów utrzymując komórki w stanie nieodróżnionym do momentu wejścia rośliny w fazę generatywną.

Poza oddziaływaniem AtCYP71 z określonymi *loci* pełniącymi funkcję regulatorowe w procesie organogenezy zaobserwowano również wpływ tego białka na poziom metylacji lizyny w pozycji 27 histonu H3 (H327K) co skutkuje wyciszeniem wyżej wymienionych genów. Doświadczenie z wykorzystaniem mutantów insercyjnych w obrębie genu kodującego cyklofilinę 71 wykazało liczne zmiany we wzroście i rozwoju roślin poddanych mutacji. Zaobserwowano znaczne opóźnienie w rozwoju rozety liściowej w porównaniu z typem dzikim (WT). Czternastodniowe siewki typu dzikiego posiadały w pełni wykształconą parę liści prawdziwych, których natomiast nie wykształciły mutanty w tym samym wieku. Ponadto zaobserwowano znaczne zmiany w budowie rozety liściowej. W porównaniu z typem dzikim liście roślin zmutowanych były zdeformowane i chropowate. Mutanty w 34% przypadków wykazywały zaburzenia w filotaksji w porównaniu z roślinami typu dzikiego objawiające się zmianą kątów pomiędzy formującymi się kolejnymi liśćmi rozety. Ponadto rośliny pozbawione funkcjonalnej cyklofiliny 71 nie wytworzyły charakterystycznych dla *A. thaliana* eliptycznych liści a jedynie podługne, pozbawione ogonka liściowego. Zauważalne były również różnice w unerwieniu liści. U mutantów insercyjnych wiązki przewodzące w blaszce liściowej odchodziły od głównej wiązki pod mniejszym kątem w porównaniu z typem dzikim i rozchodziły się niemal równolegle. Podobne obserwacje poczyniono w przypadku działek kwiatowych. Ponadto zaobserwowano zmniejszenie liczby działek wynikające z połączenia sąsiadujących ze sobą struktur.

Zakłócenie funkcji *AtCYP71* wpływało również na rozwój generatywny. Znaczącą zmianą fenotypową w mutantach była zmniejszona liczba kwiatów w porównaniu z typem dzikim. Mutanty *AtCYP71* charakteryzowały się przedwczesnym zakończeniem funkcjonowania pierwotnego merystemu wierzchołkowego, które spowodowało intensywne krzewienie się roślin. W niektórych skrajnych przypadkach kwiatostan nie zdołał w pełni uformować żadnego kwiatu przed zakończeniem rozwoju. Ograniczona była nie tylko liczba kwiatów, ale także ich morfologia. Niektóre zmutowane płatki były wydłużone i zdeformowane. Kwiaty charakteryzowały się zmniejszoną liczbą pręcików i zwiększoną liczbą owocolistków. Prawdopodobnie z powodu tych defektów łuszczyzny wytworzone przez mutanty *AtCYP71* były znacznie mniejsze i zawierały tylko kilka żywych nasion. (Hong i in. 2007)

Kolejnym białkiem zlokalizowanym w jądrze komórkowym jest cyklofilina 59 (AtCyp59) posiadająca na końcu C region bogaty w powtórzenia Arg-Ser (RS). Ponadto białko to posiada motyw rozpoznający RNA oraz domenę palca cynkowego. Obecność powtórzeń RS umożliwia oddziaływanie z licznymi białkami związanymi ze dojrzwaniem mRNA na różnych etapach wzrostu i rozwoju roślin. Ponadto AtCYP59 wykazuje powinowactwo do dużej podjednostki polimerazy RNA II oraz, dzięki obecności domeny palca cynkowego, do powstającego mRNA. Prawdopodobnie dzięki posiadanej aktywności izomerazy peptydyloprolilowej cyklofilina 59 może modyfikować strukturę i poziom fosforylacji większej podjednostki polimerazy RNA II co z kolei wpływa na transkrypcję wybranych genów biorących udział we wzroście i rozwoju rośliny (Gullerova i in. 2006).

W jądrze komórkowym *A. thaliana* występują jeszcze dwie cyklofiliny posiadające w swojej strukturze region bogaty w powtórzenia RS. W odróżnieniu jednak od AtCYP59 w białkach AtCYP63 i AtCYP95 jest on zlokalizowany na końcu N. Powtórzenia RS regulują procesy związane

z tworzeniem kompleksów białkowych odpowiedzialnych za dojrzewanie mRNA oraz aktywację kompleksu polimerazy RNA II co sugeruje udział tych cyklofilin w szeroko pojętym metabolizmie mRNA (Romano i in. 2004).

W chloroplastach *A. thaliana* do tej pory zidentyfikowano 6 białek posiadających domenę cyklofilinową. Pięć spośród nich zlokalizowano w tylakoidach (AtCYP20-2, AtCYP26-2, AtCYP28, AtCYP37 i AtCYP38), a jedno w stromie (AtCYP20-3). Pomimo dużej różnorodności cyklofilin w tym przedziale komórkowym jedynie dla dwóch wykazano zauważalny udział w składaniu i funkcjonowaniu fotosystemu. Pierwszą z nich jest cyklofilina 38 (AtCYP38). Mutanty insercyjne *AtCYP38*, charakteryzowały się spowolnionym wzrostem i nadwrażliwością na stres spowodowany intensywnym oświetleniem co wskazuje na niewłaściwe funkcjonowanie fotosystemu. Pomiar fluorescencji chlorofilu wykazał znaczny spadek maksymalnej wydajności fotosystemu II w porównaniu do roślin typu dzikiego co wskazuje na uszkodzenie tego kompleksu białkowego nawet w warunkach niskiego natężenia światła. Ponadto rośliny o zaburzonej syntezie opisywanego białka wykazywały niższą aktywność fotosyntetyczną niż rośliny typu dzikiego czego skutkiem był spowolniony wzrost. Mutanty *AtCYP38* wykazywały ponadto niższą zawartość składników kompleksu białkowego fotosystemu II i mniejszą jego stabilność zwłaszcza w warunkach intensywnego naświetlania. Obserwacje te wskazują na istotną rolę AtCYP38 w formowaniu i stabilizacji fotosystemu II. (Aigen i in. 2007)

Drugą cyklofiliną zlokalizowaną w chloroplastach i mającą wpływ na wzrost i rozwój *A. thaliana* jest cyklofilina 20-2 (AtCYP20-2). Funkcjonuje ona jako białko pomocnicze w formowaniu kompleksu błonowej dehydrogenazy NAD(P)H, która uczestniczy w transporcie elektronów w procesie fotosyntezy. (Sirpiö i in. 2009) Ponadto AtCYP20-2 bierze udział w przekazywaniu sygnałów indukowanych przez brasinosteroidy stymulując czynnik transkrypcyjny BZR1 do aktywacji genów odpowiedzialnych za wcześniejsze kwitnienie roślin. Nadal jednak nie wiadomo w jaki sposób białko o lokalizacji chloroplastowej mogą oddziaływać z czynnikami transkrypcyjnymi w jądrze komórkowym. (Zhang i in. 2013)

Cyklofilina 21-4 (AtCYP21-4) jest jedynym białkiem z tej rodziny występującym w aparacie Golgiego i mającym udział we wzroście i rozwoju roślin uczestnicząc w procesach post-translacyjnej modyfikacji białek, takich jak glikozylacja. Glikoproteiny pełnią istotną rolę w takich procesach jak formowanie ścian komórkowych i morfogeneza zarówno w warunkach stresowych jak i w optymalnych (Lee i in. 2015). Ziemiaki (*Solanum tuberosum*), w których wywołano nadekspresję AtCYP21-4 charakteryzowały się zwiększoną zawartością glikoprotein we wszystkich tkankach a także zwiększonym plonowaniem (większe i liczniejsze bulwy) dowodząc istotnej roli opisywanej cyklofiliny w procesach dotyczących wzrostu i rozwoju poprzez stymulację syntezy glikoprotein i przetwarzania glikanów. (Park i in. 2017)

Dotychczas w retikulum endoplazmatycznym potwierdzono doświadczalnie obecność dwóch białek z rodziny cyklofilin (AtCYP19-4, AtCYP20-1). Pierwsza z nich występuje głównie w tkankach merystematycznych gdzie oddziałuje z białkiem GNOM biorącym udział w polarnym transporcie auksyn. Powiązanie to wskazuje na rolę AtCYP19-4 w transporcie niektórych fitohormonów i ich akumulacji w miejscu formowania przyszłych tkanek merystematycznych, a w szczególności merystemu wierzchołkowego. (Grebe i in. 2000; Adamowski i Friml, 2015) Cyklofilina 20-1 (AtCYP20-1) należy do białek zaangażowanych w odpowiedź komórki na stres spowodowany nagromadzeniem niewłaściwie ufałdowanych białek (UPR, *ang. unfolded protein response*). Region promotorowy genu *ATCYP20-1* zawiera region wiążący białko X-box1 (XBP1). W warunkach stresu dochodzi do aktywacji genu kodującego endorybonukleazę Ire1p, której aktywność powoduje dojrzewanie mRNA XBP1. Dojrzały XBP1 jest następnie transportowany do jądra komórkowego gdzie łączy się i aktywuje element regulatorowy genu *AtCYP20-1*. (Kamauchi i in. 2005) Powstałe białko z kolei łączy się z fosfatazą 2 (PP2A) regulującą liczne szlaki związane ze wzrostem i odpowiedzią na stres. Rośliny, w których wyciszono ekspresję genu *AtCYP20-1* wykazały drastyczne spowolnienie wzrostu pędów i korzeni w warunkach stresu i nagromadzenia niepoprawnie ufałdowanych białek w siateczce śródplazmatycznej co wskazuje na udział tego białka w prawidłowym fałdowaniu białek oraz usuwaniu z retikulum endoplazmatycznego cząsteczek nie posiadających struktury natywnej.

W cytoplazmie komórek *A. thaliana* zlokalizowane są 3 białka należące do rodziny cyklofilin uczestniczące w procesach związanych ze wzrostem i rozwojem rośliny. Pierwszym z nich jest AtCYP19-1, którego zwiększoną ekspresję zaobserwowano w bielmie kielkujących nasion i w zarodkach w późnym stadium sercowatym. Ponadto zwiększoną ekspresję AtCYP19-1 wykazano również w siewkach, łodygach i liściach *A. thaliana* co wskazuje na pełnienie różnych funkcji biologicznych poza organogenezą w zarodkach. Występująca w cytoplazmie cyklofilina 40 (AtCYP40) jest wielodomenowym białkiem zdolnym do interakcji z AGO1 (ARGONAUT 1) i białkiem szoku cieplnego Hsp90 (*ang. heat shock protein*) wchodzących w skład kompleksu RISC biorącego udział w potranskrypcyjnym, wyciszaniu genów. (Smith i in. 2009; Iki i in. 2012) AtCYP40 uczestniczy w składaniu kompleksu promując łączenie białka AGO1 z chaperonem Hsp90, stymulując tym samym syntezę mikroRNA (miRNA) takich jak na przykład miR156. Stała ekspresja wspomnianego miRNA przedłuża z kolei długość fazy wegetatywnego wzrostu roślin i promuje formowanie nowych liści. U roślin z wyciszoną ekspresją *AtCYP40* zaobserwowano zmniejszoną ilość liści i przedwczesne starzenie roślin jeszcze przed rozpoczęciem fazy generatywnej. (Berardini i in. 2001)

4. Podsumowanie

Rośliny nieustannie narażone są na działanie wielu czynników środowiskowych zarówno biotycznych jak i abiotycznych, co zmusza je do ciągłego przeprogramowywania własnego metabolizmu w celu dostosowania się do zmiennych warunków i zapewnienia ciągłości gatunku. Z tego powodu rośliny produkują szeroki wachlarz metabolitów pierwotnych i wtórnych oraz tworzą sieci przekazywania sygnałów wewnątrz komórkowych. Jak wykazano w niniejszej pracy cyklofiliny występujące w komórkach *Arabidopsis thaliana* są wszechstronnymi regulatorami procesów metabolicznych i szlaków biorących udział we wzroście i rozwoju co wskazuje na ich aktywność i współdziałanie. Należy podkreślić, że cyklofiliny są konserwatywnymi białkami co może wskazywać, że procesy w których biorą udział również mają wspólne pochodzenie ewolucyjne i są uniwersalne w całym królestwie roślin. Dlatego pogłębianie naszego zrozumienia dotyczącego tej grupy białek dostarcza uniwersalnej wiedzy dotyczącej mechanizmów komórkowych wykorzystywanych nie tylko w regulacji wzrostu i rozwoju ale również adaptacji do zmiennych warunków środowiska. Badania dotyczące cyklofilin mogą okazać się szczególnie cenne dla hodowli roślin mającej na celu dobór pożądaných cech roślin uprawnych szczególnie w dobie zmian klimatycznych, z którymi obecnie zmagają się planeta.

5. Literatura

- Adamowski M, Friml J. (2015) PIN-Dependent Auxin Transport: Action, Regulation, and Evolution, *The Plant Cell*, 27(1): 20-32
- Aigen F, Zengyong H, Hye SC (2007) A chloroplast cyclophilin functions in the assembly and maintenance of photosystem II in *Arabidopsis thaliana*, *PNAS*, 104(40): 15947–15952
- Berardini TZ, Bollman K, Sun H i in. (2001) Regulation of vegetative phase change in *Arabidopsis thaliana* by cyclophilin 40, *Science*, 291(5512): 2405–2407
- Deng Y, Srivastava R, Howell SH (2013) Endoplasmic reticulum (ER) stress response and its physiological roles in plants, *International Journal of Molecular Science*, 14(4):8188-212
- Grebe M, Gadea J, Steinmann Ti in. (2000) A conserved domain of the arabidopsis GNOM protein mediates subunit interaction and cyclophilin 5 binding, *The Plant Cell*, 12(3): 343–356.
- Gullerova, M, Andrea B, Lorkovic Z (2006) AtCyp59 is a multidomain cyclophilin from *Arabidopsis thaliana* that interacts with SR proteins and the C-terminal domain of the RNA polymerase II, *RNA*, 12(4): 631-643
- Hong L, Zengyong H, Guihua L I in. (2007) A WD40 Domain Cyclophilin Interacts with Histone H3 and Functions in Gene Repression and Organogenesis in *Arabidopsis*, *The Plant Cell*, 19(8): 2403-2416
- Iki T, Yoshikawa M, Meshi T I in. (2012) Cyclophilin 40 facilitates HSP90-mediated RISC assembly in plants, *EMBO Journal*, 31(2): 267–278

- Kamauchi S, Nakatani H, Nakano C I in. (2005) Gene expression in response to endoplasmic reticulum stress in *Arabidopsis thaliana*. *The FEBS Journal*, ;272(13):3461-3476
- Kumari S, Roy S, Singh P i in.(2013) Cyclophilins: proteins in search of function, *Plant Signaling & Behavior*, 8(1):e22734
- Lee SS, Park HJ, Jung WY i in. (2015) OsCYP21-4, a novel golgi-resident cyclophilin, increases oxidative stress tolerance in rice. *Frontiers in Plant Science*, 6: 797
- Levenson JD, Ness SA (1998) Point mutations in v-Myb disrupt a cyclophilin-catalysed negative regulatory mechanism, *Molecular Cell*, 1(2): 203–211
- Lin DT, Lechleiter JD (2002) Mitochondrial targeted cyclophilin D protects cells from cell death by peptidyl prolyl isomerization, *Journal of Biological Chemistry* 277(24): 31134–31141
- Park HJ; Lee A; Lee SS i in.(2017) Overexpression of golgi protein CYP21-4s improves crop productivity in potato and rice by increasing the abundance of mannosidic lycoproteins. *Frontiers in Plant Science*, 8: 1250.
- Romano PGN, Horton P, GrayJE (2004) The *Arabidopsis* Cyclophilin Gene Family, *Plant Physiology*, 134(4):1268-1282
- Sirpiö, S.; Holmström, M.; Battchikova, Ni in. (2009) AtCYP20-2 is an auxiliary protein of the chloroplastNAD(P)H dehydrogenase complex. *FEBS Letters*, 583(14): 2355–2358
- Smith MR, Willmann MR, Wu G I in. (2009) Cyclophilin 40 is required for microRNA activity in *Arabidopsis*, *PNAS*, 106(13): 5424–5429
- Stewart DE, Sarkar A, Wampler JE (1990) Occurrence and role of cis peptide bonds in protein structures. *Journal of Molecular Biology*, 214(1): 253–260
- Xu C, Min J (2011) Structure and function of WD40 domain proteins, *Protein & Cell*, 2(3): 202-214
- Zhang Y, Li B, Xu Y (2013) The Cyclophilin CYP20-2 Modulates the Conformation of Brassinazole-Resistant1, Which Binds the Promoter of Flowering Locus D to Regulate Flowering in *Arabidopsis*, *The Plant Cell*, 25(7): 2504–2521

10. Systemy jakości i bezpieczeństwa stosowane w wybranym gospodarstwie rolnym

Quality I safety systems used in agricultural company

Piwowarski Dawid⁽¹⁾, Moczko Joanna⁽²⁾

⁽¹⁾Katedra Inżynierii Środowiska, Wydział Mechaniczny, Politechnika Opolska

⁽²⁾Katedra Inżynierii Biosystemów, Wydział Inżynierii Produkcji i Logistyki, Politechnika Opolska

Piwowarski Dawid: piwowarskidawid@o2.pl

Moczko Joanna: joannamoczko@gmail.com

Słowa kluczowe: GHP, GMP, Global G.A.P, HACCP, maszyny rolnicze

Streszczenie

Polska jest krajem, który słynie z gospodarki rolnej, zwłaszcza w Unii Europejskiej. Rolnictwo polskie charakteryzuje się dużym rozdrobnieniem. Analizowane w niniejszej pracy gospodarstwo rolne zlokalizowane jest w Opolu. Zajmuje się ono uprawą warzyw i zboża, wykorzystywanych do produkcji żywności dla dzieci marki Bobovita. W trosce o bezpieczeństwo i jakość wytwarzanych surowców gospodarstwo stosuje system Global G.A.P. Celem niniejszej pracy jest przedstawienie gospodarstwa rolnego i systemów bezpieczeństwa stosowanych w tego typu przedsiębiorstwach.

1. Wstęp

Polska jest krajem, w którym dominują równiny. Sprzyja to rozwojowi gospodarki rolnej. Ziemie rolnicze zajmują prawie 2/3 powierzchni kraju (Kaczmarek i in. 2005). Powierzchnia Polski wynosi 312,7 tysięcy km², a liczba ludności wynosi 38,5 miliona mieszkańców. Pod względem liczby ludności i powierzchni Polska zajmuje szóste miejsce w Unii Europejskiej. Kraj ten ma duże znaczenie rolnicze w Europie. Przewodzi w rankingach Unii Europejskiej dotyczących rolnictwa. Pod względem liczby ludności zajmującej się produkcją rolniczą Polska zajmuje pierwsze miejsce w Unii Europejskiej. Natomiast pod względem liczby gospodarstw rolniczych zajmuje drugą pozycję zaraz po Rumunii (Rolnictwo i gospodarka żywnościowa w Polsce, 2014).

Rolnictwo polskie charakteryzuje duże rozdrobnienie, jak już wspomniano na wstępie. Średnia powierzchnia użytków rolnych na jedno gospodarstwo w 2013 roku to około 10 ha. Ponad połowa gospodarstw w Polsce posiada nie więcej niż 5 ha użytków rolnych. Mniej niż 10 ha użytków rolnych posiada 75 % gospodarstw. Ponad 5 % ogólnej zbiorowości gospodaruje na użytkach rolnych powyżej 50 ha (Rolnictwo w 2013 roku, 2014).

Mimo rozdrobnienia gospodarstw i niekorzystnej jakości rolniczej przestrzeni produkcyjnej, w porównaniu z pozostałymi krajami Unii Europejskiej, Polska jest znaczącym producentem produktów zarówno w Europie jak i na świecie. Największy udział w strukturze towarowej ma żywiec rzeźny, mleko krowie, zboża, a także niektóre warzywa. W ogólnej strukturze użytków rolnych około 71 % było pod zasiewami.

Celem niniejszej pracy jest przedstawienie gospodarstwa rolnego i systemów bezpieczeństwa stosowanych w tego typu przedsiębiorstwach.

2. Opis przedsiębiorstwa

Opisywane gospodarstwo rolne zlokalizowane jest w jednej z dzielnic Opola. Główna działalność gospodarstwa to uprawa zbóż, kukurydzy, warzyw: marchwi, selera, buraków, ziemniaków, a także ich obróbka dla dalszego przetwórstwa w zakładach Nutricia. Warzywa z plantacji stanowią surowiec dla marki Bobovita, surowiec trudny w produkcji, gdyż jest poddawany wielokrotnej, restrykcyjnej kontroli jakości od siewu po zbiór i wstępną obróbkę (www.bobovita.pl). Gospodarstwo rolne jest rodzinną firmą. Początki działalności rolnej niniejszego

gospodarstwa sięgają XVIII wieku, a wiedza i doświadczenie na temat uprawy rolniczej była przekazywana z pokolenia na pokolenie.

3. Odbiorcy produktów

Głównym odbiorcą warzyw jest Nutricia Polska z siedzibą w Opolu, wytwarzająca produkty marki Bobovita, a także okoliczni rolnicy.

Będąca w grupie Danone, Nutricia, w relacjach ze swoimi pracownikami i osobami trzecimi, zobowiązuje się do używania Kodeksu Etycznego Danone. Według niego, działania firmy powinny wyróżniać się: dyscypliną, przejrzystością, zgodnością z międzynarodowymi konwencjami oraz krajowymi regulacjami i przepisami prawa. W firmie działa System Zarządzania Jakością Bezpieczeństwa Żywności oparty na wymaganiach zawartych w ISO 9001:2008 i ISO 22000:2006 oraz System Bezpieczeństwa Żywności.

Do produktów wytwarzanych w firmie Nutricia należą między innymi marki: Bebiko, Bebilon, Bobovita i Nutricia Nutridrink(www.nutricia.com.pl).

Surowce warzywne są stosowane do produktów marki Bobovita. Gospodarstwo rolne jest dostawcą marki Bobovita od 1991 roku. Aby zostać dostawcą Bobovity potrzeba aż dwóch lat. Tyle czasu zajmuje przystosowanie dostawy do restrykcyjnych wymagań produkcji. Do tych wymagań zalicza się:

- wyselekcjonowanie pól i sadów przeznaczonych do uprawy surowców, które będą bezpieczne pod względem zanieczyszczeń chemicznych,
- umiejscowienie pól i sadów w jak najbliższej obecności przetworni, aby zapewnić świeżość surowców,
- uprawianie w sposób kontrolowany i dedykowany od siewu do zbioru.

Przedsiębiorstwa rolne będące dostawcami Bobovity mają rocznie wykonywane około 100 audytów jakości i bezpieczeństwa żywności. Podczas nich sprawdzane są standardy i zgodność z wymogami Nutricia. Każda partia owoców, warzyw i zbóż przechodzi ponad sześćset testów jakości, a normy są nawet pięć tysięcy razy bardziej restrykcyjne niż dla warzyw ogólnodostępnych. Wszystkie surowce, z wyjątkiem owoców egzotycznych, takich jak mango, ananasy, czy banany, pochodzą z Europy. Marchew i ziemniaki są pozyskiwane od dostawców polskich(www.bobovita.pl).

4. Certyfikaty – Global G.A.P.

Bardzo istotnym elementem w produkcji żywności jest zapewnienie jej jakości. Rozpoczyna się ono już na etapie produkcji surowca. Podejście to nosi nazwę „od pola do stołu” („from farm to table”). C. Szczucki definiuje jakość artykułu spożywczego jako stopień zdrowotności, atrakcyjności sensorycznej i dyspozycyjności w granicach wyznaczonych przewidywanymi dla tych produktów surowcami, technologią i ceną (rys. 1)(Szczucki 1971).

Aby zapewnić odpowiednią jakość produktom należy zwrócić uwagę na (Wiśniewska 2011):

- przyjętą technologię produkcji,
- operacje logistyczne w przedsiębiorstwie,
- procedury i instrukcje postępowania,
- warunki sanitarnohigieniczne,
- kwalifikacje personelu,
- przyjęte systemy zarządzania i podejścia,
- jakość i pochodzenie surowców,
- wymagania odbiorcy,
- regulacje prawne,
- etyka zawodowa.

Głównymi systemami ochrony jakości i bezpieczeństwa żywności są GHP (Good Hygienic Practice), GMP (Good Management Practice) oraz HACCP (Hazard Analysis and Critical Control Point). Powstają jednak nowe systemy bazujące na powyższych, które są ukierunkowane branżowo. Można wyróżnić podejścia, których kryterium podziału jest adresat systemu, na:

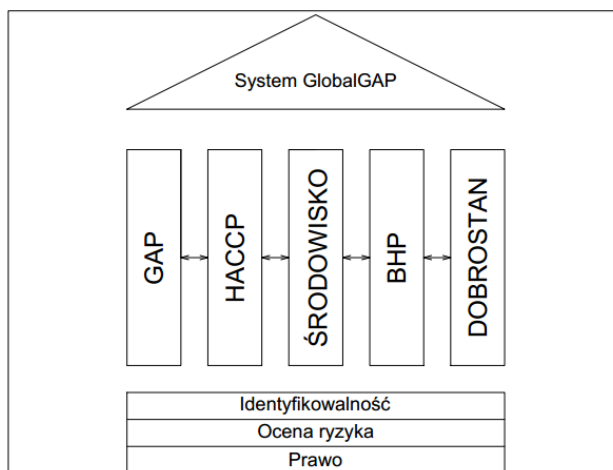
podstawowych producentów (np. GlobalGAP), producentów pasz (np. GMP+), czy dostawców do sieci (np. IFS) (Wiśniewska 2011).

stopień zdrowotności	<ul style="list-style-type: none"> •bezpieczeństwo •wartość odżywcza •wartość kaloryczna •wartość dietetyczna
atrakcyjność sensoryczna	<ul style="list-style-type: none"> •wygląd zewnętrzny •zapach •konsystencja •obraz struktury •smakowitość
dyspozycyjność	<ul style="list-style-type: none"> •rozpoznawalność gatunku •wielkość jednostkowa •trwałość •łatwość przygotowania

Rys.1. Składowe jakości żywności (Wiśniewska 2011).

Dlatego w 2011 roku badane gospodarstwo rolne wprowadziło w swoim przedsiębiorstwie system GlobalGAP.

GlobalGAP to zbiór norm handlowych, które są przeznaczone dla producentów rolnych i umożliwiają im stworzenie warunków produkcji zgodnych z zasadami dobrej praktyki rolniczej (GAP). Głównym celem GlobalGAP jest zapewnienie bezpieczeństwa i jakości produktów spożywczych w każdym miejscu procesu produkcyjnego. Został utworzony w 1997 roku przez Grupę Roboczą Europejskich Handlowców Świeżymi Produktami Ogrodniczymi (EUREP), dlatego pierwotna nazwa to EUREPGAP. W wyniku poszerzenia zasięgu systemu otrzymał nazwę GlobalGAP. Jego posiadanie jest dobrowolne. Obszary zainteresowań systemu GlobalGAP przedstawia rysunek(rys. 2).



Rys.2. Obszary zainteresowań systemu GlobalGAP (Wiśniewska 2011).

System GlobalGAP składa się z poniższych pięciu standardów (Wiśniewska 2011):

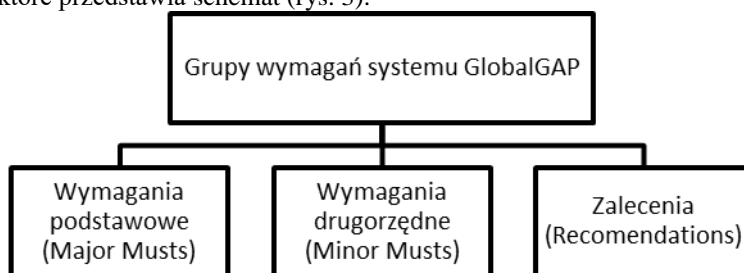
1. GlobalGAP Integrated Farm Assurance Standard (IFA) dotyczy Zintegrowanego Zapewnienia Bezpieczeństwa i Jakości w gospodarstwie.

2. GlobalGAP Compound Feed Manufactured Standard (CFM) przeznaczony dla producentów mieszanek paszowych.
3. GlobalGAP Animal Transport (AT) dotyczy zasad postępowania przy przewozie zwierząt żywych.
4. Plant Propagation Material Standard (PPM) dotyczy materiału rozmnożeniowego.
5. GlobalGAP Risk Assessment for Social Practices (GRASP) dotyczy oceny ryzyka dla praktyki społecznej.

Na dokumenty ze wszystkich wyżej wymienionych standardów tworzących GlobalGAP składają się (Wiśniewska 2011):

- General Regulations (GR), czyli przepisy ogólne, które prezentują zasady funkcjonowania systemu.
- Control Points and Compliance Criteria (CPCC), czyli Punkty Kontroli i Kryteria Zgodności, które zawierają wymagania systemu,
- Checklist (CL), czyli listy kontrolne, które stosuje się w trakcie kontroli zewnętrznej lub wewnętrznej systemu,
- Approved National Interpretation Guidelines, czyli Zatwierdzone Krajowe Wytyczne Wdrażania, które zawierają wytyczne do interpretacji wymagań GlobalGAP,
- Benchmarking Checklist, czyli Benchmarkingowa Lista Kontrolna, który identyfikują systemy zbieżne z GlobalGAP.

System GlobalGAP posiada specjalne dokumenty (CPCC) zawierające wymagania systemu ujęte w trzy grupy, które przedstawia schemat (rys. 3).



Rys.3. Grupy wymagań systemu GlobalGAPm(Wiśniewska 2011).

W myśl tych dokumentów, aby otrzymać certyfikat GlobalGAP należy spełnić wymagania w grupach według poniższego wykazu:

- dla grupy wymagań podstawowych 100 % zgodności,
- dla grupy wymagań drugorzędnych 95 % zgodności,
- dla grupy zaleceń nie określono wartości zgodności, ale zaleca się ich stosowanie ze względu na fakt stanowienia dobrych praktyk.

Nie spełnienie powyższych wymagań powoduje nie otrzymanie certyfikatu, a w przypadku, gdy certyfikat już jest przedsiębiorstwu nadany skutkuje sankcjami. Wyróżnia się trzy rodzaje sankcji: ostrzeżenie, zawieszenie i anulowanie. Ostrzeżenie wydaje się bezpośrednio po stwierdzeniu niezgodności. Jeśli zostało wydane w trakcie inspekcji wstępnej, producent ma obowiązek usunąć niezgodność w trzy miesiące. Jeśli ostrzeżenie wydano podczas inspekcji właściwej, producent ma 28 dni na usunięcie niezgodności. Zawieszenie wydaje się w momencie, w którym nie usunięto w terminie niezgodności związanej z ostrzeżeniem. Termin na działania korygujące w celu usunięcia niezgodności w tym przypadku ustalany jest indywidualnie przez jednostkę certyfikującą i producenta. Nie może być jednak dłuższy niż termin płatności za certyfikację czy odnowy certyfikatu. W trakcie zawieszenia producentowi zakazuje się używania logo GlobalGAP oraz posługiwania się certyfikatem i dokumentami GlobalGAP. Najostrzejszą sankcją jest anulowanie wydawane w przypadkach łamania prawa lub nieuczciwości producenta, braku zgodności z kontraktem zawartym z jednostką certyfikującą lub producent nie potrafi przedstawić działań korygujących, które spowodowały zawieszenie. Anulowanie to zawieszenie kontraktu i utrata

certyfikatu. O jego ponowne otrzymanie producent może się ubiegać dopiero po roku czasu od otrzymania sankcji.

System GlobalGAP istnieje dzięki dokumentacji, która składa się z (PN – EN ISO 9000:2006, Podręcznik GlobalGAP z zakładu, Wiśniewska 2011):

- polityki przedsiębiorstwa – zbiór zamierzeń, ukierunkowania przedsiębiorstwa podana do wiadomości pracowników przez kierownictwo,
- planów – dokumentów ukazujących konkretne działania, procedury do tych działań oraz osoby i czas do ich realizowania,
- procedury – opis odzwierciedlający sposób przeprowadzenia jakiegoś działania lub procesu,
- instrukcje – opis sposobu postępowania,
- zapisy – dowód przeprowadzonych działań i czynności.

5. Opis schematu zakładu

Na terenie zakładu znajduje się dom jednorodzinny, w którym mieszkają właściciele. W tym samym budynku znajduje się biuro gospodarstwa rolnego. Większość zakładu znajduje się na wolnym powietrzu. W przedsiębiorstwie nie ma garażu. Wszystkie maszyny, traktory oraz kombajny przechowywane są pod wiatą. Pomieszczenia socjalne, stołówka i szatnia znajduje się w pobliżu linii produkcyjnej. Cała linia produkcyjna znajduje się również pod wiatą. Nawozy są składowane w miejscu znajdującym się poza zakładem produkcyjnym. W zakładzie znajdują się magazyny: chłodnia, w której warzywa przechowywane są w okresie zimowym i wczesno wiosennym oraz chłodnia produktu gotowego. W tym miejscu przetrzymywane są skrzyniopalety z obrobionym produktem, który czeka na uzupełnienie całej partii i transport do Nutricii. Istnieją także przechowalnie techniczne.

6. Schemat procesu produkcyjnego

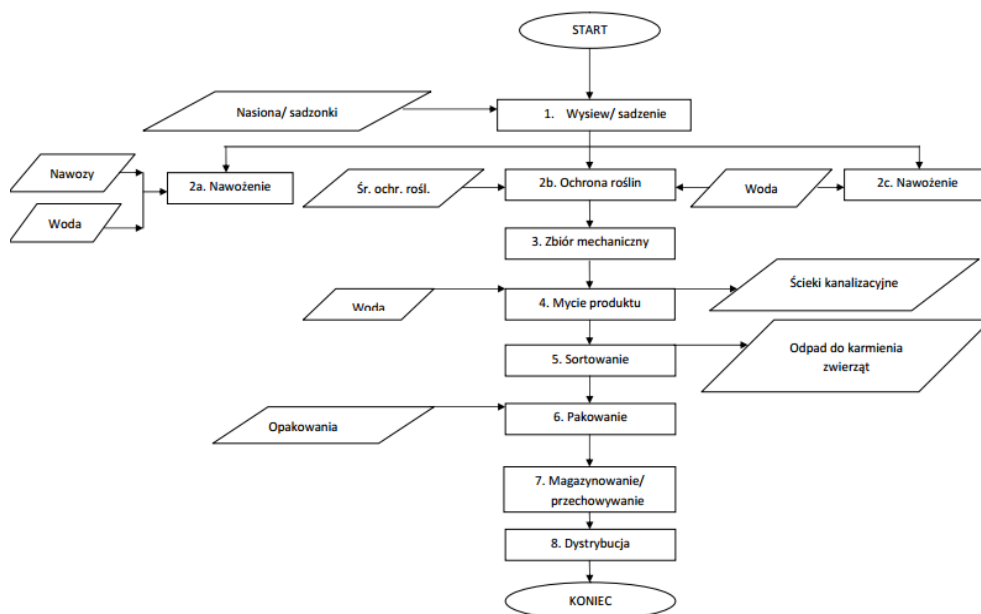
W badanym gospodarstwie rolnym proces produkcyjny rozpoczyna się od pozyskania nasion i sadzonek, przeznaczonych do wysiewu i zasadzenia. Nasiona i sadzonki pozyskiwane są od stałego dostawcy. Materiały posiadają certyfikaty jakości. Wysiewu marchwi i kukurydzy wykonuje się do połowy maja, buraków od końca kwietnia do połowy maja, natomiast zboża wysiewane są na przełomie września i października. Sadzenie ziemniaków następuje na przełomie marca i kwietnia, natomiast seler sadi się w połowie maja.

Kolejnym etapem procesu produkcyjnego jest ochrona wschodzących roślin. Na ten etap składa się nawożenie i nawadnianie. W przedsiębiorstwie stosowane są własne nawozy organiczne lub nawozy, które pozyskane są z zaufanego i znanego źródła. Dla bezpieczeństwa i prawidłowego przeprowadzenia nawożenia, w przedsiębiorstwie prowadzone są systematyczne szkolenia pracowników w tym zakresie. Nawadnianie warzyw następuje przy zastosowaniu wody z kanalizacji oraz z wód podziemnych.

Gdy warzywa i zboża osiągną dojrzałość i odpowiednią wielkość następuje etap zbioru. W badanym gospodarstwie rolnym zbiór następuje w sposób mechaniczny. Do zbioru używane są nowoczesne i innowacyjne maszyny do zbierania, które od razu przygotowują gotowy produkt do przetransportowania do zakładu produkcyjnego. Dzięki tym maszynom możliwe jest dokonanie wstępnej selekcji produktu oraz oddzielenie części jadalnych (korzeni, bulw, ziarniaków) od części niejadalnych (liście, łodygi, słoma). Tak przygotowane produkty są przewożone własnym transportem do zakładu znajdującego się niedaleko pól.

W zakładzie produkty trafiają na linię produkcyjną, gdzie poddawane są procesowi mycia, polerowania sortowania oraz pakowania w skrzyniopalety. Do mycia stosowana jest woda wodociągowa o jakości wody pitnej. Przeprowadzane jest ono w specjalnym urządzeniu myjącym. Sortowanie wykonują pracownicy przy użyciu noży. W tym miejscu pracownicy muszą dostosowywać się do wielu zasad higienicznych, aby nie zanieczyścić w sposób mechaniczny, fizyczny lub chemiczny, sortowanych produktów. Pracownicy nie mogą na linii produkcyjnej posiadać biżuterii i innych osobistych rzeczy. Ważne, aby mieć na sobie czyste ubranie, krótkie,

niepomalowane paznokcie, spięte włosy oraz rękawice. Pracownicy są zobowiązani do informowania o chorobach i wypadkach, a także zwracać uwagę na zanieczyszczenia i zwierzęta domowe. W miejscu występowania produktów obowiązuje całkowity zakaz palenia, jedzenia oraz picia. Po każdym kontakcie ze środkami smarnymi, ochrony roślin oraz wizycie w toalecie pracownik zobowiązany jest umyć ręce w sposób przedstawiony w instrukcji. W sortowni, lampy powinny być zbudowane z nietłukącego się szkła. Podłogi powinny być czyste i powinny mieć dobre odprowadzenie wody. Gotowy i skontrolowany produkt trafia do skrzyniopalety o wymiarach 1,5 x 1,5 x 1,5 metra. Odpady z sortowania przeznaczone są do dokarmiania zwierząt gospodarskich. Miejsce na odpady musi być dobrze oznakowane. Pakowane produkty powinny być dobrze oznakowane. Oznaczenie powinno zawierać następujące informacje: nazwa i numer gospodarstwa, nazwa produktu, odmiana, kraj pochodzenia, masa netto i data przygotowania. Istotną sprawą jest przeprowadzenie kontroli zapakowanych produktów. W trakcie tej kontroli sprawdza się wagę, wygląd produktu, czyli barwę, kształt, długość, ślady szkodników, objawy gnicia, zawilgocenie, dojrzałość, średnica, czystość, a także ocenia się prawidłowość oznakowania.



Rys.4. Schemat procesu produkcyjnego. Źródło: (Podręcznik GlobalGAP z zakładu).

W następnym etapie dokonuje się magazynowania produktów w chłodniach, jeśli produkty mają być poddane przechowaniu. Jeśli jest aktualne zapotrzebowanie na produkty, pomija się proces magazynowania. W takim przypadku załadowane skrzyniopalety wozi się wózkiem widłowym do naczepy, którą gotowa partia produkcyjna zostanie wywieziona do odbiorcy. Pełny schemat procesu produkcyjnego znajduje się na rys.4.

7. Przepływ materiałów wraz z opisem parku maszynowego

Przepływ materiałów w badanym gospodarstwie rolnym rozpoczyna się już od pozyskania nasion i sadzonek do sadzenia. Surowce te są pozyskiwane od zaufanych dostawców, którzy posiadają certyfikaty jakości dla danych materiałów siewnych. Siewu dokonuje się przy pomocy siewnika firmy Stanhay (rys. 5). W przedsiębiorstwie stosuje się siewniki rządowe, które są zbudowane ze skrzyni na nasiona, zespołu dozującego nasiona, przewodów nasiennych i redlic. Siew rządowy polega na umieszczaniu nasion w glebie w rzędach, zachowując jednakową szerokość międzyrzędzi. Przyrządy wysiewające są typu kołkowego. Przewody nasienne doprowadzają nasiona do redlicy, która znajduje się w glebie. Redlice wykonują brzdki, w których umieszcza się nasiona.



Rys.5. Siewnik.

Do sadzenia selerów i ziemniaków z rozsady stosowana jest sadzarka firmy Checchi& Magli Texdrive Best o chwytakowym zespole wysadzającym, który składa się z gumowej poduszki i sztywnej blaszki, między które wkłada się rozsadę. Gdy chwytak znajduje się w dolnym położeniu, roślina zostaje zwalniana z chwytaka i wpada w wykonaną przez redlicę bruzdę. Następnie korzenie rośliny są przesypywane ziemią, ugniataną przez koła.

Ważne w trakcie wschodów roślin jest ich nawadnianie. W tym celu stosowane są deszczownie RM IrrigationEquipment(rys. 6). Składają się z pompy, rurociągu napowierzchniowego i zraszaczy. Woda jest pobierana ze zbiornika pompą, która transportuje wodę rurociągiem do zraszaczy, które rozdeszczowują wodę na polu. Zasięg zraszaczy wynosi średnio 20 – 40 metrów, a natężenie zraszania to 4 – 18 milimetrów opadu na godzinę.



Rys.6. Deszczownia.

Gdy warzywa osiągną dojrzałość dokonuje się zbioru. Głównym środkiem transportu w gospodarstwach rolniczych są traktory. W badanym gospodarstwie rolnym znajdują się ciągniki dwóch firm: ciągnik John Deere 6030 oraz Case MXM 190 (rys. 7).

Do zbioru warzyw stosowane są w przedsiębiorstwie kombajny, które ścinają nać, podkopują korzenie i przenoszą całe rośliny z korzeniami na taśmy. A stamtąd na przyczepy, którymi warzywa zostaną przetransportowane do zakładu produkcyjnego. Do zbioru marchwi stosowany jest kombajn Dewulf GK II.

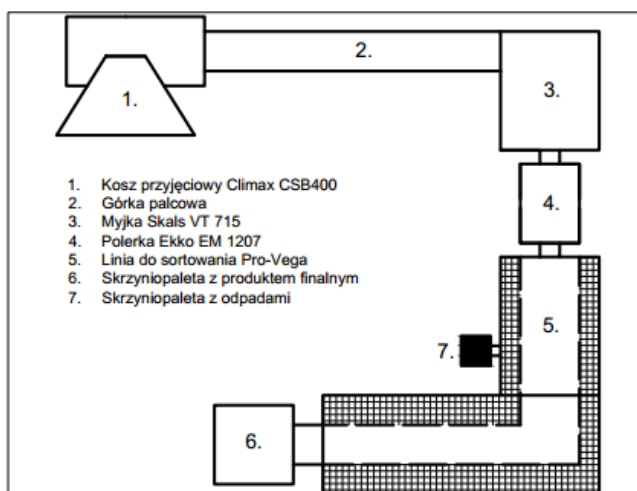
Ziemniaki wykopuje się przy pomocy kombajnu WM Kartoffelntechnik. Badane gospodarstwo rolne nie posiada w swoim przedsiębiorstwie kombajnu do zbioru selera. Gdy seler jest dojrzały przedsiębiorstwo wypożycza kombajn firmy Holmer od innego przedsiębiorstwa produkcyjnego.



Rys.7.8 Ciągnik firmy John Deere 6030 i Brytyjski traktor Case MXM 190.

Po zbiorze warzywa są przewożone do zakładu produkcyjnego, gdzie zostanie dokonane przygotowanie produktu do dystrybucji. Transport warzyw z pól odbywa się przy pomocy przyczep.

Po przyjeździe do zakładu przetwórczego warzywa trafiają na linię produkcyjną, która przedstawiona jest na rys 8.



Rys.8.9 Schemat linii do oczyszczania i sortowania warzyw..

W pierwszej kolejności warzywa umieszczane są w koszu przyjęciowym Climax CSB 400. Na tym etapie następuje odseparowanie ziemi od warzyw oraz selekcja warzyw poniżej kalibru. Kosz przyjęciowy jest zaprojektowany w sposób bezpieczny dla produktu, dzięki miękkiemu dnu ze zbierakami (Rys. 9, 10).



Rys.10. Wejście produktów na linię produkcyjną i pierwsze sortowanie.



Rys.11. Kosz przyjęciowy firmy Climax na produkty, które przeznaczone są do mycia i sortowania.

Z kosza przyjęciowego, posortowane wstępnie warzywa trafiają na górkę palcową (rys. 11). Jest to przenośnik schodowy, który transportuje warzywa do myjki Skals VT 715 (rys. 12). Myjka ma długość 3,18 metrów. Jej wydajność dla ziemniaków to 20 t/h, natomiast dla marchwi 13 t/h. Zbudowana jest ze stali nierdzewnej. Bęben ma długość 2,5 metra i średnicę 1,4 metra.



Rys.11. Górka palcowa.



Rys.12. Myjka firmy Skals.

Po procesie mycia następuje etap polerowania. Odbywa się on w polerce Ekko EM 1207 o mocy 7,9 kW (rys. 13). Polerka ta posiada 14 szczotek, które przy użyciu wody polerują warzywa w celu usunięcia drobnych korzonków i resztek ziemi. Bęben ma długość dwóch metrów. Na godzinę

zużywa 0,8 m³ czystej wody. Posiada pompę do obiegu zamkniętego. Wydajność takiej myjki to dla ziemniaków 7,5 t/h, natomiast dla marchwi 3 – 5 t/h.

Z polerki warzywa trafiają na linię do sortowania, która w głównej mierze składa się z przenośników taśmowych i odgławiarki (rys. 14). W tym miejscu warzywa są sortowane przez pracowników, którzy przy pomocy noża odcinają końcówki korzeni oraz odrzucają warzywa, które nie spełniają wymogów jakościowych. Na takiej linii może pracować nawet dwunastu pracowników jednocześnie. Linia została zaprojektowana przez firmę Pro-Vega na specjalne zamówienie badanego gospodarstwa rolnego.

Posortowane warzywa trafiają do skrzyniopalet, które następnie są przewożone wózkiem widłowym (rys 15) do miejsca składowania pod wiatą lub bezpośrednio na naczepę, którą gotowa partia warzyw zostanie przewieziona do odbiorcy. Wózki widłowe zasilane są gazem propan-butan ze względów bezpieczeństwa. Takie silniki nie emitują do otoczenia szkodliwych spalin, które mogłyby zanieczyścić produkty. Odpady z sortowanych warzyw są transportowane innym przenośnikiem i także trafiają do specjalnie oznaczonych skrzyniopalet. Odpady z produkcji są wykorzystywane jako pożywienie dla zwierząt gospodarskich, znajdujących się niedaleko przedsiębiorstwa.



Rys.13. Polerka firmy Ekko.



Rys.14. Odgławiarka marchwi firmy Pro-Vega.



Rys.15. Wózek widłowy na gaz wraz z zapakowanymi burakami na skrzyniopalecie gotowymi do załadowania na przyczepę do transportu.

8. Wnioski

Gospodarstwo Rolne Klaudiusz Matejka jest przedsiębiorstwem małym i bardzo dobrze zorganizowanym pod względem zarządzania przepływem materiałów. Ponadto w przedsiębiorstwie jest wprowadzony system zarządzania jakością produkcji i produktów, co wpływa na wartość konkurencyjną firmy i bezpieczeństwo produktów, które w obecnych czasach jest jedną z istotniejszych wartości firmy.

9. Literatura

- Kaczmarek T, Kaczmarek U, Sołowiej D i in. (2005) Ilustrowana Geografia Polski Wydawnictwo Publicat, Poznań, s. 54 – 55
- Podręcznik GlobalGAP z badanego gospodarstwa rolnego (2014), praca zbiorowa pod red. Instytut Ekonomiki Rolnictwa i Gospodarki Żywnościowej, Rolnictwo i gospodarka, Warszawa
- Strona Bobovita <http://www.bobovita.pl/jakosc-bobovita>, dostęp z dnia 19.05.2016
- Strona GlobalGAP <http://www.globalgap.org>, dostęp z dnia 10.05.2016
- Strona Firmy Nutricia <http://www.nutricia.com.pl>, dostęp z dnia 19.05.2016
- Szczucki C (1971) Pojęcie i zakres znaczeniowy cech składający się na jakość produktów mięsnych, Przemysł spożywczy, nr 10, s. 23 – 30
- Wiśniewska M (2011) GlobalGAP. Podstawy, wymagania, wdrażanie i kontrola. Ośrodek Doradztwa i Doskonalenia Kadr Sp. z o.o., Gdańsk

11. Powstawanie, rozwój i funkcjonowanie pręcików u roślin

Formation, development and functioning of stamens in plants

Przedniczek Krzysztof, Kotarski Dawid, Marciniak Katarzyna

Katedra Fizjologii Roślin i Biotechnologii, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Toruń

Opiekun naukowy: Katarzyna Marciniak

Krzysztof Przedniczek: k.przed@doktorant.umk.pl

Słowa kluczowe: pręciki, tapetum, otwieranie pylników, ziarna pyłku

Streszczenie

Prawidłowe formowanie, rozwój i funkcjonowanie męskich organów płciowych jest niezbędne w celu zapewnienia pełnego sukcesu reprodukcyjnego roślin. Zawiązki pręcików pojawiają się w trzecim okółku kwiatowym, a następnie ulegają dyferencjacji w dwie morfologicznie różne części - nitkę oraz główkę. W rozwoju pręcików wyróżnia się fazy wczesne, obejmujące etapy przed mejozą, oraz późne występujący po mejozie gdzie realizowane są programy rozwojowe związane z wydłużaniem nitki pręcika, dojrzewaniem pyłku, otwieraniem pylników oraz końcowo uwolnieniem żywotnych ziaren pyłku. Struktura pręcików została szczegółowo opisana u *Arabidopsis thaliana*, gdzie wyróżniono łącznie 14 faz rozwoju obejmujących zarówno podziały, różnicowanie, jak i degenerację komórek. W procesie dojrzewania pyłku kluczową rolę pełni tapetum będące tkanką bezpośrednio okalającą komory pyłkowe. Rozwój i funkcjonowanie tapetum jest ściśle kontrolowane przez czynniki genetyczne, a odpowiedni czas degradacji tej tkanki zapewnia sukces związany z produkcją żywotnych ziaren pyłku. Kluczowym etapem w rozwoju i funkcjonowaniu pręcików jest otwieranie pylników i uwolnienie pyłku poprzedzone sekwencją zdarzeń, tj.: powstanie wtórnych zgrubień ścian komórek endotecjum i łącznika, degeneracja komórek przegrody (septum) skutkująca połączeniem dwóch komór pyłkowych oraz degeneracja stomium, czyli wyspecjalizowanych komórek epidermy. Zgrubienia w wewnętrznych warstwach ściany pylnika i jednoczesny brak zgrubień w komórkach septum i stomium sprzyja wytworzeniu siły powodującej zaburzenie struktury stomium. W celu prawidłowego otwarcia się pylników konieczne jest również odwodnienie poszczególnych tkanek skutkujące działaniem siły w przeciwnym kierunku. Konsekwencją tych zdarzeń jest uwolnienie ziaren pyłku.

1. Wstęp

Rozwój organów generatywnych jest kluczowym procesem w cyklu rozwojowym roślin zapewniającym przetrwanie gatunku. Po zakończeniu rozwoju wegetatywnego, który może trwać od kilku dni do kilkudziesięciu lat, roślina wchodzi w fazę rozwoju generatywnego. Ma to miejsce wtedy, gdy zarówno czynniki środowiskowe (egzogenne) oraz wewnętrzne (endogenne) sprzyjają osiągnięciu sukcesu reprodukcyjnego (Kopcewicz i Lewak 2007). Pierwszy etap indukcji kwitnienia związany jest z odblokowaniem specyficznych genów w komórkach liścieni lub liści. Wytworzony w ten sposób induktor kwitnienia przenoszony jest następnie do wierzchołka wzrostu pędu gdzie zapoczątkowuje proces inicjacji zawiązków kwiatowych. Ostatnim etapem jest morfogeneza elementów kwiatowych. Podstawowy schemat budowy kwiatu zakłada istnienie czterech koncentrycznych okółków tworzonych przez cztery typy organów, kolejno są to działki kielicha, płatki korony, pręciki i słupki. Dzięki badaniom prowadzonym w latach 90. ubiegłego stulecia, głównie na *Arabidopsis thaliana* i *Antirrhinum majus*, stworzono model obrazujący genetyczną regulację powstawania określonych struktur w obrębie kwiatu. Zakłada on zależność tożsamości kolejnych elementów budujących kwiat od interakcji trzech klas genów homeotycznych (klasa A, B, C), czyli takich, których ekspresja w określonym miejscu i czasie reguluje aktywność innych genów na zasadzie kaskady, dając w efekcie charakterystyczny dla danego okółka fenotyp (Turczyn 2011). Dalsze badania ukierunkowane na poznanie modelu ABC przyczyniły się do jego rozszerzenia

o kolejne klasy genów, tj. D oraz E. Rozbudowanie to pozwoliło na sprecyzowanie zasad współdziałania produktów aktywności genów należących do modelu ABCDE. Tak zwany model FQM (ang. FLORAL QUARTET MODEL) zakłada, że poszczególne białka będące produktami odpowiednich dla danego okółka genów, tworzą kompleksy tetramerów wiążące się w specyficznych miejscach DNA zwanych kasetami CARG zlokalizowanych w regionach promotorowych genów docelowych. W ten sposób następuje aktywacja lub hamowanie ekspresji danego genu. Odpowiednia kombinacja tych czynników transkrypcyjnych determinuje powstanie poszczególnych organów kwiatowych. Pręciki powstają w trzecim okółku dzięki połączeniu aktywności transkrypcyjnej genów klasy BCE. Z kolei według FQM tożsamość pręcików określa aktywność kompleksu białkowego zbudowanego z białka klasy E - SEP (ang. SEPALLATA), dwóch białek klasy B - AP3 (ang. APETALA3) i PI (ang. PISTILLATA) oraz białka klasy C – AG (ang. AGAMOUS) (Theissen i in. 2016).

2. Przegląd literatury

2.1 Struktura i rozwój pręcików

Pręcik składa się z dwóch morfologicznie różnych części - nitki oraz główki. Nitka posiada strukturę radialną z pojedynczą wiązką przewodzącą, a funkcja, jaką pełni to transport wody i składników odżywczych oraz zapewnienie wsparcia strukturalnego, jak i odpowiednie rozmieszczenie główki w przestrzeni. Główka pręcika zawiera tkanki reprodukcyjne i niereprodukcyjne, które przyczyniają się do dojrzewania, ochrony i uwalniania pyłku. Na ogół główka ma obustronnie symetryczną, czteropłatkową strukturę, a każdy płatek zawiera woreczek pyłkowy (mikrosporangium). W zróżnicowanej główce pręcika każda komora pyłkowa, w której rozwija się pyłek, otoczona jest czterema odrębnymi, koncentrycznymi warstwami komórek pełniących specjalne zadania w rozwoju pręcików. Pomiedzy dwoma pylnikami zlokalizowana jest wiązką przewodzącą i łącznik (Cardarelli i Cecchetti 2014).

Wczesne i późne fazy rozwoju pręcików zostały szczegółowo opisane u modelowej rośliny *Arabidopsis thaliana* gdzie wyróżniono ich łącznie 14. Zawiązki pręcików pojawiają się w wyniku podziałów w warstwach L1, L2 i L3 merystemu kwiatowego w piątej fazie rozwoju kwiatów/pierwszej fazie rozwoju pręcików (Sanders i in. 1999). Od 5 do 9 fazy rozwoju kwiatów (1-5 faza rozwoju pręcików) podziały komórek w warstwie L1 skutkują pojawieniem się epidermy pręcika, natomiast podziały w warstwie L3 prowadzą do wytworzenia łącznika i wiązki przewodzącej. Peryklinalne podziały komórek archesporialnych warstwy L2 skutkują powstaniem odrębnych linii komórek parietalnych i sporogennych pierwszego stopnia, dzięki czemu powstają cztery mikrosporangia. Pierwotne komórki parietalne dają początek trzem warstwom ściany pylnika (tapetum, warstwa środkowa i endotecjum), a pierwotne komórki sporogenne przekształcają się w komórki macierzyste mikrospor (8 faza rozwoju kwiatu/4 faza rozwoju pręcika). Komórki macierzyste przechodzą mejozę tworząc haploidalne tetrazy mikrospor otoczone ścianą kalozową (9 faza rozwoju kwiatu/5 faza rozwoju pręcika). Jako późne stadia rozwoju pręcików określa się te występujące po 10 fazie rozwoju kwiatu. Obejmują one trzy różne programy rozwojowe tj. wydłużanie nitki, dojrzewanie pyłku oraz otwieranie pylników. W 10 fazie rozwoju kwiatu/8 fazie rozwoju pręcika ściana kalozowa otaczająca tetrazy ulega degeneracji, co prowadzi do uwolnienia poszczególnych mikrospor do komór. Następnie mikrospory wytwarzają ścianę egzynową i ulegają wakuolizacji w 10 fazie rozwoju kwiatów/9 fazie rozwoju pręcika. Pierwszy podział mitotyczny mikrospor występuje na 11 etapie rozwoju kwiatów (10 etap rozwoju pręcika) i powoduje powstanie dwukomórkowych ziaren pyłku, podczas gdy drugi podział mitotyczny pyłku występuje w 12 fazie rozwoju kwiatu/pręcika, w wyniku którego powstają trzykomórkowe ziarna pyłku (13 faza rozwoju kwiatu/pręcika). Całościowy program prowadzący do pęknięcia pylników obejmuje: (1) degenerację warstwy środkowej i tapetum w 11 fazie rozwoju kwiatu/10 fazie rozwoju pręcika; (2) rozrost endotecjum oraz zgrubienie ścian komórek endotecjum i łącznika (11 faza rozwoju kwiatu i pręcika); (3) degenerację przegrody (ang. septum), która skutkuje powstaniem bilokularnej główki na 12 etapie rozwoju kwiatu i pręcika. Przerwanie stomium, czyli wyspecjalizowanych komórek epidermy i uwolnienie pyłku jest ostatnim i kluczowym procesem mającym miejsce podczas 13 fazy rozwoju

kwiatu (12-13 faza rozwoju pręcika). Wzrost nitki pręcika rozpoczyna się od 10 fazy rozwoju kwiatu, a gwałtownie przyspiesza w 12-13 fazie w związku z szybkim wydłużaniem się komórek. Po wypyleniu główka i nitka starzeją się i odpadają z rośliny z resztą kwiatu (fazy 14a-14c) (Sanders i in. 1999; Cardarelli i Cecchetti 2014).

2.2 Genetyczna kontrola powstawania, rozwoju i funkcjonowania tapetum oraz pyłku

Tapetum stanowi tkankę będącą w bezpośrednim kontakcie z rozwijającym się pyłkiem. Funkcja, jaką pełni polega na wydzielaniu metabolitów, enzymów, substancji odżywczych oraz substancji budujących otoczkę pyłku, w tym głównie prekursorów sporopolenin (Liu i Fan 2013). Powstanie i rozwój tapetum oraz rozwój ściany pyłku są ściśle kontrolowane przez czynniki genetyczne (Rys. 1).



Rys. 1. Genetyczna regulacja powstawania i rozwoju tapetum oraz pyłku. Szczegóły i wyjaśnienie skrótów w tekście (Liu i Fan 2013).

Zgodnie z modelem FQM, interakcje tetramerów ze specyficznymi regionami DNA prowadzą do aktywacji m. in. genu *SPL/NZZ* (ang. *SPOROCTELESS/NOZZLE*) kodującego czynnik transkrypcyjny z rodziny MADS zaangażowany w regulację tworzenie sporocytów, jak i proliferację komórek. U mutantów *spl/nzz*, z warstwy L2 prawidłowo powstają komórki archesporialne, a następnie pierwotne komórki sporogenne i parietalne, ale ich rozwój jest zaburzony, co uniemożliwia powstanie komórek macierzystych pyłku. Skutkuje to męską sterylnością. Komunikacja pomiędzy poszczególnymi warstwami komórek jest niezbędna w celu koordynacji różnicowania się poszczególnych tkanek (Yang i in. 1999). Podczas wczesnego rozwoju główki pręcika funkcję koordynującą pełnią kinazy receptorowe bogate w powtórzenia leucyny (LRR-RLKs, ang. LEUCINE-RICH REPEAT RECEPTOR-LIKE KINASES), takie jak: BAM1/BAM2 (ang. BARELY ANY MERISTEM 1/2), EMS1/EXS (ang. EXCESS MICROSPOROCTES 1/EXTRA SPOROGENOUS CELLS) oraz SERK1/SERK2 (ang. SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE 1/2) (Liu i Fan 2013). Aktywność transkrypcyjna genu *SPL/NZZ* jest hamowana przez białka BAM1 i BAM2, których rolą przypuszczalnie jest równoważenie ilości komórek sporogennych i somatycznych. Podwójny mutant *bam1 bam2* nie posiada warstw komórek somatycznych, a komórki wywodzące się z warstwy L2 mają charakter komórek macierzystych pyłku (Hord i in. 2006). Ponadto inicjację komórek tapetum i ustalenie tożsamości mikrosporocytów kontroluje gen *EMS1/EXS* wraz z ligandem kodowanym przez gen *TPD1* (ang. *TAPETUM DETERMINANT 1*). Mutacje w tych genach skutkują zmianą ilości komórek archesporialnych, a także brakiem tapetum i warstwy środkowej. Podobną rolę w powstawaniu tapetum odgrywają geny *SERK1* i *SERK2*, które

wraz z *EMS1/EXS* i *TPD1* działają poniżej *SPL/NZZ* (Yang i in. 2007). W dalszych fazach wczesnego rozwoju główki pręcika, po powstaniu warstwy komórek tapetum, ważną rolę odgrywiają geny kodujące czynniki transkrypcyjne z rodziny MYB oraz bHLH (helisa-pętla-helisa, ang. basic helix-loop-helix). Działające redundantnie geny *MYB33* i *MYB65* wpływają na rozwój tapetum około etapu mejozy, a białka, które kodują mogą tworzyć heterodimery z białkiem DYT1 (ang. DYSFUNCTIONAL TAPETUM 1) w celu regulacji ekspresji kolejnych genów związanych z rozwojem tapetum. Podobnie jak pojedynczy mutant *dyl1*, podwójny mutant *myb33/myb65* wykazuje hipertrofię tapetum podczas procesu mejozy, co skutkuje całkowitym przerwaniem rozwoju pyłku (Millar i Gubler 2005). Dodatkowo stwierdzono, że u mutantu *dyl1* ekspresja genów *SPL/NZZ*, *TPD1*, *EMS1/EXS*, *SERK1*, *SERK2*, *MYB33* i *MYB65* nie różni się w porównaniu do roślin typu dzikiego (WT, ang. WILD TYPE), co wskazuje, że ich aktywność transkrypcyjna nie jest kontrolowana przez DYT1. Wykazano jednak, że DYT1 promuje ekspresję genu *TDF1* (ang. TAPETAL DEVELOPMENT AND FUNCTION 1). U mutantu *tdf1* stwierdzono występowanie powiększonych i silnie zwakalizowanych komórek tapetum oraz brak produkcji pyłku. DYT1 reguluje również geny, tj. *AMS* (ang. ABORTED MICROSPORES), *MS1* (ang. MALE STERILITY 1) oraz *MYB80* (*MYB103*) ulegające ekspresji w okresie post-mejotycznym w celu regulacji rozwoju i/lub funkcjonowania tapetum, jak i produkcji żywotnego pyłku. Obecność transkryptów genu *AMS* stwierdzono zarówno w tapetum, jak i mikrosporach formowanych po mejozie. Jego białkowy produkt reguluje geny związane z rozwojem pyłku m. in. *ABCG26* (ang. ABC TRANSPORTER G FAMILY MEMBER 26), który jest zaangażowany w transport substancji tworzących otoczkę egzynową pyłku. *AMS* może również pośrednio regulować programowaną śmierć komórek (PCD, ang. PROGRAMMED CELL DEATH) tapetum. Inny gen *MYB80* wykazuje ekspresję tylko w tapetum i wpływa na aktywność *MS1*, *MS2* (ang. MALE STERILITY 2) oraz *UNDEAD*, które odgrywiają kluczową rolę w regulacji produkcji egzyny i rozwoju otoczki pyłku. Ponadto gen *UNDEAD* jest zaangażowany w regulację PCD tapetum, co jest bardzo istotne dla poprawnego rozwoju ziarna pyłku, natomiast gen *MS1* reguluje ekspresję genów z rodziny *NAM* oraz *MYB99*, których produkty koordynują tworzenie otoczek pyłku, późny rozwój tapetum oraz jego PCD (Liu i Fan 2013).

2.3 Regulacja procesu otwierania pylników

Poza roślinami, u których zahamowany jest rozwój pyłku, męskosterylność występuje też u tych, gdzie zaburzony został proces otwierania pylników. Czas uwolnienia pyłku jest niezwykle istotny, ponieważ pozwala kontrolować proces zapylenia, a następnie zapłodnienia. Uwolnienie pyłku poprzedzone jest sekwencją zdarzeń, tj. powstanie wtórnych zgrubień ścian komórek endoteczum i łącznika, degeneracja komórek septum skutkująca połączeniem dwóch komór pyłkowych oraz degeneracja komórek stomium. Wtórne zgrubienia ścian tworzą się w wyniku odkładaniu warstw ligninowocelulozowych w postaci poprzecznych listew, co zapewnia mechaniczną siłę umożliwiającą otwarcie pylników (Keijzer 1987). Jednym z głównych czynników transkrypcyjnych regulujących ten proces jest *MYB26*. U mutantu *myb 26* stwierdzono normalny rozwój pręcika aż do 11 fazy rozwoju oraz prawidłową degenerację komórek stomium i septum, jednak nie zostają wytworzone wtórne zgrubienia ligninowocelulozowe w komórkach endoteczum, które przez to nie powiększają się, a zapadają, a późniejsze kurczenie się ścian pylników nie występuje, co skutkuje brakiem otwierania pylników oraz uwalniania pyłku. W związku z tym białko *MYB26* uznaje się za kluczowy czynnik regulujący ekspansję komórek endoteczum i powstawanie wtórnych zgrubień w komórkach główki pręcika (Yang i in. 2007b). Dodatkowo wykazano, że nadekspresja *MYB26* powoduje ektopowe wtórne zgrubienia w różnych tkankach nadziemnych. Innymi genami związanymi z procesem tworzenia wtórnych zgrubień są *NST1* i *NST2* (ang. NAC SECONDARY WALL TICKENING PROMOTING FACTOR 1/2), kodujące czynniki transkrypcyjne z domeną NAC. Ekspresja *NST2* zachodzi przede wszystkim w główce pręcika natomiast ekspresja *NST1* również w tkankach wegetatywnych (Wilson i in. 2011). Podwójny mutant *nst1 nst2* wykazuje męskosterylność związaną z brakiem otwierania się pylników. Podobnie jak u mutantu *myb26* nie stwierdzono występowania wtórnych zgrubień ścian komórek endoteczum. U *A. thaliana* ekspresja *MYB26*, *NST1* i *NST2* regulowana jest przez gen *UCL1* (ang. UPCURLED LEAF 1). U mutantu *ucl1* pylniki nie

otwierają się, co jest prawdopodobnie spowodowane regulacją przez jeden z 16 czynników transkrypcyjnych z rodziny HD-ZIP klasy IV (ang. HOMEODOMAIN-LEUCINE ZIPPER CLASS IV) – HDG3 (ang. HOMEODOMAIN GLABROUS 3). Nadekspresja *HDG3* wpływa na ekspresję genów znajdujących się poniżej w szlaku, czyli *MYB26*, *NST1* i *NST2*, co sugeruje, że białko HDG3 odgrywa negatywną rolę w regulacji otwierania pylników (Li i in. 2007). Nie mniej jednak *HDG3* ulega ekspresji na niskim poziomie w tkankach pręcików WT, w związku z tym wpływ, jaki wywiera na otwarcie pylników może być także konsekwencją ekspresji ektopowej. Innym genem, którego aktywności transkrypcyjnej nie stwierdzono w tkankach rozwijającego się pręcika, zaangażowanym jednak w powstawanie wtórnych zgrubień ścian komórek endoteczum, jest *RPK2* (ang. RECEPTOR-LIKE PROTEIN KINASE 2). Mutant *rpk2* jest męskosterylny i wykazuje różnorodne defekty związane z rozwojem pyłku włączając także nieprawidłowy rozwój tapetum, brak dyferencjacji komórek warstwy środkowej, jak i zaburzenia otwierania się pylników skorelowane z brakiem wtórnych zgrubień ścian endoteczum, które się zapadają (Mizuno i in. 2007; Wilson i in. 2011).

Powstawanie wtórnych zgrubień endoteczum znajduje się także pod kontrolą hormonów roślinnych, czego dowiodły wyniki badań przeprowadzonych na roślinach męskosterylnych posiadających mutacje w genie *ABI8* (ang. ABSCISIC ACID-INSENSITIVE 8) kodującym białko zaangażowane w szlak transdukcji sygnały kwasu abscysynowego (ABA, ang. ABCISIC ACID). Gen *ABI8* związany jest również z interakcjami pomiędzy szlakiem sygnałowym jasmonianów (JAs, ang. JASMONATES) i etylenu (ET, ang. ETHYLENE), dwóch fitohormonów związanych ściśle z odpowiedzią roślin na stres biotyczny i abiotyczny. Sugeruje to, że wtórne zgrubienia ścian endoteczum są regulowane bezpośrednio bądź pośrednio przez różne czynniki środowiskowe. Innym fitohormonem zaangażowanym w powstawanie wtórnych zgrubień ścian są cytokininy (CK, ang. CYTOKININS) (Brocard-Gifford 2004). Gen *AHP4* (ang. ARABIDOPSIS HISTIDINE-CONTAINING PHOSPHOTRANSFER 4), będący jednym z komponentów ich szlaku sygnałowego, zaangażowany jest w przenoszenie grup fosforylowych. Nadekspresja *AHP4* hamuje powstawanie wtórnych zgrubień, natomiast u mutanta *aph4* stwierdzono zaledwie nieznaczne osłabienie tego procesu. Ponadto ekspresja tego genu koreluje z ekspresją genów *IRX1*, *IRX6* oraz *IRX8* (ang. IRREGULAR XYLEM 1/6/8) sugerując udział w biosyntezie celulozy (Jung i in. 2008).

Aby roślina wytwarzała prawidłowo rozwinięte pręciki zdolne do otwarcia się w odpowiednim czasie, konieczna jest degradacja zarówno komórek warstwy środkowej, tapetum, septum oraz stomium na właściwym etapie rozwoju. U męskosterylnego mutanta *A. thaliana non-dehiscence1* stwierdzono normalny rozwój pyłku jednak endoteczum przechodzi nietypową degradację skutkującą zahamowaniem otwierania pylników (Sanders i in. 1999). Wyniki innych badań przeprowadzonych u *Lilium* pokazują, że PCD ma miejsce w komórkach tapetum, następnie w komórkach warstwy środkowej, stomium, a po otwarciu pylników również w komórkach endoteczum (Varnier i in. 2005). Podobne wnioski na temat roli PCD w procesie degradacji różnych komórek podczas otwierania pylników wyciągnięto na podstawie wyników badań ultrastruktury u *Solanum lycopersicum*. W komórkach septum, warstwy środkowej oraz epidermy wokół stomium stwierdzono takie objawy PCD jak: kondensacja jądra, kureczenie się błony plazmatycznej oraz zaburzenia struktury mitochondriów. Zidentyfikowano również rycynosomy będące pęcherzykami zawierającymi proteazy cysteinowe, kluczowe w ostatnich etapach PCD (Senatore i in. 2008). U *Solanum melongena* proteazy cysteinowe obecne są w epidermie i endoteczum podczas otwierania pylników, natomiast u *Nicotiana tabacum* zlokalizowano je również w stomium oraz na późniejszych etapach w endoteczum i łączniku (Wilson i in. 2011).

W procesie otwierania pręcików bardzo istotną rolę odgrywa fakt, iż ściany septum i stomium nie ulegają wtórnym zgrubieniom, a siły oddziałujące na ściany pręcika są zróżnicowane, co ułatwia ich pęknięcie. W komórkach septum zachodzi liza blaszki środkowej, a komórki przylegającej epidermy zaczynają pęcznieć prowadząc do zwiększenia się obwodu komory pyłkowej, jednak w związku z tym, że wewnętrzne warstwy pręcika, takie jak endoteczum posiadają wtórne zgrubienia, a ich wielkość i odwód nie ulega zmianie, wytwarza się siła powodująca wyginanie się ściany pręcika do wnętrza, zaburzając strukturę komórek stomium. W ostatnich stadiach otwierania pylnika niezbędne jest usunięcie wody z komórek endoteczum i epidermy powodujące wyginanie się ścian pylnika do zewnątrz (Wilson i in. 2011).

3. Podsumowanie

Poprawny rozwój pręcików związany jest z licznymi podziałami i różnicowaniem poszczególnych komórek, a także ścisłą kontrolą rozwoju ziaren pyłku. Znajdujący się w komorach pyłek otoczony jest wyspecjalizowaną tkanką tapetum koordynującą jego rozwój. Kluczowy dla sukcesu reprodukcyjnego jest także odpowiedni moment otwierania pylników poprzedzony wytworzeniem wtórnych zgrubień ścian endotecjum, degeneracją komórek septum i stomium, jak i odwodnieniem tkanek pylników.

Dzięki analizie mutantów, głównie modelowej rośliny *A. thaliana*, zidentyfikowano liczne geny zaangażowane w regulację omawianych procesów. Rozwój nowoczesnych metod biologii molekularnej, inżynierii genetycznej, jak i metod związanych z analizą całych genomów, transkryptomów czy proteomów pozwala projektować eksperymenty, w których testuje się złożone hipotezy czy modele interakcji czynników kontrolujących procesy wzrostu i rozwoju pręcików. Równocześnie istnieje realna potrzeba poznawania mechanizmów funkcjonowania tych procesów u gatunków istotnych gospodarczo w celu poprawy plonowania i zwiększenia areału ich uprawy.

4. Literatura

- Brocard-Gifford I (2004) The *Arabidopsis thaliana* ABSCISIC ACID-INSENSITIVE8 locus encodes a novel protein mediating abscisic acid and sugar responses essential for growth. *Plant Cell* 16: 406–421.
- Cardarelli M, Cecchetti V (2014) Auxin polar transport in stamen formation and development: how many actors? *Front Plant Sci* 5: 333.
- Hord CLH, Chen C, Deyoung BJ i in. (2006) The BAM1/BAM2 receptor-like kinases are important regulators of *Arabidopsis* early anther development. *Plant Cell* 18: 1667–1680.
- Jung KW, Oh S-I, Kim YY i in. (2008) *Arabidopsis* histidine-containing phosphotransfer factor 4 (AHP4) negatively regulates secondary wall thickening of the anther endothecium during flowering. *Mol Cells* 25: 294–300.
- Keijzer CJ (1987) The processes of anther dehiscence and pollen dispersal. I. The opening mechanism of longitudinally dehiscing anthers. *New Phytol* 105: 487–498.
- Kopcewicz J, Lewak S (2007) *Fizjologia roślin*. Wydawnictwo Naukowe PWN.
- Li Q-J, Xu B, Chen X-Y i in. (2007) The effects of increased expression of an *Arabidopsis* HD-ZIP gene on leaf morphogenesis and anther dehiscence. *Plant Sci* 173: 567–576.
- Liu L, Fan X (2013) Tapetum: regulation and role in sporopollenin biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol* 83: 165–175.
- Millar AA, Gubler F (2005) The *Arabidopsis* GAMYB-like genes, MYB33 and MYB65, are microRNA-regulated genes that redundantly facilitate anther development. *Plant Cell* 17: 705–721.
- Mizuno S, Osakabe Y, Maruyama K i in. (2007) Receptor-like protein kinase 2 (RPK 2) is a novel factor controlling anther development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 50: 751–766.
- Sanders PM, Bui AQ, Weterings K i in. (1999) Anther developmental defects in *Arabidopsis thaliana* male-sterile mutants. *Sex Plant Reprod* 11: 297–322.
- Senatore A, Trobacher CP, Greenwood JS (2008) Ricinosomes predict programmed cell death leading to anther dehiscence in tomato. *Plant Physiol* 149: 775–790.
- Theißen G, Melzer R, Rümpler F (2016) MADS-domain transcription factors and the floral quartet model of flower development: linking plant development and evolution. *Development* 143: 3259–71.
- Turczyn M (2011) ABC architektury kwiatu. *Post Biol Kom* 38: 673–684.
- Varnier A-L, Mazeirat-Gourbeyre F, Sangwan RS i in. (2005) Programmed cell death progressively models the development of anther sporophytic tissues from the tapetum and is triggered in pollen grains during maturation. *J Struct Biol* 152: 118–128.
- Wilson ZA, Song J, Taylor B i in. (2011) The final split: the regulation of anther dehiscence. *J Exp Bot* 62: 1633–1649.

Yang C, Vizcay-Barrena G, Conner K i in. (2007a) MALE STERILITY1 is required for tapetal development and pollen wall biosynthesis. *Plant Cell* 19: 3530–3548.

Yang C, Xu Z, Song J i in. (2007b) Arabidopsis MYB26/MALE STERILE35 regulates secondary thickening in the endothecium and is essential for anther dehiscence. *Plant Cell* 19: 534–548.

Yang WC, Ye D, Xu J i in. (1999) The SPOROCTELESS gene of Arabidopsis is required for initiation of sporogenesis and encodes a novel nuclear protein. *Genes Dev* 13: 2108–2117.

Niniejsza praca powstała w trakcie realizacji programu wieloletniego MRiRW (uchwała nr 222/2015 Rady Ministrów z dnia 15 grudnia 2015 r.)

12. Porównanie wybranych parametrów aktywności wymiany gazowej trzech gatunków z rodzaju *Fragaria* w uprawie hydroponicznej

Comparison of selected parameters of gas exchange activity of three *Fragaria* species in hydroponic cultivation

Rokosa Marta

Katedra Fizjologii Roślin i Biochemii, Wydział Kształtowania Środowiska i Rolnictwa,
Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie
Opiekun naukowy: Mikiciuk Małgorzata

Rokosa Marta: marta.rokosa@zut.edu.pl

Słowa kluczowe: truskawka, poziomka, fotosynteza, transpiracja

Streszczenie

Fragaria jest jednym z rodzajów w obrębie rodziny *Rosaceae*. Najpopularniejszymi jego przedstawicielami są: truskawka (*Fragaria x ananassa* Duch.), powstała ze skrzyżowania poziomki wirginijskiej (*Fragaria virginiana* Mill.) i poziomki chilijskiej (*Fragaria chiloensis* Mill.), oraz poziomka pospolita (*Fragaria vesca* L.), których walory smakowe są uważane za niezwykle atrakcyjne przez ogromne grono konsumentów na całym świecie. Truskawki i poziomki posiadają wiele korzystnych cech, jak np. niskokaloryczność, wysoka zawartość antyoksydantów i witaminy C, przeczyszczające, moczopędne, ściągające, przeciwbiegunkowe oraz antyseptyczne.

Badaniami przeprowadzonymi w 2018 roku zostały objęte rośliny gatunków *Fragaria virginiana*, *Fragaria chiloensis* oraz *Fragaria vesca*, pochodzące z uprawy hydroponicznej uzyskane z the National Clonal Germplasm Repository (NCGR) należącego do U.S. Department of Agriculture, Agriculture Research Service (USDA ARS) w Corvallis, w stanie Oregon (USA). Celem badań było porównanie wyżej wymienionych gatunków pod względem aktywności procesów asymilacji i transpiracji, a także parametrów wpływających na te procesy, tj. przewodności szparkowej, stężenia CO₂ w przestworach miękiszu asymilacyjnego oraz efektywności wykorzystania wody (WUE) jako stosunku intensywności asymilacji do transpiracji, podczas uprawy w zamkniętym systemie hydroponicznym. Pomiar wymiany gazowej wykonano za pomocą analizatora gazu typu TPS-2 z kamerą PLC-4 (PP System, USA), pracującego w układzie otwartym.

Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że badane gatunki różnią się między sobą pod względem aktywności transpiracyjnej i asymilacyjnej. Najwyższe wartości intensywności transpiracji (E), przewodności szparkowej (g_s) i stężenia CO₂ w przestworach międzykomórkowych stwierdzono (c_i) u *F. virginiana*. Najniższe wartości E i g_s stwierdzono dla gatunku *F. vesca* a c_i u *F. chiloensis*. Najwyższą wartość natężenia procesu asymilacji CO₂ (A) stwierdzono natomiast u *F. chiloensis*.

1. Wstęp

Produkcja owoców truskawek i poziomek jest jedną z najbardziej zintensyfikowanych w Europie. Zajmują one trzecie miejsce pod względem ekonomicznym wśród gatunków roślin uprawianych w klimacie umiarkowanym (Oosumi i in. 2016). Rocznie na tym obszarze produkowanych jest ok. 4 500 000 t tych owoców, w tym 290 000 t rocznie w Hiszpanii, 156 000 t rocznie w Niemczech. W Polsce wielkość produkcji owoców truskawki wynosi ok. 150 000 t rocznie (Sowik i in. 2015).

Duże zainteresowanie produkcją owoców z rodzaju *Fragaria* jest wynikiem ich atrakcyjności pod względem smaku (Debnath 2009). W rodzaju *Fragaria* wyróżnia się dwanaście gatunków i liczne odmiany, które uprawiane są w aż 37 krajach na całym świecie (Biswas i in. 2009). *Fragaria* jest jednym z rodzajów w obrębie rodziny *Rosaceae*. Najpopularniejszymi jego przedstawicielami są: truskawka (*Fragaria x ananassa* Duch.), powstała ze skrzyżowania poziomki wirginijskiej (*Fragaria virginiana* Mill.) i poziomki chilijskiej (*Fragaria chiloensis* Mill.), oraz

poziomka pospolita (*Fragaria vesca* L.), Już na poziomie odmian zauważa się znaczące różnice pod względem wielkości, barwy, smaku, kształtu owoców, stopnia płodności, terminu dojrzewania, odporności na choroby, produktywności i składu chemicznego owoców.

Truskawka (*Fragaria x ananassa* Duch.) jest heterozygotycznym oktoploidem ($2n = 8x = 56$) (Rokosa i Mikiciuk 2017, Owen i Miller 1996), odmiennie od poziomki (*Fragaria vesca* L), której wielkość genomu jest znacznie mniejsza, niewiele większa od genomu *Arabidopsis thaliana* (Oosumi i in. 2006). Przyczynił się do tego fakt, iż poziomka w odróżnieniu od truskawki jest diploidem ($2n=2x=14$) (El Monsouri i in. 1996). Straty te powodowane przez choroby grzybowe, a głównie przez patogeny glebowe (Sowik i in. 2015).

Wszystkie gatunki w obrębie rodzaju *Fragaria* są cenne ze względu na zawartość niskokalorycznych węglowodanów, antyoksydantów (karotenoidów, witamin, fenoli, flawonoidów, glutationu) (Rokosa i Mikiciuk 2017). Rośliny te doceniane są również ze względu na ich prozdrowotny charakter. Poziomki i truskawki posiadają wysoką, przewyższającą niektóre cytrusy, zawartość witaminy C. Ponadto działają przeczyszczająco, moczopędnie, ściągająco, przeciwbiegunkowo, antyseptycznie. Są wykorzystywane w medycynie ludowej jako środek antyreumatyczny, do leczenia zaburzeń układu pokarmowego, chorób skóry, zapalenia śluzówki jelita (Yildirim i Turker 2014).

Ze względu na fakt, iż produktywność roślin jest warunkowana głównie jej genotypem i związanymi z nim właściwościami fizjologicznymi, szczególnie z aktywnością procesów asymilacji i transpiracji (Wróbel 2006), celem badań było porównanie trzech wybranych gatunków roślin z rodzaju *Fragaria* pod względem aktywności procesów asymilacji i transpiracji, a także parametrów wpływających na te procesy, tj. przewodności szparkowej, stężenia CO_2 w przestworach miększu asymilacyjnego oraz efektywności wykorzystania wody (WUE) jako stosunku intensywności asymilacji do transpiracji, podczas uprawy w zamkniętym systemie hydroponicznym.

2. Materiał i metody

Badaniami przeprowadzonymi w 2018 roku zostały objęte rośliny z gatunków *Fragaria virginiana*, *Fragaria chiloensis* oraz *Fragaria vesca*, pochodzące z uprawy hydroponicznej uzyskane z the National Clonal Germplasm Repository (NCGR) należącego do U.S. Department of Agriculture, Agriculture Research Service (USDA ARS) w Corvallis, w stanie Oregon (USA).

Nasiona kiełkowały na wełnie kamiennej zanurzonej w wodzie, umieszczone w fitotronie w optymalnych warunkach temperatury ($24^{\circ}C$), oświetlenia (16h światła i 8h ciemności) i wilgotności (70% wilgotności względnej).



Rys. 1. Kiełkujące nasiona *F. virginiana*, *F. chiloensis* i *F. vesca* na wkładach z wełny kamiennej zanurzonej w wodzie.

Następnie zostały przełożone do 4 słoików o pojemności 400 cm³ wypełnionych pożywką pełną Hoaglanda (Arnon i Hoagland 1940), po trzy rośliny w słoiku. Pojedyncze powtórzenie stanowiła jedna roślina, czyli 12 powtórzeń na kombinację. tym czasie, za pomocą analizatora gazu typu TPS-2 z kamerą PLC-4 (PP System, USA), pracującego w układzie otwartym, wykonano pomiar parametrów wymiany gazowej, tj. intensywność asymilacji CO₂ netto (P_n) – μmolCO₂·m⁻²·s⁻¹, intensywność transpiracji H₂O (E) - mmol H₂O·m⁻²·s⁻¹, przewodnictwo szparkowe H₂O (g_s) – mmol H₂O·m⁻²·s⁻¹, oraz podszparkowe stężenie CO₂ (c_i) - μmol CO₂·mol⁻¹ powietrza.

Dodatkowo obliczone fotosyntetyczny współczynnik wykorzystania wody (WUE) jako iloraz intensywności fotosyntezy do transpiracji (P_n/E) oraz chwilowy fotosyntetyczny współczynnik wykorzystania wody (WUEI) jako iloraz intensywności fotosyntezy do przewodnictwa szparkowego (P_n/g_s).

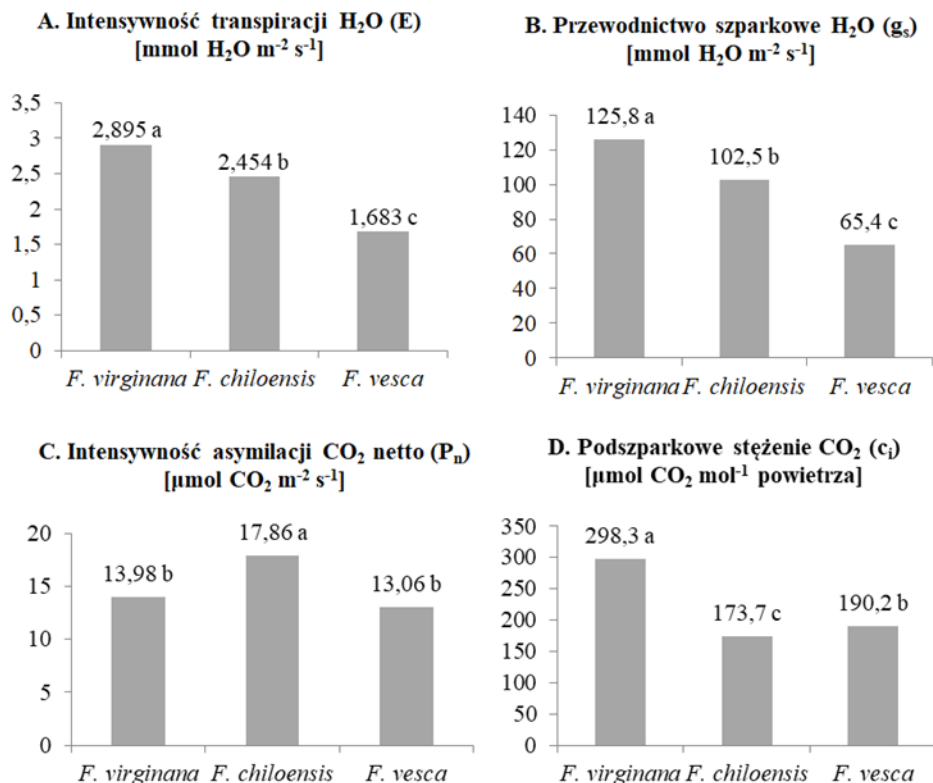
Uzyskane wyniki przeanalizowano statystycznie metodą jednoczynnikowej analizy wariancji, w systemie kompletnej randomizacji, w 10 powtórzeniach na losowo wybranych liściach. Istotność różnic między średnimi określano za pomocą testu t-Studenta na poziomie istotności α = 0,05.

3. Wyniki i dyskusja

Natężenie procesów asymilacji i transpiracji w roślinach jest uwarunkowane genetycznie oraz modyfikowane poprzez warunki siedliskowe (Starck 1999). W doświadczeniu własnym intensywność transpiracji badanych gatunków wahała się od 2,895 mmol H₂O m⁻²s⁻¹ u *F. virginiana* do 1,683 mmol H₂O m⁻²s⁻¹ u *F. vesca* (ryc. 1A). W badaniach Klamkowskiego i in. (2013) odmiany truskawki Elkat, Elsanta i Grandarosa w optymalnych warunkach wzrostu charakteryzowały się intensywnością transpiracji na poziomie od 2,36 ('Elsanta') do 2,90 mmol H₂O m⁻²s⁻¹ ('Elkat'). W badaniu z 2015 roku Klamkowski i in. (2015) rośliny wykazywały wyższe parametry intensywności transpiracji, tj. 'Elsanta' ponad 3,0 H₂O m⁻²s⁻¹, 'Grandarosa' i 'Honeoye' ponad 4,0 H₂O m⁻²s⁻¹. Wyniki te świadczą o tym, że *F. vesca* charakteryzuje się nannizszą wartością intensywności transpiracji. Natomiast według literatury wartość intensywności transpiracji, którą charakteryzuje się *F. virginiana* jest zbliżona do wartości osiągniętych przez truskawki.

Przewodność szparkowa dla wody w dużym stopniu determinuje utratę wody poprzez transpirację liści, a także wpływa na natężenie fotosyntezy, a tym samym na produktywność roślin. Z tego też powodu niezbędne jest porównywanie różnych genotypów pod kątem g_s celem poprawy produktywności lub WUE (Grant i in. 2012). Stosunek fotosyntezy do transpiracji lub stosunek wydanej plonu do zużycia plony uważa się za wielkość, która integruje zmiany natężenia parametrów wymiany gazowej (Blum 2005). Parametr ten wyraża efektywność wykorzystania wody przez rośliny (WUE – ang. *water use efficiency*). Innymi słowy, opisuje on zależność pomiędzy asymilacją szparkową a przewodnością szparkową dla wody (Klamkowski i Treder 2008). Inni badacze określają ten parametr jako stosunek akumulacji suchej masy do zużycia wody w czasie (Shao 2008). Warto tutaj zaznaczyć, że wysokie wartości WUE świadczą o wysokiej zdolności badanych roślin do utrzymywania wysokiej aktywności fotosyntetycznej w warunkach stresu (Bota i in. 2001). Chaves i in. (2003) uważają, że większość gatunków roślin zwiększa WUE w warunkach łagodnego oraz umiarkowanego stresu. Zwiększenie tego parametru wynika ze związku pomiędzy asymilacją węgla a przewodnością szparkową – ograniczenie strat wody jest wcześniejsze i intensywniejsze niż zahamowanie fotosyntezy (Klamkowski i Treder 2008).

Lar'kina (1973) stwierdził, że zagęszczenie aparatów szparkowych, które bezpośrednio wpływa na wysokość przewodności szparkowej, może się znacznie różnić wśród populacji „dzięk truskawki” (prawdopodobnie *F. vesca*) rosnących w różnych siedliskach. Kilka badań wykazało również, że zagęszczenie aparatów szparkowych wzrasta wraz z intensywnością światła na konkretnym siedlisku (Chabot i Chabot 1977). Przewodnictwo szparkowe dla wody u badanych gatunków wahało się od 65,4 mmol H₂O m⁻²s⁻¹ w *F. vesca* do 125,8 mmol H₂O m⁻²s⁻¹ u *F. virginiana* (ryc. 1B). W badaniu Cameron i Hartley (1990) przewodność szparkowa dla wody u 25 klonów *F. chiloensis* oraz u odmiany Totem wahało się od 121 do 207 mmol H₂O m⁻²s⁻¹, co wskazuje, że uzyskane wyniki w doświadczeniu własnym są niskie.



Rys. 212. Porównanie parametrów wymiany gazowej: A. Intensywność transpiracji H₂O, B. Przewodnictwo szparkowe H₂O, C. Intensywność asymilacji CO₂ netto oraz D. Podszparkowe stężenie CO₂, dla badanych gatunków roślin.

Uważa się, że jednym z najistotniejszych czynników warunkujących wysoką produktywność roślin jest współczynnik WUE (Turner 1997). Najwyższą wartością fotosyntetycznego współczynnika wykorzystania wody (WUE) w doświadczeniu własnym charakteryzowały się gatunki: *F. chiloensis* oraz *F. vesca* (tab. 1). Wysoka wartość WUE może być powiązana ze zmniejszoną przewodnością szparkową (g_s), a zatem zmniejszoną żywotnością i wydajnością. Odmiany odpowiednie dla danego środowiska mogą charakteryzować się zarówno wysoką wartością WUE jak i g_s (Grant i in. 2012). Powyższe wyniki wskazują na fakt, iż *F. chiloensis* oraz *F. vesca* znacząco lepiej wykorzystywały wodę niż *F. virginiana*.

Tab. 1. Wartości fotosyntetycznego współczynnika wykorzystania wody (WUE) oraz chwilowego fotosyntetycznego współczynnika wykorzystania wody (WUEI) dla badanych gatunków roślin.

Gatunek	WUE	WUEI
<i>F. virginiana</i>	4,829 b	0,111 b
<i>F. chiloensis</i>	7,278 a	0,174 a
<i>F. vesca</i>	7,760 a	0,200 a

W badaniu własnym intensywność asymilacji dwutlenku węgla wahała się od 13,06 μmol H₂O m⁻²s⁻¹ u *F. vesca* do 17,86 μmol H₂O m⁻²s⁻¹ u *F. chiloensis* (ryc. 1C). W porównaniu do wartości charakteryzujących truskawki odmian Elsanta, Elkat oraz Grandarosa w badaniu Klamkowskiego i in. (2013) wahających się od 6,77 do 9,49 μmol H₂O m⁻²s⁻¹ i malejące podczas stresu deficytu wody, wartości uzyskane w doświadczeniu własnym są wysokie. Świadczy to o dużej produktywności

badanych roślin. Ponadto u *F. virginiana* stwierdzono istotną statystycznie ujemną korelację między asymilacją CO₂ netto a stężeniem podszparkowego CO₂ (tab. 2).

Tab. 2. Wartości współczynników korelacji prostoliniowej między badanymi parametrami wymiany gazowej.

Gatunek	Parametry		Współczynnik korelacji (r)
<i>F. virginiana</i>	P _n	c _i	-0,791 **
	P _n	g _s	-0,423
<i>F. chiloensis</i>	P _n	c _i	-0,293
	P _n	g _s	0,901 **
<i>F. vesca</i>	P _n	c _i	-0,372
	P _n	g _s	0,560

*istotny na poziomie $\alpha=0,05$; **istotny na poziomie $\alpha=0,01$; P_n – intensywność asymilacji CO₂ netto; c_i – podszparkowe stężenie CO₂; g_s – przewodnictwo szparkowe H₂O

Jest to wynikiem intensywniejszego zużywania międzykomórkowego CO₂ w procesie asymilacji. Warto zaznaczyć, iż według Tuzet i in. (2003) przewodnictwo szparkowe dla wody jest ujemnie skorelowane ze stężeniem CO₂, jednak pozostaje w bezpośredniej zależności z CO₂ międzykomórkowym, a nie atmosferycznym. Mniejsze stężenie dwutlenku

węgla w komórkach szparkowych u roślin charakteryzujących się swyższą asymilacją CO₂ jest prawdopodobnie wynikiem intensywnie zachodzącej fotosyntezy, podczas której stężenie CO₂ wewnątrz liścia jest mniejsze niż w otaczającej atmosferze (Jaroszewska i in. 2009).

4. Wnioski

Na podstawie przeprowadzonych badań można stwierdzić, że:

1. Najkorzystniejszymi parametrami wymiany gazowej decydującymi o produktywności roślin, tj. transpiracją, przewodnictwem szparkowym dla wody i podszparkowym stężeniem CO₂ charakteryzował się gatunek *F. virginiana*. Najmniej korzystnymi wartościami wymienionych parametrów charakteryzował się gatunek *F. vesca*.
2. Najwyższym fotosyntetycznym współczynnikiem wykorzystania wody (WUE; P_n/E) oraz chwilowym fotosyntetycznym współczynnikiem wykorzystania wody (WUEI; P_n/g_s) charakteryzowały się gatunki *F. chiloensis* i *F. vesca*.

5. Literatura

- Arnon DI, Hoagland DR (1940) Crop production in artificial culture solutions and in soils with special reference to factors influencing yields and absorption of inorganic nutrients. *Soil Science* 50: 463-485.
- Biswas MK, Dutt M, Roy UK, Islam R, Hossain M (2009) Development and evaluation of in vitro somaclonal variation in strawberry for improved horticultural traits. *Scientia Horticulturae* 122: 409-41.
- Blum A (2005) Drought resistance, water-use efficiency, and yield potential—are they compatible, dissonant, or mutually exclusive? *Aust. J. Agric. Res.* 56(11): 1159-1168.
- Bota J, Flexas J, Medrano H (2001) Genetic variability of photosynthesis and water use in Balearic grapevine cultivars. *Ann. Appl. Biol.* 138: 353-361.
- Cameron JS, Hartley CA (1990) Gas exchange characteristics of *Fragaria chiloensis* genotypes. *HortScience* 25(3): 327-329.
- Chabot BF, Chabot JF (1977) Effects of light and temperature on leaf anatomy and photosynthesis in *Fragaria vesca*. *Oecologia (Berl.)* 26: 363-377.
- Chaves MM, Maroco JP, Pereira JS (2003) Understanding plant responses to drought – from genes to the whole plant. *Funct. Plant Biol.* 30: 239 -264.
- Debnath SC (2009) Characteristics of strawberry plants propagated by in vitro bioreactor culture and ex vitro propagation method. *Eng. Life Sci.* 9(3): 239 – 245.

- El Mansouri I, Mercado A, Valpuesta V, Lopez-Aranda JM, Pliego-Alfaro F, Quesada MA (1996) Shoot regeneration and Acrobacterium – mediated transformation of *Fragaria vesca* L. *Plant Cell Reports* (1996) 15:642-646.
- Grant AM, Davies MJ, James CM, Johnson AW, Leinonen I, Simpson DW (2012) Thermal imaging and carbon isotope composition indicate variation amongst strawberry (*Fragaria × ananassa*) cultivars in stomatal conductance and water use efficiency. *Environmental and Experimental Botany* 76: 7-15.
- Jaroszewska A, Podsiadło C, Rumaszk-Rudnicka E (2009) Wpływ nawadniania podkorowego oraz nawożenia mineralnego na aktywność fotosyntetyczną trzech gatunków drzew pestkowych. *Infrastruktura i ekologia terenów wiejskich* 3: 201-211.
- Klamkowski K, Treder W (2008) Response to drought stress of three strawberry cultivars grown under greenhouse conditions. *J. Fruit Ornament. Plant Res.* 16: 179-188.
- Klamkowski K, Treder W, Sowik I, Tryngiel-Gać A, Masny A (2013). Porównanie reakcji trzech odmian truskawki uprawianych w szklarni na deficyt wody. *Infrastruktura i Ekologia Terenów Wiejski* 21: 137-146.
- Klamkowski K, Treder W, Wójcik K (2015) Effects of long-term water stress on leaf gas exchange, growth and yield of three strawberry cultivars. *Acta Sci. Pol. Hortorum Cultus* 14(6): 55-65.
- Lar'kina TP (1973) Effect of ecological conditions on structure of wild strawberry leaf. *Ekologiya* 4: 99-102.
- Oosumi T, Gruszewski HA, Blischak LA, Baxter AJ, Wadl PA, Shuman JL, Veilleux RE, Shulaev V (2006) High-efficiency transformation of the diploid strawberry (*Fragaria vesca*) for functional genomics. *Planta* 223: 1219–1230.
- Rokosa M, Mikiciuk M (2017) In vitro regeneration of *Fragaria* plants. *Acta Sci. Pol. Hortorum Cultus*, 16(5), 145–158.
- Shao H-B, Bu L-Y, Jaleel CA, Zhao C-X (2008) Water-deficit stress-induced anatomical changes in higher plants. *C. R. Biol.* 331(3): 215-225.
- Sowik I, Markiewicz M, Michalczyk L (2015) Stability of *Verticillium dahliae* resistance in tissue culture – derived strawberry somaclones. *Hort. Sci. (Prague)* 42(3): 141–148.
- Starck Z (1999) Niektóre aspekty zróżnicowania reakcji roślin na niekorzystne warunki środowiska - stare problemy, nowa interpretacja. *Zesz. Probl. Post. Nauk Roln.* 469: 145-159.
- Tuner NC (1997) Further progress in crop water relations. *Adv. Agron.* 58: 293-338.
- Yildirim AB, Turker AU (2014) Effects of regeneration enhancers on micropropagation of *Fragaria vesca* L. and phenolic content comparison of field-grown and in vitro-grown plant materials by liquid chromatography-electrospray tandem massspectrometry (LC–ESI-MS/MS). *Scientia Horticulturae*. 169: 169–178.

13. Wpływ wybranych regulatorów wzrostu na wzrost tkanki kalusowej stewii (*Stevia rebaudiana* Bert.) w kulturach *in vitro*

The effect of selected growth regulators on the growth of stevia callus tissue (*Stevia rebaudiana* Bert.) in *in vitro* cultures

Rokosa Marta

Katedra Fizjologii Roślin i Biochemii, Wydział Kształtowania Środowiska i Rolnictwa,
Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie
Opiekun naukowy: Mikiciuk Małgorzata

Rokosa Marta: marta.rokosa@zut.edu.pl

Słowa kluczowe: kalus, tkanka przyranna, auksyny, cytokininy, mikrorozmnażanie

Streszczenie

Stevia rebaudiana Bertoni jest krzewem należącym do rodziny *Asteraceae*. Naturalnie występujący w jej liściach stewiozyd, będący około 300 razy słodszy niż sacharoza, powoduje, iż jest ona zdrowszym substytutem popularnie używanego cukru. Niestety ze względu na niewielki odsetek kiełkowania nasion i problem z wytworzeniem jednorodnych populacji pod względem składu chemicznego liści, rozmnażanie stewii, a zatem i pozyskiwanie stewiozydu, metodami konwencjonalnymi jest niezwykle utrudnione. Jedną z częściej stosowanych metod pozyskiwania metabolitów roślin (np. stewiozydu u stewii) są kultury tkanki kalusowej. Stąd też celem niniejszego badania było określenie wpływu kombinacji cytokininy i auksyny na wzrost tkanki kalusowej stewii w kulturach *in vitro*. Eksplantaty liściowe wykładano na pożywkę o składzie mineralnym wg Murashige i Skoog (1962) z dodatkiem 6-benzylaminopuryny (BAP) w stężeniach 0,0, 1,0, 2,0, 3,0 i 4,0 mg dm⁻³ w kombinacjach z kwasem naftylo-1-octowym (NAA) w stężeniach 0,0, 2,0 i 5,0 mg dm⁻³. Badanie wykazało, iż dodatek BAP i NAA do pożywki MS powodował wzrost tkanki kalusowej stewii (*Stevia rebaudiana* Bert.) w kulturach *in vitro*.

1. Wstęp

Stevia rebaudiana Bertoni to wieloletni krzew z rodziny *Asteraceae* pochodzący z Ameryki Południowej (Paragwaj i Brazylia). Jest często określany jako „słodkie zioło Paragwaju” (Gauns 2003).

Naturalne substancje słodzące, które mogą zastąpić sacharozę, przyciągnęły wielką uwagę ze względu na rosnącą częstość występowania otyłości i cukrzycy. Stewiozyd, główny słodki składnik liści *Stevia rebaudiana* Bertoni jest około 300 razy słodszy niż sacharoza (0,4% roztwór). Dodatkowo słodkiego smaku liściom daje zawartość takich składników jak: stewiol, stewiolbiozyd, rebaudiozyd A, B, C, D, E oraz F a także dulkozyd A. Ich zawartość waha się między 4 a 20% suchej masy liści w zależności od odmiany i warunków uprawy (Kennelly 2002, Starrat i in. 2002).

Roślina stewii, jej ekstrakty, jak i sam stewiozyd są stosowane od kilku lat jako słodzik w Ameryce Południowej, Azji, Japonii, Chinach i w różnych krajach UE (Gauns 2002). W Brazylii, Korei i Japonii liście stewii, stewiozyd i wysoko rafinowane ekstrakty są oficjalnie stosowane jako słodzik niskokaloryczny (Mizutani i Tanaka 2002). W USA sproszkowane liście stewii i rafinowane ekstrakty z liści są stosowane jako suplement diety od 1995 r. Zalety stewiozydu jako suplementu diety dla ludzi są różnorodne: jest stabilny, niekaloryczny, nie powoduje próchnicy zębów, jest polecany diabetykom i osobom cierpiącym na fenyloketonurię (Gauns 2003).

Niestety rozmnażanie stewii metodami konwencjonalnymi jest niezwykle utrudnione. Nasiona stewii wykazują bardzo niski procent kiełkowania (ok. 10%), przez co jest to nieefektywny sposób propagacji (Rokosa i Mikiciuk 2017). Rozmnażanie przez nasiona nie pozwala na wytwarzanie jednorodnych populacji, co skutkuje dużą zmiennością ważnych cech, takich jak skład chemiczny i poziom słodkości. Wegetatywne rozmnażanie jest ograniczone przez mniejszą liczbę

osobników, które można uzyskać równocześnie z pojedynczej rośliny (Sivaram i Mukundan 2003, Rokosa i Mikiciuk 2017). Stąd konieczność badań nad rozmnażaniem stewii w kulturach *in vitro*.

Techniki hodowli komórek i tkanek roślinnych *in vitro* są podstawą rozmnażania roślin w wielu programach badawczych. Hodowle takie obejmują zarówno organogenezę jak i embriogenezę, a wyniki badań zależą w ogromnym stopniu od warunków w jakich znajduje się tkanka (Us-Camas i in. 2014). Jedną z częściej stosowanych metod pozyskiwania metabolitów roślin (np. stewiozydu u stewii) są kultury tkanki kalusowej. Bardzo często są one wykorzystywane do założenia kultur zawieszinowych, czyli pożywek płynnych zawierających pojedyncze komórki lub agregaty komórkowe (Skucińska 2005).

Kalusy powstające w kulturach *in vitro* różnią się między sobą rodzajem i liczbą komórek wchodzących w jego skład, strukturą, barwą, konsystencją, stabilnością genetyczną a także zdolnościami rozwojowymi. Dla przykładu, kalus embriogenny różni się od kalusa organogennego rodzajem komórek, konsystencją i barwą (Stefaniak 2004).

Co więcej, kalus może mieć strukturę luźną lub zbitą, jednolitą lub grudkowatą (Stefaniak 2004). Jest to zależne od siły adhezji międzykomórkowej oraz obecności, liczby, wielkości a także rozmieszczenia przestworów międzykomórkowych. Ów przyleganie podlega ściślejszej kontroli genetycznej a także jest regulowane przez syntezę określonych polisacharydów i proteoglikanów wchodzących w skład ściany komórkowej roślin (Bach i Pawłowska 2009).

Skład i zawartość glikozydów stewiolowych (SG) (głównych metabolitów wtórnych pozyskiwanych w warunkach *in vitro* ze stewii) w kulturach *in vitro* badali Bondarev i in. (2001). Przeprowadzono analizę porównawczą wytwarzania tych związków w nienaruszonych roślinach, roślinach utrzymywanych w warunkach *in vitro*, odróżnicowanych tkankach kalusowych i hodowlach zawieszinowych, kalusie morfogennym i regenerowanych pędach w warunkach *in vitro*. Stwierdzono, że skład jakościowy SG w roślinach z kultur *in vitro* jest identyczny z nietkniętymi roślinami, ale ich zawartość w roślinach utrzymywanych w warunkach *in vitro* wydaje się być około pięć lub sześć razy niższa. Nie zaobserwowano znaczącego spadku tej wartości po długotrwałej hodowli (przez około 5 lat). Wykazano również, że niezróżnicowane hodowle komórkowe, takie jak kalus i kultury zawieszinowe, syntetyzują tylko niewielkie ilości SG, a ich zawartość zmieniała się znacznie podczas wzrostu kultury. Jakościowy skład SG w hodowlach komórkowych wydawał się być bardzo niewielki w porównaniu z roślinami hodowanymi konwencjonalnie. Nie znaleziono korelacji między zawartością SG w organach roślin matecznych a hodowlami komórkowymi. Czynniki określające warunki hodowli roślin i wpływające na akumulację zarówno świeżej, jak i suchej biomasy komórkowej nie były w stanie całkowicie indukować syntezy SG w niezróżnicowanych hodowlach komórkowych. Proces ten został przywrócony dopiero po pojawieniu się struktur morfogennych i tworzeniu pędów (Bondarev i in. 2001).

W procesie pozyskiwania metabolitów z roślin, po wybraniu najbardziej obiecujących pojedynczych roślin inicjuje się kultury kalusa. Ta praca polega głównie na określeniu medium, które będzie najlepiej dostosowane do hodowli. Optymalizacja pożywki polega na ustaleniu składu mineralnego i składników organicznych, ze szczególnym uwzględnieniem równowagi hormonalnej, która reguluje mechanizmy różnicowania komórek.

Aby zoptymalizować procedurę rozmnażania danego gatunku w kulturach *in vitro* potrzeba wielu eksperymentów, pozwalających na precyzyjne ustalenie wszystkich parametrów środowiskowych hodowli, ze szczególnym uwzględnieniem zawartości w pożywce roślinnych regulatorów wzrostu. Stąd też celem niniejszego badania było określenie wpływu kombinacji cytokininy (BAP) i auksyny (NAA) na wzrost tkanki kalusowej stewii w kulturach *in vitro*.

Należy jednak zwrócić uwagę na fakt, iż wytworzone w ten sposób komórki i tkanki kalusa mogą ulegać zmianom somaklonalnym zwykle podczas kilku pasażów (Larkin i Scowcroft, 1981). Jest to okres krytyczny, w którym ze względu na tę zmienność produkcja metabolitów wtórnych w kulturach *in vitro* jest zmienna w zależności od cyklu subkultury. Po pewnym czasie (od kilku tygodni do kilku lat) rośliny osiągają stabilność genetyczną. Wówczas każdy rodzaj tkanki kalusowej może być uważany za jednorodny agregat komórkowy, tak jak gdyby pochodził z klonowania pojedynczej komórki. Przeprowadzono więcej niejedno badanie opisujące nieregularną produkcję

metabolitów wtórnych z odróżnicowanymi hodowlami komórkowymi z niestabilizowanymi liniami komórkowymi (Bourgand i in. 2001).

2. Materiał i metody

Na etapie inicjacji nasiona stewii (*Vilmorin Clause & Cie*) zostały zdezynfekowane poprzez moczenie w wodzie z dodatkiem detergentu - Ludwik przez 20 minut. Następnie przepłukano je kilkakrotnie pod bieżącą wodą i zanurzono na 30 sekund w 70% roztworze etanolu. Następnie zdezynfekowane nasiona wytrząsano w 10% roztworze podchlorynu sodu przez 15 minut i umieszczono pojedynczo w 15 ml probówkach testowych zawierających 3 ml pożywki MS (Murashige i Skoog 1962).

Na wszystkich etapach badania pH pożywek ustalano na 5,7 przy użyciu 0,1 M roztworów kwasu solnego (HCl) oraz wodorotlenku sodu (NaOH). Pożywki uzupełniono agarem $8 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ (pożywki żelowano), $30 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ sacharozy i $100 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ inozytoli. Hodowle prowadzono w 300 ml słoikach, zawierających 30 ml pożywki, które sterylizowano w $121 \text{ }^\circ\text{C}$ przez 20 minut. Do każdego słoika wprowadzono 6 eksplantatów. Ustalono hodowle umieszczono w fitotronie, na półkach oświetlonych światłem białym przez 16 godzin, przy intensywności PAR $40 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, temperaturze $25 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$. Pasaże wykonywano co 6 tygodni. Tak otrzymane sterylne pędy, namnażane kilka razy na pożywce MS, stanowiły populację do ustalenia eksperymentu.

W etapie doświadczalnym fragmenty liści o powierzchni ok. 1 cm^2 , nakłute kilkakrotnie skalpelem, umieszczano na pożywce MS z dodatkiem BAP i NAA w stężeniach zgodnie z tabelą 1.

Tab. 1. Zawartość BAP i NAA w pożywce MS w poszczególnych wariantach doświadczenia

L.p.	Zawartość BAP [$\text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$]	Zawartość NAA [$\text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$]
1.	0,0	0,0
2.	1,0	5,0
3.	2,0	5,0
4.	3,0	5,0
5.	4,0	5,0
6.	1,0	2,0
7.	2,0	2,0
8.	3,0	2,0
9.	4,0	2,0

Eksplantaty wykładano w ilości 5 szt. do uprzednio zautoklawowanych słoików o pojemności 300 cm^3 wypełnionych w 30 cm^3 żelowaną pożywką i wstawiono do fitotronu gdzie wzrastały w optymalnych warunkach (białe światło o natężeniu $40 \text{ }\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, temperatura $25\pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$, fotoperiod 16h światła i 8h ciemności).

Po 7 tygodniach trwania doświadczenia określono masę wykształconej tkanki kalusowej [g]. W doświadczeniu próbę kontrolną stanowiły eksplantaty wyłożone na pożywkę MS, niewzbogaconą roślinnymi regulatorami wzrostu. Pojedyncze powtórzenie stanowiła jedna roślina. Na jedną kombinację przypadało 35 powtórzeń. Wyniki pomiarów przeanalizowano statystycznie przy wykorzystaniu analizy wariancji i oceniono istotność różnic na poziomie $\alpha = 0,05$ między badanymi pożywkami testem t-Tukey'a.

3. Wyniki i dyskusja

W sposób naturalny kalus powstaje w miejscu zranienia tkanki roślinnej (z tego też powodu nazywany jest tkanką przyraną) (Stefaniak 2004). Jest to tkanka niezróżnicowana bądź słabo zróżnicowana, złożona głównie z komórek parenchymatycznych (Bach i Pawłowska 2009). W warunkach *in vitro* może powstawać niemalże z każdej tkanki, na pożywce wzbogaconej w

auksyny lub/i cytokininy (Skucińska 2005). Niekiedy można zaobserwować zjawisko habituacji, czyli formowania się kalusa na pożywce niezawierającej fitohormonów (tkanka taka traci zdolności morfogenetyczne). Indukowana jest również zranieniem eksplantatu (Bach i Pawłowska 2009).

Aby prowadzić kultury tkanki kalusowej lub komórek zawieszonych do dnia dzisiejszego zaprojektowano wiele różnych wariantów pożywek odżywczych, odpowiednich dla gatunków. Agar lub jego substytuty dodaje się do pożywki, aby przygotować podłoże stałe. Opracowano wiele podłoży i je modyfikowano. Jednym z najczęściej stosowanych podłoży do hodowli tkanek roślinnych jest medium opracowane przez Murashige i Skoog (MS). Istotną cechą medium MS jest bardzo wysokie stężenie azotanów (NO_3^-), potasu (K^+) i amoniaku (NH_4^+). Wielu badaczy używa również podłoża B5 opracowanego przez Gamborga (Gamborg i Phillips 1995). Zawartości nieorganicznych składników odżywczych w pożywce B5 są niższe niż w pożywce MS. Donoszono o wpływie pożywki zastosowanej w różnych procesach, np. wpływ wapnia i fosforanu na hodowlę zawieszonych komórek *Coffea arabica*, wpływ fosforanów na wytwarzanie steroidów sapogeninowych w zawieszonych hodowlach *Agave amanuensis* oraz fosforanu i sacharozy na produkcja nikotyny przez hodowle komórkowe *Nicotiana tabacum* (Smetanska 2008).

Analiza wariancji w doświadczeniu własnym wykazała, iż stężenie BAP i NAA dodawanych do podstawowej pożywki MS miało istotny wpływ na kształtowanie się masy tkanki kalusowej stewii.

Masa kalusa wytworzonego przez badane rośliny kształtowała się na poziomie od 0,00 g do 0,70 g (tab. 2). Badanie wykazało jedynie dwa poziomy skuteczności. Najwyższe wartości obserwuje się w przypadku dodatku wszystkich kombinacji dodawanych regulatorów wzrostu, gdzie masa kalusa mieści się w zakresie od 0,17 g do 0,70 g.

Tab. 2. Średnie wartości masy tkanki kalusowej u roślin namnażanych na pożywkach o zróżnicowanej zawartości BAP i NAA

Zawartość fitohormonów [mg dm ⁻³]	Masa tkanki kalusowej [g]
MS	0,00 b*
1 BAP + 5 NAA	0,25 ab
2 BAP + 5 NAA	0,70 a
3 BAP + 5 NAA	0,39 ab
4 BAP + 5 NAA	0,35 ab
1 BAP + 2 NAA	0,19 ab
2 BAP + 2 NAA	0,17 ab
3 BAP + 2 NAA	0,27 ab
4 BAP + 2 NAA	0,58 ab

*średnie oznaczone tymi samymi literami nie różnią się statystycznie na poziomie istotności równym 0,05

Najniższe wartości można zaobserwować w przypadku pożywki bez dodatku fitohormonów (0,00 g) oraz we wszystkich badanych wariantach stężeń regulatorów wzrostu (0,17 g – 0,58 g) z wyjątkiem pożywki z dodatkiem 2,0 mg·dm⁻³ BAP i 5,0 mg dm⁻³ NAA, gdzie masa kalusa wynosiła 0,70 g (tab.2, fot. 1). Podobne wyniki otrzymali Patel i Shah (2009) gdzie tkanka kalusowa została indukowana u stewii we wszystkich badanych kombinacjach BAP (1,0, 2,0, 3,0 mg dm⁻³) i NAA (0,2 i 2,0 mg dm⁻³).

W przypadku hodowli kalusa, auksyna jest niezbędnym suplementem, który należy dodać do podstawowego podłoża. Navarro i in. (1997) zauważyli, że auksyna jest niezbędnym czynnikiem do indukcji kalusa. Dodatek cytokininy do pożywki auksynowej ma addytywny wpływ na wzrost tkanki wykazany u wielu gatunków roślin (Patel i Shah 2009).

W badaniu własnym zaobserwowano regenerację pędów na pożywce z dodatkiem 2,0 mg dm⁻³ BAP i 5,0 mg dm⁻³ NAA (fot. 1). Podobne wyniki zaobserwowali Patel i Shah (2009) gdzie korzystnie na regenerację pędów wpływała pożywka z dodatkiem 2,0 mg dm⁻³ BAP i 0,2 mg dm⁻³ NAA. Również Janarthanam i in. (2009) potwierdzają, że połączenie auksyny i cytokininy w pożywce

(w tym przypadku było to 2,4-D i BA) korzystnie wpływa na wzrost tkanki kalusowej u stewii a połączenie NAA i BAP stymuluje regenerację pędów z kalusa. Według Das i in. (2006) inicjacja kalusa jest zależna od składu mineralnego pożywki MS – istnieją duże różnice między połową i pojedynczym MS a podwójnym MS. Dodatkowo wykazali oni, że kalus stewii najintensywniej rośnie na połowie i pojedynczym MS z dodatkiem 0,1 mg dm⁻³ NAA i 2,0 mg dm⁻³ BAP.

Inne wyniki otrzymali Gupta i in. (2010). W ich badaniu połączenie dwóch auksyn 1,0 mg dm⁻³ 2,4-D (który podobnie jak NAA jest syntetyczną auksyną) i 1,0 mg dm⁻³ NAA powodował największy wzrost kalusa. W badaniu tym również połączenie 1,0 mg dm⁻³ NAA i 1,0 mg dm⁻³ 2,4-D oraz 2,0 mg dm⁻³ NAA i 2,0 mg dm⁻³ 2,4-D nie powodowało wzrostu kalusa. Takie różnice można przypisać fizjologicznemu stanowi eksplantatów, który zależy od czynników genetycznych. Wielokrotne pasażowanie sprzyja powstawaniu mutacji (Rokosa, Mikiciuk, 2017). W tym badaniu rośliny pochodziły z kilkuletniej kultury - w badaniach Gupta i in. (2010) rośliny mogły być młodsze lub starsze.



Rys. 1. Od lewej: stewia rosnąca na pożywce bez dodatku regulatorów wzrostu, na pożywce z dodatkiem 4 mg dm⁻³ BAP i 5 mg dm⁻³ NAA oraz na pożywce z dodatkiem 2 mg dm⁻³ BAP i 5 mg dm⁻³ NAA.

4. Wnioski

Na podstawie przeprowadzonych badań można stwierdzić, że:

- A. Dodatek BAP i NAA do pożywki o składzie mineralnym wg Murashige i Skoog (1963) powodował wzrost tkanki kalusowej stewii (*Stevia rebaudiana* Bert.) w kulturach in vitro.
- B. Tkanka kalusowa stewii rośnie najintensywniej na pożywce MS z dodatkiem 2,0 mg·dm⁻³ BAP i 5,0 mg dm⁻³ NAA.

5. Skróty

2,4-D - kwas 2,4-dichlorofenoksyoctowy

BAP - 6-benzyloaminopuryna

NAA - kwas naftylo-1-octowy

MS – pożywka o składzie mineralnym wg Murashige i Skoog (1962)

6. Literatura

- Bach A, Pawłowska B (2009) Procesy rozwojowe w kulturze in vitro i typy kultury. [w:] Malepszy . (red.) Biotechnologia roślin. PWN. Warszawa, 21- 41.
- Bondarev N, Reshetnyak O, Nosov A (2001) Peculiarities of diterpenoid steviol glycoside production in vitro cultures of *Stevia rebaudiana* (Bert.). Plant Sci. 161: 155-163.
- Bourgaud F, Grivot A, Milesi S, Gontier E (2001) Production of plant metabolites: a historical perspective. Plant Sci. 161: 839-851.
- Gamborg OL, Philips GC (1995) Plant cell tissue Org Cult. Springer, Berlin, Heidelberg: 21-33.
- Geuns JMC (2003) Stevioside. Phytochemistry 64, 913-921.

- Gupta P, Sharma S, Saxena S (2010) Callusing in *Stevia rebaudiana* (natural sweetener) for steviol glycoside production. *International Scholarly and Scientific Research & Innovation* 4(12), 893-897.
- Janarthanam B, Gopalakrishnan M, Lakshmi Sai G, Sekar T (2009) Plant regeneration from leaf derived callus of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Plant Tissue Cult. & Biotech.* 19(2), 133-141.
- Kennelly EJ (2002) Sweet and non-sweet constituents of *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni. [w:] Kinghorn AD (red.), *Stevia, the Genus Stevia. Medicinal and Aromatic Plants—Industrial Profiles*, Taylor and Francis, London and NY, 68–85.
- Larkin PJ, Scowcroft WR (1981) Somaclonal variation — A novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theoretical and Applied Genetics.* 60: 197–214.
- Mizutani K, Tanaka O (2002) Use of *Stevia rebaudiana* sweeteners in Japan. [w:] Kinghorn, AD (red.), *Stevia, the Genus Stevia. Medicinal and Aromatic Plants—Industrial Profiles*, Taylor and Francis, London and NY, 178–195.
- Murashige T, Skoog F (1963) A revised medium for rapid growth and bioassays with Tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum.* 15, 473- 497.
- Navarro C, Rosa Ma E, May A (1997) In vitro plant regeneration from embryogenic cultures of a diploid and triploid Cavendish banana. *Plant Cell Tissue Org Cult.* 51,17-25.
- Patel RM, Shah RR (2009) Regeneration of stevia plant through callus culture. *Indian J. Pharm. Sci.*, 7 (1), 46-50.
- Rokosa M, Mikiciuk M (2017) In vitro regeneration of *Fragraria* plants. *Acta Sci. Pol. Hortorum Cultus*, 16(5), 145–158.
- Sivaram L, Mukundan U (2003) In vitro culture studies on *Stevia rebaudiana*. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant.* 39, 520–523.
- Skucińska B (2005) Metoda kultury in vitro. *Kultury komórek i tkanek.* [w:] Malepszy S (red.). *Biotechnologia roślin.* PWN. Warszawa, 26- 28.
- Smetanska I (2008) Production of secondary metabolites using plant cell cultures. *Adv Biochem Enbgin/Biotechnol.* 111: 187-228.
- Starrat AN, Kirby CW, Pocs R, Brandle JE (2002) Rebaudioside F, a diterpene glycoside from *Stevia rebaudiana*. *Phytochemistry* 59, 367–370.
- Stefaniak B (2004) *Roślinne kultury in vitro.* [w:] Woźny A (red.), Przybył K (red.) (2004) *Komórki roślinne w warunkach stresu. Tom II. Komórki in vitro.* Wydawnictwo Naukowe UAM. Poznań, 13 – 91.
- Us-Camas R, Rivera-Sol'is G, Duarte-Ake' F, De-la-Pen'a C (2014) In vitro culture: an epigenetic challenge for plants. *Plant Cell Tiss Organ Cult.* 118,187–201.

14. Przedstawienie i porównanie metod ochrony sadów czereśniowych w uprawach ekologicznych i w systemie integrowanej ochrony roślin

Presentation and comparison of the cherry orchard protection methods in organic farming and integrated pest managed system (IPM)

Wojciech Sokołowski

Katedra Ochrony Roślin, Wydział Ogrodnictwa i Architektury Krajobrazu, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Opiekun naukowy: Marek Kopacki

Marek Kopacki: marekkopacki01@gmail.com

Słowa kluczowe: czereśnie, sadownictwo ekologiczne, integrowana ochrona roślin, choroby roślin, szkodniki

Streszczenie

Ważne miejsce w strukturze polskich sadów zajmują uprawy czereśni. Wymagania dotyczące produkcji owoców, konieczność ochrony środowiska przyrodniczego oraz prawodawstwo polskie i unijne wymagają od sadowników racjonalizacji metod ochrony roślin. Systemy uprawy ekologicznej oraz ochrony integrowanej cechują się ograniczaniem stosowania środków ochrony chemicznej. Porównanie sposobów ochrony w obydwu systemach wykazuje różnice i podobieństwa pomiędzy zabiegami i wykorzystywanymi środkami zawartymi w metodykach ochrony oraz wykazach środków dopuszczonych do użycia w sadach czereśniowych (stan na 8 IV 2019).

1. Wstęp

Czereśnia (*Prunus avium* L.) to jeden z głównych gatunków sadowniczych w strukturze polskich sadów. Zbiory owoców czereśni w Polsce systematycznie rosną, w 2018 roku wyniosły ponad 60 tys. ton, zaś powierzchnia upraw w zasadzie utrzymuje się na stałym poziomie – w 2017 roku sięgała 9,6 tys. ha (GUS). Jednym z obowiązków plantatorów we wszystkich państwach członkowskich Unii Europejskiej jest produkcja owoców niezawierających pozostałości środków ochrony roślin lub o zawartości pozostałości poniżej najwyższych dopuszczalnych poziomów (Nowacka i in. 2015). Wymusza to racjonalne stosowanie chemicznych metod ochrony roślin oraz mobilizuje do wykorzystywania w uprawie metod niechemicznych, co wpisuje się w obowiązujący od 1 stycznia 2014 r. nakaz stosowania zasad integrowanej ochrony roślin przez użytkowników profesjonalnych, czyli m.in. sadowników. System ten zakłada taką organizację ochrony roślin, aby zapewnić wysoki poziom ochrony zdrowia ludzi i zwierząt oraz środowiska naturalnego (Pruszyński i Pruszyński 2015). Jednym z alternatywnych sposobów produkcji jest prowadzenie upraw ekologicznych, które ze swej natury zakładają dbałość o środowisko przyrodnicze, oraz produkcję płodów rolnych wolnych od pozostałości środków ochrony chemicznej (Pimentel i in. 2005).

2. Opis zagadnienia

Rozwój i intensyfikacja rolnictwa po II wojnie światowej spowodowane były m.in. coraz większym zapotrzebowaniem na żywność. Powszechna dostępność pestycydów, ich skuteczność i łatwość aplikacji spowodowały odejście od dotychczasowych metod ochrony roślin i zastąpienie ich metodą chemiczną, czyli stosowaniem pestycydów (Jaworska 2012). Uwidaczniające się w środowisku skutki ich nieracjonalnego stosowania oraz rozwój badań nad wpływem wykorzystywanych w rolnictwie środków chemicznych stały się przyczyną opracowania nowych, bardziej bezpiecznych dla środowiska i zdrowia ludzi metod uprawy oraz ochrony roślin takich jak system integrowanej ochrony oraz systemy ekologiczne (Faber 2007).

Niniejsza praca ma na celu przedstawienie najważniejszych chorób i szkodników w uprawie czereśni oraz porównanie metod ochrony w uprawach ekologicznych i systemie integrowanej ochrony.

3. Przegląd literatury

Najważniejsze choroby i szkodniki czereśni (za Błaszczyńska 2012)

3.1 Choroby wirusowe

Największe straty w sadach czereśniowych powodują wirus nekrotycznej plamistości pierścieniowej drzew pestkowych (PNRSV) oraz wirus żółtaczk wiśni (PDV). Pierwszy z nich powoduje osłabienie drzew, chlorotyczne, pierścieniowe przebarwienia na liściach, deformację kwiatostanów, wycieki żywicy (gumozę) oraz zamieranie pąków.

Wirus żółtaczk wiśni (PDV) objawia się około miesiąca po kwitnieniu, powoduje wówczas żółknięcie liści. Choroba nasila się przy chłodnej pogodzie, dochodzi wówczas do zrzucenia nawet 50% liści. Choroby te roznoszą się m.in. poprzez zapylenie chorym pyłkiem lub za pośrednictwem owadów. W lata suche choroba zazwyczaj przebiega bezobjawowo.

3.2 Choroby bakteryjne

Główną chorobą bakteryjną jest rak bakteryjny (patogen: *Pseudomonas syringae* var. *syringae*). Bakterie powodują uszkodzenia części zielnych i zdrewniałych, powodując nekrozy oraz zrakowacenia. W miejscu infekcji tkanka zapada się, powstają ciemnobrunatne plamy, infekcji często towarzyszy wyciek gumy. Czynnikiem zwiększającym ryzyko choroby są wiosenne przymrozki w czasie kwitnienia.

Z kolei guzowatość korzeni (patogen: *Agrobacterium tumefaciens*) objawia się występowaniem zrakowaceń (tumory) na korzeniach i szyjce korzeniowej. Prowadzi to do osłabienia drzew (zaburzenia w przewodzeniu wody i soli mineralnych).

3.3 Choroby grzybowe

Brunatna zgnilizna drzew pestkowych (patogen: *Monilinia laxa* lub *M. fructigena*) objawia się zamieraniem zaatakowanych kwiatów, skąd grzyb przerasta do pędów, powodując ich zamieranie powyżej miejsca zakażenia. Zarodniki konidialne, tworzące się na zamartwych pędach i kwiatach, mogą w okresie dojrzewania owoców stanowić źródło infekcji wtórnej. Porażone owoce gniją.

Objawy drobnej plamistości liści drzew pestkowych (patogen: *Blumeriella jaapii*) pojawiają się w maju w postaci brunatnoczerwonych plamek na liściach, które z czasem wykruszają się, pozostawiając w liściach dziury. Choroba może spowodować defoliację drzewa jeszcze przed zbiorem, przez co drzewo jest słabsze, nieprzygotowane do spoczynku zimowego. Pojawiające się na dolnej stronie blaszki liściowej zarodniki konidialne stanowią źródło infekcji wtórnej, co dodatkowo przyspiesza przebieg choroby.

Leukostomoza drzew pestkowych (patogen: *Leucostoma cincta* i *L. persooni*) powoduje początkowo wyciek gumy, początkowo jasnej, później brunatnej. W miejscu wycieku widać zapadnięcie tkanki w której rozrasta się grzybnia, powodując niebezpieczne nekrozy i spękania, które obejmując część pnia lub konaru, powodują zamieranie wyżej położonych gałęzi. Choroba atakuje poprzez rany, m.in. po cięciu lub gradobiciu.

Srebrzystość liści drzew owocowych (patogen: *Chondrostereum purpureum*) to pasożyt kory i drewna. Rozwijając się w drewnie powoduje jego zgniliznę i produkuje toksyny powodujące objawy wtórne na liściach – srebrnoszare zabarwienie. Infekcja dokonuje się zazwyczaj poprzez rany po cięciu i zranienia.

Wertycylioza drzew owocowych (patogen: *Verticillium dahliae* lub *V. albo-atrum*) objawia się więdnieniem drzew – początkowo niektórych gałęzi i konarów. Na liściach pojawiają się żółte przebarwienia, które z czasem brązowieją, a liście opadają. Rozwojowi choroby sprzyja wysoka temperatura. Drzewa obumierają, zaś na przekroju porażonych tkanek widoczne są czerwone lub brunatne przebarwienia (pierścienie). Ważną cechą diagnostyczną są korzenie, które ciemnieją i zasychają, pokrywając się w warunkach wysokiej wilgotności białym nalotem grzybni.

Szkodniki czereśni, które powodują istotne z punktu gospodarczego szkody to mszyca czereśniowa, nasionnice, licinek tarninaczek, kwieciak pestkowiec. Na czereśniach żerują także organizmy polifagiczne: zwójki, chrząszcze czy przedziorki oraz ptaki: szpaki, kawki czy gawrony.

Mszycza czereśniowa (*Myzus cerasi*) to szkodnik z rzędu pluskwiaków, zaś jego żerowanie polega na ogładaniu drzew poprzez wysysanie soków z drzew. Osobniki mszyc są koloru czarnego, zaś ich pierwsze kolonie zasiedlają rozetki liściowe już w okresie kwitnienia. Uszkodzone liście i pędy zwijają się spiralnie, z czasem zasychają. Mszycza czereśniowa jest mszycą dwudomną, na czereśniach rozwija się rocznie 6-7 pokoleń.

Nasionnice (*Rhagoletis regalis* i *R. cingulata*) to muchówki odpowiedzialne za robaczywienie owoców. Cechą diagnostyczną nasionnic są skrzydła z charakterystycznym czarnym, zygzakowatym wzorem. Owady zimują w glebie w stadium poczwarki, wylot następuje, gdy temperatura gleby osiągnie temperaturę 14 °C. Oblot much związanych ze składaniem jaj do wnętrza owocu trwa zazwyczaj jeden miesiąc.

Licinek tarninaczek (*Argyresthia ephippiella*) to owad z rzędu motyli. Gąsienice tego gatunku wylęgają się w kwietniu i wgryzają się do wnętrza pąków i niszczą ich wnętrze. Gąsienice atakują także młode zawiązki, doprowadzając do ich opadania. Co kilkanaście lat następuje gradacja tego gatunku.

Kwieciak pestkowiec (*Anthonomus rectirostris*) należy do rzędu chrząszczy; samice uszkadzają młode zawiązki składając do nich jaja; ich szkodliwość polega na uszkadzaniu pestki owocu przez larwy. Dorosłe chrząszcze opuszczają owoc rozrywając jego miąższ, uszkodzone owoce gniją.

Porównanie metod ochrony w systemie upraw ekologicznych i ochrony integrowanej

Ekologiczna produkcja roślin ze swej natury zakłada przede wszystkim uprawę bez stosowania pestycydów oraz nawozów sztucznych. Ochrona roślin w gospodarstwach ekologicznych opiera się na wykorzystywaniu metod niechemicznych, takich jak metody mechaniczne, biologiczne, agrotechniczne, fizyczne i biotechniczne. Do najważniejszych z nich należą sadzenie odmian roślin odpornych na choroby i szkodniki, zabiegi agrotechniczne prowadzące do zwiększenia odporności roślin, usuwanie roślin porażonych lub ich części oraz stosowanie środków ochrony roślin dopuszczonych do użytku w uprawach ekologicznych (Barker 2010). Metody mechaniczne opierają się na regularnej lustracji i mechanicznym (ręcznym) usuwaniu organizmów szkodliwych lub porażonych części roślin. Metody biologiczne charakteryzują się wykorzystaniem naturalnych zależności pomiędzy poszczególnymi elementami środowiskażywionego, takich jak pasożytnictwo czy drapieżnictwo. W praktyce odbywa się to poprzez wprowadzanie do środowiska konkretnych organizmów-antagonistów szkodników roślin. Metody agrotechniczne wiążą się z zapewnieniem roślinom odpowiednich warunków uprawowych, co z kolei warunkuje skuteczność innych metod. Metody fizyczne to wykorzystywanie procesów takich jak solaryzacja, działanie wysokiej temperatury czy ruchów wiatru w walce z organizmami szkodliwymi; metody biotechniczne to wykorzystywanie związków pochodzenia roślinnego oraz zwabianie owadów za pomocą pułapek feromonowych (Łabanowski 2014).

Z kolei system integrowanej ochrony roślin zakłada walkę z organizmami szkodliwymi dla roślin wykorzystując wszystkie metody ich ograniczania, dając pierwszeństwo stosowania metodom niechemicznym. Stosowanie środków chemicznych powinno odbywać się na podstawie danych z monitoringu organizmów szkodliwych oraz po przekroczeniu progu szkodliwości ekonomicznej danego agrofaga (patogen lub szkodnik roślin). Wykorzystywane środki powinny cechować się możliwie największą selektywnością, zaś samo ich dawkowanie i aplikacja powinny odbywać się zgodnie z etykietą danego środka (Łabanowski 2014).

Metody chemiczne opierają się o dostępne środki ochrony roślin, dopuszczone do użytku w danej uprawie. Oznacza to brak możliwości stosowania środków ochrony roślin spoza listy dopuszczonych do stosowania w ochronie konkretnych gatunków, nawet jeśli dany środek byłby dopuszczony w innych uprawach. Wydawane rokrocznie zalecenia ochrony najważniejszych gatunków zawierają wykaz środków dopuszczonych do użytku w poszczególnych uprawach, jednak lista ta może zmieniać się wielokrotnie w ciągu roku.

Na początek 2019 roku w doborze preparatów w ochronie czereśni znajdowało się 47 środków ochrony chemicznej, przy czym niektóre z nich bazowały na tej samej substancji czynnej.

Jeden ze środków przeznaczony jest do zwalczania patogenów, szkodników i nasion chwastów, 25 preparatów to fungicydy, zaś 21 to insektycydy i akarycydy (za Program ochrony roślin sadowniczych na 2019 r.).

W Tab. 1 oraz Tab. 2 porównano ochronę roślin w systemie ekologicznym oraz ochronę integrowaną.

Tab. 1. Porównanie metod ochrony przed chorobami w uprawach ekologicznych oraz w ochronie integrowanej.

Choroba	Ochrona w uprawach ekologicznych	Ochrona integrowana
Wirozy	-zakładanie sadu ze zdrowego materiału szkółkarskiego; -usuwanie chorych drzew; -uprawa odmian mało podatnych; -ochrona przed wektorami wirusów (np. mszyce)	-zakładanie sadu ze zdrowego materiału szkółkarskiego; -usuwanie chorych drzew; -uprawa odmian mało podatnych; -ochrona przed wektorami wirusów (np. mszyce)
Rak bakteryjny	-uprawa odmian odpornych na stanowiskach bez zastoisk mrozowych; -zabezpieczanie ran po cięciu, usuwanie porażonych pędów, a nawet całych drzew; -odpowiednie nawożenie, ochrona sadu przed patogenami grzybowymi, osłabiającymi odporność drzew; -stosowanie preparatów miedziowych	-uprawa odmian odpornych na stanowiskach bez zastoisk mrozowych; -zabezpieczanie ran po cięciu, usuwanie porażonych pędów, a nawet całych drzew; -odpowiednie nawożenie, ochrona sadu przed patogenami grzybowymi, osłabiającymi odporność drzew; -opryskiwanie fungicydami
Guzowatość korzeni	-szeroko zakrojona profilaktyka przed założeniem sadu – zmianowanie, nasadzenie zdrowego materiału szkółkarskiego; -utrzymywanie w sadzie lekko kwaśnego pH oraz walka ze szkodnikami uszkodzającymi korzenie (rany – wrota infekcji)	-szeroko zakrojona profilaktyka przed założeniem sadu – zmianowanie, nasadzenie zdrowego materiału szkółkarskiego; -utrzymywanie w sadzie lekko kwaśnego pH oraz walka ze szkodnikami uszkodzającymi korzenie (rany – wrota infekcji); -odkażanie gleby preparatem Basamid
Brunatna zgnilizna drzew pestkowych	-usuwanie i niszczenie zaatakowanych pędów i porażonych owoców – źródeł zakażenia; -zwalczanie owadów uszkodzających skórę owocu – wrota infekcji; -zabiegi preparatami miedziowymi oraz zawierającymi fungicydalne szczepy bakterii; -zabiegi preparatami biologicznymi Polyversum WP oraz Serenade ASO	-usuwanie i niszczenie zaatakowanych pędów i porażonych owoców – źródeł zakażenia; -zwalczanie owadów uszkodzających skórę owocu – wrota infekcji; -zabiegi preparatami miedziowymi oraz zawierającymi fungicydalne szczepy bakterii; -zabiegi preparatami biologicznymi Polyversum WP oraz Serenade ASO oraz fungicydami
Drobna	-usuwanie opadłych liści	-usuwanie opadłych liści lub przyspieszanie ich rozkładu;

Choroba	Ochrona w uprawach ekologicznych	Ochrona integrowana
plamistość liści		-zabiegi fungicydami
Leukostomoza	-przestrzeganie optymalnego terminu cięcia; -zabezpieczanie ran po cięciu, usuwanie porażonych pędów, a nawet całych drzew; -odpowiednia agrotechnika, zapewnienie odpowiedniej wilgotności	-przestrzeganie optymalnego terminu cięcia; -zabezpieczanie ran po cięciu, usuwanie porażonych pędów, a nawet całych drzew; -odpowiednia agrotechnika, zapewnienie odpowiedniej wilgotności; -opryskiwanie fungicydami
Srebrzystość liści	-uprawa na stanowiskach bez zastoisk mrozowych; -zabezpieczanie ran po cięciu, usuwanie porażonych pędów; -zachowanie optymalnego terminu cięcia, higiena narzędzi	-uprawa na stanowiskach bez zastoisk mrozowych; -zabezpieczanie ran po cięciu, usuwanie porażonych pędów; -zachowanie optymalnego terminu cięcia, higiena narzędzi; -zabiegi fungicydami zgodnie z zaleceniami zwalczania patogenów grzybowych kory i drewna
Wertycylioza	-unikanie stanowisk po roślinach wrażliwych – truskawki, pomidory, ziemniaki, rośliny z rodziny kapustowatych; -stosowanie zdrowego materiału nasadzeniowego	-unikanie stanowisk po roślinach wrażliwych – truskawki, pomidory, ziemniaki, rośliny z rodziny kapustowatych; -stosowanie zdrowego materiału nasadzeniowego

Tab. 2. Porównanie metod ochrony przed szkodnikami i chwastami w uprawach ekologicznych oraz w ochronie integrowanej.

Szkodnik	Ochrona w uprawach ekologicznych	Ochrona integrowana
Mszycyca czereśniowa	-wycinanie i usuwanie pędów z koloniami mszyc; -introdukcja wrogów naturalnych, drapieżców, np.: biedronkowatych, bzygowatych, dziubałkowatych; pasożytów, np.: mszycarzowatych	-wycinanie i usuwanie pędów z koloniami mszyc; -introdukcja wrogów naturalnych, drapieżców, np.: biedronkowatych, bzygowatych, dziubałkowatych; pasożytów, np.: mszycarzowatych; -zabiegi insektycydami
Nasionnice	-uprawa gleby pod koronami na głębokość 10 cm (niszczenie bobówek); -odławianie na pułapki i tablice feromonowe; -introdukcja larw z rodziny <i>Ichneumonidae</i> (pasożyty larw)	uprawa gleby pod koronami na głębokość 10 cm (niszczenie bobówek); -odławianie na pułapki i tablice feromonowe; -introdukcja larw z rodziny <i>Ichneumonidae</i> (pasożyty larw); -stosowanie insektycydów

Uprawa roślin i ochrona środowiska

Szkodnik	Ochrona w uprawach ekologicznych	Ochrona integrowana
Licinek tarninaczek	-introdukcja naturalnych wrogów, pasożytów larw, ptaków	-introdukcja naturalnych wrogów, pasożytów larw, ptaków; -stosowanie insektycydów
Kwieciak pestkowiec	-introdukcja pasożytów poczwerek i imago;	-introdukcja pasożytów poczwerek i imago; -stosowanie insektycydów
Przędziorki i szpeciele	-introdukcja drapieżnych roztoczy z rodziny <i>Phytoseiidae</i>	-introdukcja drapieżnych roztoczy z rodziny <i>Phytoseiidae</i> ; -stosowanie akarycydów
Zwójkowate	Zwójki liściowe: -introdukcja naturalnych wrogów, pasożytów larw; -odławianie na pułapki i tablice feromonowe oraz na opaski z papieru falistego; zwójka koróweczka: -oczyszczanie ran i zasmarowywanie maścią ogrodniczą; -usuwanie odrostów wokół pni	Zwójki liściowe: -introdukcja naturalnych wrogów, pasożytów larw; -odławianie na pułapki i tablice feromonowe; zwójka koróweczka: -usuwanie odrostów wokół pni; -stosowanie insektycydów
Chrzążcze	-introdukcja pasożytów poczwerek i imago; rodzina żukowate: uprawa mechaniczna gleby celem zniszczenia pędraków	-introdukcja pasożytów poczwerek i imago; rodzina żukowate: uprawa mechaniczna gleby celem zniszczenia pędraków; -stosowanie insektycydów; rodzina żukowate: zwalczanie chemiczne pędraków
Ptaki	-zakładanie siatek na korony drzew; -wysadzanie roślin będących alternatywnym pokarmem dla ptaków, np. morwa górską; -metody biosoniczne – urządzenia akustyczne imitujące odgłos ptaków celem wystraszenia ptactwa; -metody piroakustyczne – dźwięki wydawane przez detonatory gazowe, raketnice itd. odstraszaają wszystkie gatunki żerujące gromadnie	-metody jak w uprawach ekologicznych oraz opryskiwanie repelentami
Chwasty	-mechaniczne zwalczanie chwastów; -stosowanie ściółek organicznych; -zwalczanie chwastów poprzez wypalanie, parę wodną lub ultradźwięki	-mechaniczne zwalczanie chwastów; -stosowanie ściółek organicznych; -stosowanie herbicydów

Z powyższych danych (tab.1 i tab.2) wynika, że podstawową różnicą pomiędzy zabiegami ochrony w obydwu systemach jest stosowanie metod chemicznych. Stosowanie pestycydów może odbywać się wyłącznie w systemie ochrony integrowanej, w gospodarstwach ekologicznych stosować można jedynie te środki ochrony roślin, które zostały prawnie dopuszczone w tych uprawach.

Zarówno w systemie ekologicznym, jak i w integrowanej ochronie pierwszeństwo mają metody niechemiczne, co sprawia, że duża część zabiegów ochronnych pokrywa się w obydwu systemach, chociaż podstawy i założenia filozoficzne tych systemów są odmienne. Rolnictwo ekologiczne bazuje przede wszystkim na rozbudowanej uprawie gleby oraz szeroko pojętej profilaktyce. Staranny dobór odmian czy siedliska, utrzymywanie gleby w wysokiej kulturze czy ochrona przed zawleczeniem chorób czy szkodników to główne sposoby ochrony. Poziom dbałości o te elementy przewyższa inne systemy rolnicze (Barker 2010). W systemie ochrony integrowanej, która nie jest tożsama z systemem integrowanej produkcji, akcent przesuwa się na zabiegi ochronne (tab. 1 i tab. 2). Można także zauważyć, że w systemie ekologicznym, który z natury nie jest nastawiony na uprawy o dużej intensywności (Tyburski i in. 2013), znajdziemy również takie zabiegi, których z praktycznego punktu widzenia nie stosuje się w innych uprawach, np. ze względu na ich nieopłacalność, co spowodowane jest brakiem innych, skuteczniejszych metod (Rozpara i in. 2004).

4. Podsumowanie i wnioski

Integrowana ochrona roślin oraz ochrona w uprawach ekologicznych mają wiele cech wspólnych (Matyjaszczyk 2011). W obydwu metodach pierwszeństwo stosowania mają metody niechemiczne, zaś najważniejszą różnicą jest wykorzystywanie w ochronie środków chemicznych.

Metody ochrony w uprawach ekologicznych, pomimo podobieństw do metod ochrony integrowanej odznaczają się mniejszą skutecznością. Nadal brakuje środków skutecznych w zwalczaniu wielu groźnych szkodników i mikroorganizmów. Wiele środków ekologicznych jest jeszcze w fazie badań; niektóre preparaty nie zostały wprowadzone do użycia w uprawach ekologicznych w Polsce, pomimo ich stosowania za granicą (Rozpara i in. 2010).

Jednym z czynników regulujących właściwe działanie środka jest optymalny termin zastosowania preparatu. Prowadzenie lustracji sadów oraz monitoringu organizmów szkodliwych jest kluczowym elementem rozpoznawania optymalnego terminu zabiegów ochronnych (Rozpara i in. 2010). Dotyczy to nie tylko upraw ekologicznych, ale – zgodnie z prawodawstwem polskim i unijnym – ochrony w systemie integrowanym. Ponadto, środki zarejestrowane w uprawach ekologicznych nie zawsze posiadają rejestrację w uprawach czeresni (np. preparaty olejowe), co dodatkowo utrudnia walkę z chorobami i chwastami.

Pomimo znacznego rozwoju i postępu w dziedzinie środków ochrony roślin oraz wycofaniu pestycydów zawierających substancje niebezpieczne, niewłaściwe użytkowanie dopuszczonych do użytku pestycydów może skutkować skażeniem środowiska, a także stanowić realne zagrożenie dla wykonujących zabiegi oraz dla konsumentów płodów rolnych (Pruszyński i in. 2008). Jak stwierdzają Gołębowska i Pajewski (2015), stosownym wydaje się prowadzenie ogólnokrajowej promocji metod produkcji roślin przyjaznych środowisku.

5. Literatura

- Błaszczczyńska B (2012) Uprawa czeresni. Hortpress, Warszawa.
- Barker A (2010) Science and Technology of Organing Farming. CRC Press, Boca Raton.
- Faber A (2007) Rozwój integrowanej produkcji w Polsce i na świecie. Integrowana produkcja roślinna. Zagadnienia wybrane. Podleśny J (red.) Dział Upowszechniania i Wydawnictw IUNG w Puławach, 2007: 7-12.
- Gołębowska B, Pajewski T (2015) Odpowiedzialność rolników za stan środowiska naturalnego. Roczniki Naukowe Stowarzyszenia Ekonomistów Rolnictwa i Agrobiznesu 17 (2): 64-68.
- Internet – <https://www.ior.poznan.pl/19,wyzkaz-srodkow-ochrony-roslin-do-produkcji-ekologicznej> – dostęp: 15.IV.2019.

- Jaworska M (2012) Ochrona środowiska i ochrona roślin. Wydawnictwo Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie, Kraków.
- Łabanowski G (red.) i in. (2014) Metodyka integrowanej ochrony roślin ozdobnych w ogrodach przydomowych. Instytut Ogrodnictwa, Skierniewice.
- Matyjaszczyk E (2011) Obligatory integrated pest management and related opportunities for organic farming. *Journal of Research and Applications in Agricultural Engineering* 56 (4): 37-40.
- Meszka B (red.), Buler Z, Broniarek-Niemiec A i in. (2013) Metodyka integrowanej ochrony czereśni dla doradców. Skierniewice.
- Nowacka A, Gnusowski B, Walorczyk S i in. (2015) Pozostałości środków ochrony roślin w płodach rolnych (rok 2013). *Progress In Plant Protection* 55 (4): 423-439.
- Program ochrony roślin sadowniczych na 2019 r. (2019) Plantpress, Kraków.
- Pimentel D, Hepperly P, Hanson J i in. (2005) Environmental, energetic, and economic comparisons of organic and conventional farming systems. *BioScience* 55 (7): 573-582.
- Pruszyński G, Pruszyński S (2015) Integrowana ochrona roślin w zwalczaniu szkodników roślin uprawnych. Centrum Doradztwa Rolniczego w Brwinowie Oddział w Poznaniu.
- Pruszyński S, Mrówczyński M, Pruszyński G (2008) Ochrona roślin w integrowanej technologii produkcji rolniczej. *Problemy Inżynierii Rolniczej* 16 nr 1: 87-98.
- Rozpara E (red.), Grzyb Z, Bryk H, Doruchowski G (2004) Uprawa drzew pestkowych metodami ekologicznymi. Materiały dla rolników. Krajowe Centrum Rolnictwa Ekologicznego - Regionalne Centrum Doradztwa Rozwoju Rolnictwa i Obszarów Wiejskich w Radomiu.
- Rozpara E, Badowska-Czubik T, Kowalska J (2010) Problems of the plum and cherry plants protection in ecological orchard. *Journal of Research and Applications in Agricultural Engineering* 55 (4): 73-75.
- Tyburski J (red.) i in. (2013) Sadownictwo ekologiczne. Pracownia Wydawnicza "ElSet" Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, Olsztyn.
- Akty prawne:
- Ustawa z dnia 8 marca 2013 r. o środkach ochrony roślin;
- Dyrektywa 2009/128/WE z dnia 21 października 2009 r. ustanawiająca ramy wspólnotowego działania na rzecz zrównoważonego stosowania pestycydów;
- Rozporządzenie nr 1107/2009 z dnia 21 października 2009 r. dotycząca wprowadzania do obrotu środków ochrony roślin i uchylające dyrektywy Rady 79/117/EWG i 91/414/EWG

15. Wykorzystanie grzybów pożytecznych w ochronie drzew przed patogenami w terenach zurbanizowanych – stan obecny i perspektywy rozwoju

The use of beneficial fungi in trees biological protection from pathogens in urban area – present state and perspectives

Wojciech Sokołowski

Katedra Ochrony Roślin, Wydział Ogrodnictwa i Architektury Krajobrazu, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
Opiekun naukowy: Marek Kopacki

Marek Kopacki: marekkopacki01@gmail.com

Słowa kluczowe: tereny zieleni miejskiej, niechemiczna ochrona roślin, zwalczanie patogenów, biopreparaty, biokontrola

Streszczenie

Tereny zieleni miejskiej charakteryzują się występowaniem niekorzystnych czynników środowiskowych, powodujących zmniejszenie zdrowotności, a nawet zamieranie drzew. W świetle obecnego prawodawstwa stosowanie chemicznej ochrony roślin w miastach jest znacząco ograniczone, zaś alternatywą jest wcielanie metod biologicznych, takich jak zastosowanie biopreparatów opartych na formach przetrwalnych grzybów pożytecznych w ochronie roślin. Jest to perspektywiczny sposób zwalczania patogenów, wymagający dokładniejszego zbadania i udoskonalenia. Zwiększenie skuteczności biopestycydów, szczególnie poprzez opracowanie nowych sposobów formułacji i zwiększenie trwałości preparatów może być kluczowym elementem rozwoju tej dziedziny.

1. Wstęp

Drzewa rosnące w terenach zurbanizowanych w sposób szczególny narażone są na szereg stresorów, czyli niekorzystnych czynników środowiska ograniczających wzrost i rozwój roślin, co w konsekwencji może prowadzić do ich osłabienia i zamierania. Aby zachować drzewa w dobrej zdrowotności, konieczna jest ich ochrona (Bach i Frazik-Adamczyk 2006). Zgodnie z obowiązującym systemem prawnym, ochrona roślin powinna odbywać się według zasad integrowanej ochrony roślin (IOR). System integrowanej ochrony roślin zakłada pierwszeństwo stosowania niechemicznych metod ochrony oraz racjonalne wykorzystywanie środków chemicznych. Tereny zurbanizowane, ze względu na swoje umiejscowienie oraz przeznaczenie, stanowią zazwyczaj obszary użytkowane przez ogół społeczeństwa lub grupy szczególnie narażone, co definiuje art. 3 Rozporządzenia (WE) nr 1107/2009 z dnia 21 października 2009 r. W związku z ograniczeniami w stosowaniu pestycydów konieczne staje się poszukiwanie alternatywnych metod ochrony, m.in. metod biologicznych (Heydari i Pessaraki 2010). Do takich należy wykorzystanie tzw. grzybów pożytecznych.

2. Opis zagadnienia

Specyficzne warunki rozwoju drzew w terenach zurbanizowanych oraz związane z prawodawstwem ograniczenia w stosowaniu chemicznej ochrony roślin generują potrzebę zastąpienia dotychczas znanych metod innymi, alternatywnymi sposobami.

Jedną z nich jest wykorzystanie grzybów pożytecznych, czyli wywierających pozytywny wpływ na chronione rośliny m.in. poprzez oddziaływania konkurencyjne czy pasożytnicze wobec grzybów patogenicznych (Ghorbanpour i in. 2018).

Niniejsza praca ma na celu przedstawienie zagadnień związanych z ochroną roślin w terenach zurbanizowanych oraz mechanizmów działania grzybów wykorzystywanych

w biologicznej ochronie roślin, a także wybranych sposobów wykorzystania grzybów pożytecznych oraz perspektywy ich wykorzystania w ochronie drzew.

3. Przegląd literatury

3.1 Charakterystyka ochrony roślin w terenach zurbanizowanych

Tereny zurbanizowane, ze względu na swoją specyfikę i infrastrukturę miejską, charakteryzują się występowaniem szeregu czynników osłabiających kondycję drzew. Drzewa w miastach wymagają ochrony zarówno przed czynnikami nieożywionymi jak i ożywionymi, nazywanymi odpowiednio abiotycznymi i biotycznymi. Zagrożenia abiotyczne w miastach to przede wszystkim susza glebowa, zbyt wysoka temperatura, nadmierne zasolenie lub zanieczyszczenie podłoża metalami ciężkimi, zagęszczenie (ubicie) gleby i związany z nim niedobór tlenu oraz nieodpowiednie pH glebowe czy niedobór składników pokarmowych. Spośród czynników biotycznych szczególne znaczenie mają: nadmierne zagęszczenie lub rozproszenie drzew, zaburzenia ilościowe i jakościowe fauny glebowej, patogeny (chorobotwórcze mikroorganizmy i wirusy) oraz szkodniki i zagrożenia antropogeniczne. Szczególnie niebezpiecznym zjawiskiem jest nakładanie się działania poszczególnych stresorów (Bach i Frazik-Adamczyk 2006).

Ochrona drzew w terenach zieleni podlega obowiązującym regulacjom prawnym. Od 1 stycznia 2014 roku na terenie całej Unii Europejskiej obowiązuje nakaz stosowania zasad integrowanej ochrony roślin. Wprowadzenie w życie idei ochrony integrowanej sprzyja zachowaniu różnorodności biologicznej oraz ochronie środowiska przyrodniczego i ludzi. Wśród wszystkich dostępnych metod ochrony pierwszeństwo stosowania mają metody niechemiczne. Metody chemiczne, stosowane najczęściej do walki z patogenami, szkodnikami i chwastami, powinny być wykorzystywane tylko wtedy, gdy zachodzi uzasadniona ekonomicznie i ekologicznie konieczność wykonania takiego zabiegu (Łabanowski i in. 2014). Należy dodać, że ich używanie w obszarze miejskich terenów zieleni jest dodatkowo ograniczone ze względu na duże zagęszczenie ludzi oraz występowanie obszarów szczególnych, takich jak parki i ogrody publiczne, tereny sportowe i rekreacyjne, tereny szkolne i place zabaw dla dzieci oraz obszary w bliskim sąsiedztwie obiektów służby zdrowia, co reguluje Dyrektywa 2009/128/WE ustanawiająca ramy wspólnotowego działania na rzecz zrównoważonego stosowania pestycydów.

Zarówno nasilenie stresorów związane ze specyfiką miast, jak i restrykcyjne przepisy prawne dotyczące ochrony w terenach zurbanizowanych, to czynniki ograniczające możliwości wykorzystywania dotychczas znanych metod ochrony chemicznej.

3.2 Grzyby pożyteczne w biokontroli i ochronie roślin i mechanizm ich działania

Grzyby pożyteczne w ochronie roślin to mikroorganizmy o cechach umożliwiających wykorzystanie ich w biokontroli chorób czy szkodników roślin (Ghorbanpour i in. 2018), w tym także endofity (Mei i Flinn 2010) oraz grzyby mikoryzowe (Bonfante i Desirò 2015). Cechą łączącą wszystkie grzyby pożyteczne jest ich pozytywny wpływ na rośliny, pomimo różnych mechanizmów działania. Zasadniczo dobroczynny wpływ grzybów opiera się na konkurencji o pokarm i siedlisko, mykopasożytnictwie, antybiozie, indukowaniu odporności systemicznej, indukowanej hipowirulencji oraz stymulacji wzrostu (Ghorbanpour i in. 2018).

Konkurencja o pokarm oraz siedlisko charakteryzuje się wypieraniem organizmu patogenicznego, który w walce o zasoby pokarmowe i miejsce do rozwoju ustępuje pod wpływem grzyba konkurencyjnego i zarazem niepatogenicznego dla roślin. Mechanizm jest bardzo prosty – wyparty grzyb zazwyczaj zamiera, grzyb pożyteczny kolonizuje roślinę, nie dopuszczając do rozwoju innych organizmów, jednocześnie nie powoduje on zmian chorobowych na roślinie i nie stwarza zagrożenia dla ludzi czy przypadkowych zwierząt.

Mykopasożytnictwo to zjawisko pasożytowania grzybów. Grzyb będący nadpasożytem odżywia się substancjami pochodzącymi z rozkładu strzępek pasożytowanego grzyba; nadpasożyt wytwarza specjalne struktury ułatwiające penetrację strzępek grzybni, zazwyczaj wydziela też enzymy i metabolity wtórne rozkładające ścianę komórkową zaatakowanego mikroorganizmu. Z kolei antybioza opiera się na wydzielaniu przez pożyteczny grzyb substancji hamujących lub zmniejszających rozwój grzyba fitopatologicznego czy bakterii, a nawet jaj niektórych nicieni (np.

Purpureocillium lilacinum). Produkowane substancje to często enzymy rozkładające ścianę komórkową lub antybiotyki. Indukowanie odporności systemicznej (ISR) opiera się na ewolucyjnym przystosowaniu roślin do aktywacji reakcji obronnych pod wpływem stymulacji zarówno przez patogeny, jak i organizmy pożyteczne oraz substancje chemiczne. Wyzwolenie reakcji obronnych wiąże się z recepcją przez roślinę sygnałów chemicznych aktywujących ekspresję genów odpowiedzialnych za ISR. Pod wpływem interakcji grzyb pożyteczny-roślina może dojść do indukowania odporności, zanim dojdzie do kontaktu w układzie patogen-roślina. Indukowana hipowirulencja to unieszkodliwianie patogenicznych grzybów za pomocą mykowirusów i polega na przekazywaniu przez awirulentny lub hipowirulentny szczep grzyba mykowirusa związanego z hipowirulencją (lub awirulencją). W efekcie grzyb pasożytniczy traci swoją zjadliwość (szczep hipowirulentny zazwyczaj nie stanowi zagrożenia dla zdrowotności roślin). Przekazywanie informacji genetycznej odbywa się przez zespolenie mykowirusa i strzępki szczepu zjadliwego (Ghorbanpour i in. 2018; Grzegorzczak i in. 2015). Wymienione mechanizmy mogą występować jednocześnie u jednego szczepu, zwiększając jego możliwości antagonistyczne (Ghorbanpour i in. 2018).

3.3 Wykorzystanie grzybów pożytecznych w ochronie drzew w terenach zurbanizowanych – stan obecny

Biologiczne środki ochrony roślin należą do tzw. pestycydów niskiego ryzyka. Oznacza to, że na podstawie badań składu chemicznego orzeciono o braku substancji niebezpiecznych. Ich aplikacja nie wiąże się z koniecznością stosowania szczególnych środków ostrożności (Rozporządzenie...; Ustawa...).

Pomimo niskiego ryzyka skażenia środowiska preparaty zawierające grzyby pożyteczne wymagają rejestracji, która odbywa się na podobnych zasadach co rejestracja środków chemicznych. Rejestrację środków ochrony roślin i wprowadzanie ich do obrotu w Polsce reguluje Rozporządzenie nr 1107/2009 oraz Ustawa o środkach ochrony roślin z 8 marca 2013. Kończącą decyzję o zarejestrowaniu środka i dopuszczeniu do obrotu podejmuje minister rolnictwa i rozwoju wsi. Przeprowadzenie wymaganych badań oraz procedur związanych z zalegalizowaniem danej substancji czynnej wiąże się z wysokimi nakładami finansowymi, sięgającymi nawet kilku milionów euro (Tomalak 2010). Restrykcyjne prawodawstwo Unii Europejskiej nie zachęca inwestorów do rejestrowania nowych substancji pochodzenia biologicznego i biopreparatów. Jest to jedna z przyczyn mniejszej ilości zarejestrowanych w UE środków ochrony biologicznej oraz wolniejszego rozwoju badań w tej dziedzinie. Dobrym przykładem mogą być np. Stany Zjednoczone Ameryki czy Indie, gdzie rejestracja preparatów biologicznych jest tańsza, przez co w doborze znajduje się o wiele więcej substancji niż w Krajach UE (Damalas i Koutroubas 2018).

Obecnie na terenie Polski (stan na 5 V 2019) zarejestrowanych jest 16 biopreparatów zawierających łącznie 13 gatunków i szczepów grzybów stosowanych w ochronie roślin. Jedynie 4 preparaty posiadają rejestrację do użytkowania w ochronie roślin ozdobnych lub drzew leśnych (za <https://www.gov.pl/web/rolnictwo...>). Problemem jest więc nie tylko brak środków w doborze, ale także brak rejestracji dla wykorzystania w roślinności terenów miejskich – większość środków posiada rejestrację tylko dla roślin warzywnych i sadowniczych.

Wykorzystywanie preparatów biologicznych utrzymuje się na niewielkim poziomie (Damalas i Koutroubas 2018). Mała ilość środków w doborze, ich relatywnie wysoka cena oraz niska skuteczność, spowodowana m.in. zmiennością czynników środowiskowych w otwartej przestrzeni (zwłaszcza w glebie) skutecznie zniechęcają użytkowników do stosowania biopreparatów. Zmienność wspomnianych czynników powoduje ograniczoną stabilność populacji grzybów pożytecznych. Brakuje również programów ochrony biologicznej przeciwko najważniejszym chorobom, przez co zwalczanie najczęstszych patogenów za pomocą biopreparatów staje się niemożliwe. Nowego opracowania wymaga również kwestia aplikacji biopreparatów, zwłaszcza dokerzeniowych (Martyniuk 2012).

3.4 Perspektywy rozwoju ochrony drzew z wykorzystaniem grzybów pożytecznych

Problem rejestracji biopreparatów został podjęty przez Parlament Europejski, który w 2017 roku przyjął rezolucję popierającą działania mające na celu uproszczenie procedur legislacyjnych.

Perspektywa ułatwienia procesu rejestracji dodatkowo zwiększa dynamikę prowadzonych w tym kierunku badań (Skwiercz i Zapałowska 2018). Wydaje się, że uproszczenie procedur i obniżenie kosztów rejestracji zwiększy udział biopreparatów zawierających pożyteczne grzyby na rynku pestycydów w Polsce i Unii Europejskiej, jak ma to miejsce w wielu krajach na całym świecie (Damasas i Koutroubas 2018).

W ciągu ostatnich lat, procentowy udział wszystkich sprzedawanych biopestycydów wśród środków ochrony roślin na świecie wahał się w granicach 1-3%. Wg Martyniuka (2012) zwiększenie udziału sprzedaży biopreparatów uzależnione będzie od postępu naukowego w tej dziedzinie. Wskazując najważniejsze kierunki rozwoju, autor wymienia m.in. potrzebę zwiększenia niezawodności preparatów opartych na aktywnych mikroorganizmach.

Wprowadzenie nowego biopreparatu wymaga udowodnienia jego wysokiej skuteczności, sięgającej 95-98%. Osiągnięcie tak dobrych rezultatów jest bardzo trudne do osiągnięcia. W praktyce użytkowania biopestycydów polecane jest tzw. podejście zintegrowane, polegające na łącznym wykorzystaniu różnych metod alternatywnych, także chemicznych. Celem zwiększenia skuteczności preparatów wzbogaca się je substancjami chemicznymi, takimi jak chlorek wapnia, kwas salicylowy, a także antyoksydanty czy polisacharydy (nie będącymi jednak pestycydami). Wykorzystuje się także biopreparaty kombinowane, zawierające nie tylko grzyby, ale np. bakterie. Ciekawym kierunkiem badań jest także hodowla roślin GMO z wykorzystaniem genów wyizolowanych z organizmów grzybowych, kodujących właściwości antagonistyczne względem patogenów (**Grzegorzczak i in. 2015**).

Perspektywicznym sposobem biokontroli chorób grzybowych drzew jest wykorzystanie grzybów z rodzaju *Trichoderma* czy należącego do lęgniowców *Pythium oligandrum*. Preparaty oparte na tych organizmach są dostępne na polskim rynku, nie mają jednak rejestracji do użytkowania w ochronie drzew w terenach zieleni (w ochronie roślin ozdobnych, wyłączając szkółki). Szereg gatunków z rodzaju *Trichoderma* to organizmy o doskonałych właściwościach antagonistycznych i saprofitycznych; gatunki *Trichoderma* to najpowszechniej używane organizmy grzybowe do biokontroli chorób roślin, w szczególności jako mykopasożyty takich patogenów, jak grzyby z rodzaju *Rhizoctonia*, *Pythium*, *Botrytis* i *Fusarium*. Rodzaj *Trichoderma* charakteryzuje się występowaniem różnorodnych mechanizmów oddziaływania skutecznych w biokontroli roślin, m.in. mykopasożytnictwa, antybiozy czy konkurencji. Wpływa również witalizująco na rośliny i nie wykazuje właściwości szkodliwych dla ludzi i zwierząt; badania nad wykorzystaniem rodzaju *Trichoderma* w ochronie roślin sięgają lat 30 ubiegłego wieku (Saba i in. 2012). Mikroorganizm *Pythium oligandrum* uznawany jest jako powszechny antagonist wielu grzybów i lęgniowców, w tym *Botrytis*, *Fusarium* i *Phytophthora*. Jego działanie opiera się na mykopasożytnictwie, indukcji odporności oraz stymulacji wzrostu roślin (Brožová 2002).

Pomimo trudności w rejestracji nowych środków biologicznych, pojawiają się doniesienia o nowych odkryciach w tej dziedzinie, odkrywane są m.in. nowe gatunki pożytecznych grzybów. Kumar i Singh (2009) opublikowali badania w których wykazano mykopasożytnicze działanie grzyba *Lasiodiplodia theobromae* wobec patogenów powodujących mączniaka prawdziwego. Badania zostały przeprowadzone na 40 okazach roślin, skąd izolowano mykopasożytnicze grzyby pasożytujące na mączniaku prawdziwym. Gatunki *Ampelomyces quisqualis* (grzyb znany już wcześniej jako mykopasożyt) oraz wspomniany *L. theobromae* zostały uznane jako organizmy perspektywiczne w zwalczaniu mączniaka. Martínez-Álvarez i in. (2016) w swoich badaniach wykazali skuteczność dwóch izolatów grzybów endofitycznych w biokontroli jednego z najgroźniejszych patogenów sosny kalifornijskiej – *Fusarium circinatum*. Wskazane szczepy – *Chaetomium aureum* i *Alternaria* sp. wykazywały antagonizm wobec patogenu *in vivo*.

Badania przeprowadzone przez Rigerte i in. (2019) wykazują skuteczność niektórych szczepów endofitów korzeniowych wyizolowanych z korzeni różnych gatunków świerka (*Picea* sp.) oraz sosny zwyczajnej (*Pinus silvestris*) przeciwko patogenowi korzeni *Heterobasidion parviporum*, jednak dowiedzione zależności wymagają jeszcze dokładniejszych badań.

Jak podają Deketelaere i in. (2017) wykorzystanie hipowirulentnych ras grzyba *Verticillium* może przyczynić się do zwalczania zjadliwych form tego patogena. Podobnie Kovács i in. (2018) donoszą o pozytywnych rezultatach biokontroli jednej z poważniejszych chorób grzybowych

kasztana jadalnego (*Castanea sativa*) poprzez zakażenie znajdujących się w rejonie badań drzew hipowirulentnymi rasami grzyba *Cryphonectria parasitica*.

4. Podsumowanie i wnioski

Zjawisko wykorzystania mikroorganizmów w ochronie roślin jest szeroko opisywane w literaturze, co wskazuje na jego złożoność. Potrzebne są dalsze badania i w tej dziedzinie (Grzegorzczak i in. 2015). Od efektów tych badań zależy powodzenie metod biokontroli i zwiększenia udziału biopestycydów w ogólnosiwiatowym rynku środków ochrony roślin (Martyniuk 2012). Należy dołożyć starań nad opracowaniem metod zwiększenia skuteczności biopreparatów, m.in. poprzez opracowywanie nowych metod formulacji i aplikacji (Grzegorzczak i in. 2015) oraz uproszczenia procedur, co prawdopodobnie wpłynie na obniżenie kosztów związanych z zakupem biopreparatów oraz większy dobór biopestycydów (Damalas i Koutroubas 2018). Stosowanie biopreparatów nie wiąże się ze stosowaniem toksycznych substancji chemicznych, dzięki czemu jego stosowanie nie stanowi zagrożenia dla środowiska naturalnego i ludzi. Wykorzystanie biopestycydów opartych na grzybach pożytecznych w ochronie drzew w terenach zurbanizowanych jest alternatywą dla stosowania tradycyjnych środków ochrony, co jest istotne zwłaszcza w świetle obecnych przepisów, znacząco ograniczających możliwości wykorzystania metod chemicznych.

5. Literatura

- Bach A, Frazik-Adamczyk M (2006) Charakterystyka zagrożeń zieleni miejskiej ze szczególnym uwzględnieniem zieleni w ciągach komunikacyjnych, Kraków.
- Bonfante P, Desirò A (2015) Arbuscular Mycorrhizas: The Lives of Beneficial Fungi and Their Plant Hosts. In: Lugtenberg B. (eds) Principles of Plant-Microbe Interactions. Springer, Cham.
- Brožová J (2002) Exploitation of the mycoparasitic fungus *Pythium oligandrum* in plant protection. *Plant Protection Science* 38(1): 29–35.
- Damalas C, Koutroubas S, (2018) Current Status and Recent Developments in Biopesticide Use. *Agriculture* 8.1 (2018): 13.
- Deketelaere S, Tyvaert L, França C et al (2017) Desirable Traits of a Good Biocontrol Agent against *Verticillium* Wilt. *Frontiers in Microbiology* 8(2017): 1186.
- Ghorbanpour M, Omidvari M, Abbaszadeh-Dahaji P et al (2018) Mechanisms underlying the protective effects of beneficial fungi against plant diseases. *Biological Control* 117: 147-157.
- Grzegorzczak M, Szalewicz A, Żarowska B i in. (2015) Drobnoustroje w biologicznej ochronie roślin przed chorobami grzybowymi. *Acta Sci. Pol., Biotechnologia* 14(2): 19-42.
- Heydari A, Pessarakli M (2010) A review on biological control of fungal plant pathogens using microbial antagonists. *Journal of Biological Sciences* 10(4): 273-290.
- Kumar P, Singh L (2009) *Lasiodiplodia theobromae* is a mycoparasite of a powdery mildew pathogen. *Mycobiology*, 37(4): 308-309.
- Kovács G, Bodnár D, Tarcali G et al (2018) Biological control of sweet chestnut on Pécsbánya, Hungary. *Acta Agraria Debreceniensis*, (74): 77-81.
- Łabanowski G, Chałańska A, Marosz A i in. (2014) Metodyka integrowanej ochrony roślin ozdobnych w ogrodach przydomowych. Skierniewice.
- Martínez-Álvarez P, Arcadio Fernández-González R, Vicente Sanz-Ros A et al (2016) Two fungal endophytes reduce the severity of pitch canker disease in *Pinus radiata* seedlings. *Biological Control* 94, (2016):1-10.
- Martyniuk S (2012) Factors affecting the use of microbial biopesticides in plant protection. *Progress In Plant Protection* 52(4): 957-962.
- Mei C, Flinn B (2010) The Use of Beneficial Microbial Endophytes for Plant Biomass and Stress Tolerance Improvement.. *Recent patents on biotechnology*. 4(1): 81-95.
- Saba H, Vibhash D, Manisha M et al (2012) *Trichoderma* – a promising plant growth stimulator and biocontrol agent. *Mycosphere* 3(4): 524–531.
- Skwiercz A, Zapalowska A (2018) Nicienie entomopatogenne w lasach i szkółkach leśnych. *Sylvan* 162(12): 1018-1028.

Tomalak M (2010) Rynek biologicznych środków ochrony roślin i przepisy legislacyjne. Prog. Plant Prot./Post. Ochr. Roślin 50 (3): 1053-1063.

Rigerte L, Blumenstein K, Terhonen E (2019) New R-Based Methodology to Optimize the Identification of Root Endophytes against *Heterobasidion parviporum*. Microorganisms 2019; 7(4): 102.

Akty prawne:

Ustawa z dnia 8 marca 2013 r. o środkach ochrony roślin;

Rozporządzenie nr 1107/2009 z dnia 21 października 2009 r. dotycząca wprowadzania do obrotu środków ochrony roślin i uchylające dyrektywy Rady 79/117/EWG i 91/414/EWG;

Dyrektywa 2009/128/WE z dnia 21 października 2009 r. ustanawiająca ramy wspólnotowego działania na rzecz zrównoważonego stosowania pestycydów;

Adresy internetowe: <https://www.gov.pl/web/rolnictwo/rejestr-rodkow-ochrony-roslin>

16. Aktywność enzymatyczna gleb sąsiadujących z zadrzewieniami przyulicznymi na terenach zurbanizowanych

Enzymatic activity of the soils adjacent to street shelterbelts in the urbanized areas

Joanna Trzcńska, Joanna Gmitrowicz-Iwan, Elżbieta Zawierucha

Instytut Gleboznawstwa, Inżynierii i Kształtowania Środowiska, Wydział Agrobiotechnologii,
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie.

Opiekun naukowy: Barbara Futa

Joanna Trzcńska: joanna.trzcinska25@gmail.com

Słowa kluczowe: aktywność biologiczna, antropopresja, gleba, zielen przyuliczna.

Streszczenie

Celem pracy była ocena wpływu zadrzewień przyulicznych na terenach zurbanizowanych na aktywność enzymatyczną sąsiadujących z nimi gleb. Oceny tej dokonano na podstawie określenia zmian aktywności szeregu enzymów glebowych, warunkowanych odległością od zadrzewień. Badaniami objęto 3 powierzchnie sąsiadujące z zadrzewieniami. Wytypowane powierzchnie są położone w obrębie strefy śródmiejskiej i podmiejskiej Lublina oraz pobliskiej wsi Dębówka. Próbkę glebową pobrano z warstwy 0-20 cm, z odległości 2 i 20 m od krawędzi zadrzewień. W glebach wszystkich powierzchni badawczych stwierdzono istotnie większą aktywność analizowanych enzymów w najbliższym sąsiedztwie zadrzewień przydrożnych niż w odległości 20 m od ich krawędzi, co wskazuje, że nasilenie procesów biochemicznych w środowisku glebowym zależy istotnie od odległości od zadrzewień. Uzyskane wyniki wykazały, że aktywność dehydrogenaz, fosfataz i proteaz w analizowanych glebach wzrastała istotnie w następującej sekwencji: miasto < strefa podmiejska < wieś, niezależnie od odległości od krawędzi zadrzewień przyulicznych. Osłabienie aktywności większości badanych enzymów glebowych w strefach śródmiejskiej i podmiejskiej wiązało się z nasileniem antropopresji wyrażającym się zwiększonym dopływem zanieczyszczeń z terenu miasta. Natomiast w przypadku ureazy stwierdzono przeciwną tendencję. Aktywność tego enzymu kształtowała się na wyższym poziomie w glebach miejskich i podmiejskich niż w strefie wiejskiej. Wskazuje to, że aktywność enzymatyczną badanych gleb kształtują zarówno czynniki wewnętrzne oraz nasilenie presji antropogenicznej, jak i sąsiedztwo zadrzewień przyulicznych.

1. Wstęp i cel pracy

Szybkie, najczęściej chaotyczne rozprzestrzenianie się miast, budowa nowych dróg, przebudowa dróg istniejących i poszerzanie jezdni wiąże się z problemami ekologicznymi, jakie wystąpią i jakie będą ich konsekwencje nie tylko dla obszarów zurbanizowanych, ale także otaczających terenów z krajobrazu otwartego, w tym terenów chronionych (Żarska 2003; Zimny 2005). Antropopresja na terenach zurbanizowanych generuje ekstremalne przekształcenia warunków środowiskowych, prowadzące do degradacji biologicznej gleb. Zadrzewienia przyuliczne na terenach zurbanizowanych, tworzące żywe, zielone ekrany ochronne, mogą wpływać stymulująco na procesy samoregulacyjne i zachowanie równowagi ekologicznej środowiska glebowego (Piotrowska i Mazurek 2007; Astaraci 2008; Bielińska i Kołodziej 2009). Należy podkreślić, iż obszary przyuliczne stanowią elementy przestrzenne krajobrazu antropogenicznego stosunkowo wysoko obciążone różnymi zanieczyszczeniami (Zimny 2005). Obszary te odznaczają się występowaniem szeregu zjawisk o charakterze degradacyjnym, obejmującym: powietrze atmosferyczne, wody i gleby, zarówno natury termicznej, jak też związanej z kształtowaniem wilgotności i przepływem mas powietrza oraz konstrukcją pokrywy glebowej. Ponadto samo użytkowanie dróg ma istotny wpływ na generowanie sytuacji konfliktowych na styku świata nieożywionego i ożywionego (Greinert 2008). Dopływ toksycznych składników spalin do zadrzewień przyulicznych, a także zasolenie gleby

powoduje zakłócenia metabolizmu drzew i ma znaczący wpływ na stan ekologiczny biocenoz (Bielińska 2007). Szczególne zagrożenie wiąże się z efektem wtórnego pylenia przez podnoszenie materiału zdeponowanego na drogach (pyły drogowe) przez poruszające się pojazdy (Walczak 2008). Obciążenie tego materiału zanieczyszczeniami ropopochodnymi, metalami ciężkimi oraz innymi substancjami potencjalnie toksycznymi, może powodować negatywne oddziaływanie skumulowanych zanieczyszczeń na drzewa przyuliczne (Greinert 2008). Zadrzewienia przyuliczne powinny się zatem charakteryzować odpowiednią organizacją oraz cechami funkcjonalnymi dobranymi dla danego obszaru (Cieszewska 2004; Haber i Urbański 2005). Pozytywny wpływ zieleni przyulicznej na ekologię terenów zurbanizowanych jest wielokierunkowy (Haber i Urbański 2005; Zimny 2005; Kocur-Bera i Dudzińska 2013):

- wpływa korzystnie na stan czystości środowiska terenów zurbanizowanych, ponieważ pochłania CO₂, zatrzymuje pyły, gromadzi zanieczyszczenia, stanowi rodzaj filtru samoczynnie oczyszczającego powietrze przy każdym opadzie atmosferycznym, przy czym wytwarza dodatkowy tlen – tworząc żywy ekosystem;
- przyczynia się do obniżenia wahań temperatury w mieście za sprawą procesu transpiracji, a także poprzez zacienianie powierzchni gruntu oraz elementów infrastruktury;
- stanowi istotny element urozmaicający walory estetyczne antropogenicznego, często monotonnego krajobrazu przydrożnego, w tym:
 - podkreśla linearność krajobrazu,
 - akcentuje zakręty;
- wpływa na wzrost bezpieczeństwa ruchu drogowego – zmniejsza oślepienie reflektorami;
- wzmacnia niwelety drogi.

Największą ekologiczną efektywność zadrzewień przydrożnych można uzyskać wtedy, gdy ich skład gatunkowy będzie dostosowany do ich funkcji, lokalizacji i budowy drogi, przy równoczesnym uwzględnieniu wymagań siedliskowych poszczególnych gatunków (Haber i Urbański 2005; Zimny 2005). Gatunki roślin stosowane do obsadzeń ulicznych powinny gwarantować bezpieczeństwo użytkownikom dróg, a jednocześnie powinny być odporne na niekorzystne warunki siedliskowe (Haber i Urbański 2005; Zimny 2005; Kocur-Bera i Dudzińska 2013). Cytowani autorzy podkreślają, że zadrzewienia przyuliczne powinny się charakteryzować małymi wymaganiami w stosunku do żyzności podłoża, natomiast dużą tolerancją na zasolenie i alkalizację gleb, odpornością na suche i przegrzane powietrze oraz odpornością na zanieczyszczenia powietrza atmosferycznego. Do obsadzania ulic na terenach zurbanizowanych nie powinno się używać gatunków tworzących rozległe, grube konary (np. topola berlińska), cieniujące oświetlenie ulic, wrastające w przewody linii tramwajowych, zaśmiecające ulice w czasie kwitnienia i opadania liści (Haber i Urbański 2005; Zimny 2005). Należy unikać gatunków z tendencją do tworzenia słabych rozwidleń, łatwo się rozłamujących, o kruchym drewnie, takich jak: topole, klony srebrzyste, wierzby, bądź kasztanowce (Kocur-Bera i Dudzińska 2013). Nadziemne części drzew, stanowiące źródło opadu roślinnego, w połączeniu z wydzielinami korzeniowymi oraz obumarłymi fragmentami systemu korzeniowego oddziałują korzystnie na stan biologiczny gleb (Bielińska i in. 2014). Systemy korzeniowe roślin warunkują rozwój części nadziemnej przez zaopatrywanie wodę, sole mineralne, stabilizację w podłożu oraz wchodzenie w złożone interakcje z biocenozą gleby i ścisłe współzycie międzygatunkowe w pobieraniu pokarmów. Wydzieliny korzeniowe wpływają na rozwój mikroorganizmów glebowych, jak i ich adaptację do degradacji zanieczyszczeń, co ma szczególne znaczenie na terenach zurbanizowanych (Bielińska i Kołodziej 2009). Podstawą funkcjonowania terenów zurbanizowanych oraz ich integralną częścią są gleby. Dobrym wskaźnikiem zmian zachodzących w glebie pod wpływem stresowych czynników środowiskowych jest aktywność enzymów, mających istotny wpływ na przemiany biogeochemiczne w obiegu pierwiastków. Testy enzymatyczne uważane są za jeden z bardziej wrażliwych wskaźników funkcjonowania ekosystemów (Bielińska i in. 2014).

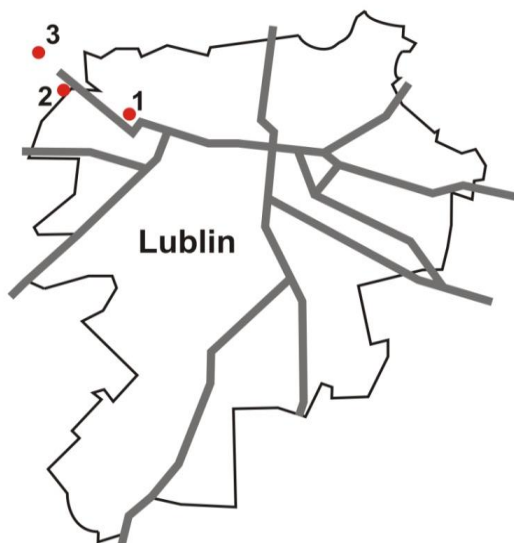
Celem pracy była ocena wpływu zadrzewień przyulicznych na terenach zurbanizowanych na aktywność enzymatyczną sąsiadujących z nimi gleb. Oceny tej dokonano na podstawie określenia zmian aktywności szeregu enzymów glebowych, warunkowanych odległością od zadrzewień.

2. Materiał i Metody

Badaniami objęto 3 powierzchnie sąsiadujące z zadrzewieniami złożonymi z 40-50-letnich nasadzeń robinii akacjowej (*Robinia pseudacacia* L.) (Tab. 1). Wytypowane powierzchnie badawcze są położone wzdłuż drogi krajowej nr 372, na odcinku stanowiącym trasę wylotową z Lublina w kierunku Warszawy, w północno-zachodniej części Lublina. Powierzchnia nr 1 znajduje się w ścisłej strefie miasta, powierzchnia nr 2 w strefie podmiejskiej, natomiast powierzchnia nr 3 zlokalizowana jest w obrębie wsi Dębówka, położonej w odległości 4 km od granic miasta (Rys. 1). Zadrzewienia przylegające do powierzchni badawczych rosną na wąskich pasach, o szerokości 2-3 m. W skład zadrzewień przyulicznych na wytypowanych powierzchni wchodziły wyłącznie drzewa robinii.

Tab.1. Charakterystyka badanych zadrzewień.

Powierzchnia	Wiek drzew (lata)	Wysokość (m)	Pierśnica (m)	Odległość między drzewami (m)	Rozpiętość korony (m)
1 – śródmieście	50	9-14	0,20-0,32	2,8-3,9	4-8
2 – strefa podmiejska	45	12-14	0,28-0,50	2,2-3,4	4-9
3 – wieś	40	12-15	0,21-0,55	2,0-3,1	6-9



Rys.1. Usytuowanie powierzchni badawczych nr 1, 2, 3 na planie miasta Lublina.

Powierzchnię glebową wytypowanych powierzchni badawczych stanowiły gleby wytworzone z lessów o składzie granulometrycznym pyłów, zaliczone do gleb pływych niecałkowitych (Systematyka Gleb Polski 2011). Podstawowe właściwości analizowanych gleb przedstawiono w tabeli 2. Ze względu na niewielką przestrzenną zmienność podstawowych właściwości badanych gleb w tabeli 2 zamieszczono wyniki średnie analizowanych parametrów z poszczególnych powierzchni oraz zakres pH_{KCl} .

Próbki glebowe do analiz laboratoryjnych z wytypowanych powierzchni badawczych pobrano we wrześniu 2018 roku, z warstwy 0-20 cm z odległości 2 i 20 m od krawędzi zadrzewień. Analizowana próbka glebową była średnią z trzech próbek pobranych z każdej powierzchni. Próbki

glebowe do badań pobrano w okresie stabilnej pogody, w którym gleba znajdowała się w stanie dynamicznej równowagi, utrzymującej bieg procesów biochemicznych w granicach umiarkowanego nasilenia. Optymalnie dobrane terminy pobierania próbek gleby do analiz mają istotne znaczenie, szczególnie w przypadku badań aktywności procesów biochemicznych zachodzących w środowisku glebowym. Analizy enzymatyczne w okresie bujnego rozwoju mikroflory glebowej, np. „wybuchu” aktywności mikrobiologicznej pojawiającego się w ciągu jednego do dwóch dni po intensywnych opadach, zwłaszcza występujących po okresie suszy, przedstawiają wyniki przejściowej, zawyżonej aktywności biochemicznej gleby, odbiegającej od przeciętnego jej poziomu (Bielińska i in. 2014). Metodyka oznaczania aktywności enzymatycznej gleb została oparta na wynikach szczegółowych badań i analiz Russela i in. (2006) w zakresie wyselekcjonowania najlepszych i dających powtarzalne wyniki metod oznaczania wybranych enzymów glebowych. Metody te zostały sprawdzone w trakcie wieloletniego stosowania przez autorów opracowania (Russel i in. 2006). W pobranym materiale glebowym oznaczono aktywność następujących enzymów: dehydrogenaz, fosfatazy kwaśnej, fosfatazy alkalicznej, ureazy i proteaz. Enzymy te biorą bezpośredni udział w biogeochemicznym obiegu węgla (dehydrogenazy), azotu (ureaza oraz proteza) i fosforu (fosfatazy) w ekosystemach, przy czym wyraźnie reagują na działanie czynników stresowych, a wielkość zmiany ich aktywności jest związana z natężeniem działających czynników (Bielińska i in. 2014). Aktywność dehydrogenaz podano w $\text{mg TFF}(\text{trifeniloformozan}) \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{s.m. gleby} \cdot \text{h}^{-1}$, niezbędnego do redukcji TTC (chlorek trifenylotetrazolu) do TFF; fosfataz w $\text{mg p-nitrofenolu (PNP)}$, wytworzonego z 4-nitrofenylofosforanu sodowego; ureazy – w mg N-NH_4^+ powstałego z hydrolizowanego mocznika; proteazy w mg tyrozyny wytworzonej z kazeinianu sodu. Wymienione jednostki, wyrażające aktywność analizowanych enzymów, są zgodne z konwencją przyjętą przez Międzynarodową Unię Biochemiczną (Russel i in. 2006). Aktywność enzymów oznaczano w glebie o naturalnej wilgotności, a wyniki przeliczano na suchą masę gleby. Wszystkie oznaczenia zostały wykonane w trzech równoległych powtórzeniach. Uzyskane wyniki poddano ocenie statystycznej. Różnice między wartościami średnimi sprawdzono testem t , zaś istotność wyników – metodą analizy wariancji. (Maliński 2004; StatSoft 2006). Przyjęto poziom istotności stosowany najczęściej w badaniach przyrodniczych, tj. $\alpha = 0,05$ (przy prawdopodobieństwie zdarzenia $p = 0,95$).

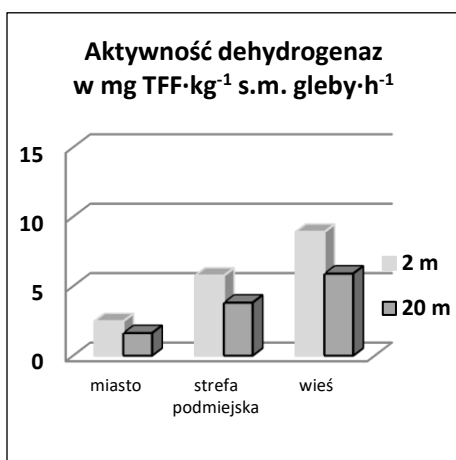
Tab.2. Podstawowe właściwości badanych gleb (wartości średnie z powierzchni i zakres pH_{KCl})

Parametr	Jednostka	Zawartość
frakcja 2,0-0,05	%	16
frakcja 0,05-0,002		69
frakcja < 0,002		15
pH	$1 \text{ mol KCl} \cdot \text{dm}^{-3}$	6,34-6,42
Węgiel organiczny	$\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	14,2
Fosfor przyswajalny	$\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	31,6
Potas przyswajalny		62,4
Magnez przyswajalny		26,1
Zn		34,89
Pb	$\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	44,38
Cd	$\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	< 0,52

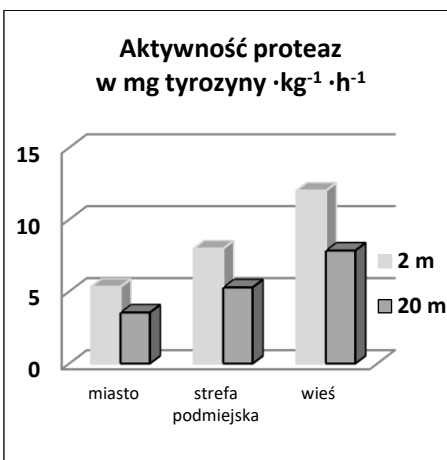
3. Wyniki badań i dyskusja

Uzyskane wyniki wykazały korzystny wpływ zadrzewień przyulicznych na aktywność enzymatyczną badanych gleb. W glebach wszystkich powierzchni badawczych stwierdzono istotnie większą (około 1,5-krotnie) aktywność analizowanych enzymów w najbliższym sąsiedztwie zadrzewień przydrożnych niż w odległości 20 m od ich krawędzi (Rys. 1). W wielu badaniach krajowych wykazano wyraźny i statystycznie istotny trend dokumentujący wzrost aktywności enzymatycznej gleb położonych bliżej zadrzewień złożonych z nasadzeń robinii akacjowej (*Robinia pseudacacia* L.) (Piotrowska i Mazurek 2007, 2009; Mazurek i in. 2011). Istotny wzrost aktywności

biologicznej gleb w sąsiedztwie zadrzewień robinii dokumentują również wyniki badań autorów zagranicznych (m.in.: Astarai 2008; Lee i in. 2011; Zhen-Yi i in. 2013). Astarai (2008) stwierdził ścisłą zależność między ilością materiału roślinnego dostającego się do gleby z drzew liściastych, w tym również z robinii a liczebnością bakterii, grzybów i promieniowców – mikroorganizmów, które stanowią główne źródło enzymów w środowisku glebowym. Z badań Lee i in. (2011) oraz Zhen-Yi i in. (2013) wynika, że obecność zadrzewień robinii powoduje istotne zwiększenie aktywności metabolicznej bakterii, w szczególności związanych z obiegiem fosforu i azotu w glebie. Potwierdzają to uzyskane wyniki badań własnych, które dokumentują istotny wzrost aktywności enzymów katalizujących procesy biologicznego obiegu fosforu i azotu (fosfatazy kwaśnej, fosfatazy alkalicznej, ureazy i proteaz) w glebach położonych bliżej zadrzewień robinii (Rys. 1). W niniejszych badaniach taki sam efekt stwierdzono w przypadku aktywności dehydrogenaz (Rys. 2). Istotny wzrost aktywności tej grupy enzymów w glebach uprawnych sąsiadujących z zadrzewieniami robinii akacjowej obserwowano w wielu badaniach (Piotrowska i Mazurek 2007, 2009; Mazurek i in. 2011). Należy podkreślić, iż wykazany w badaniach własnych istotnie stymulujący wpływ zadrzewień przyulicznych na aktywność dehydrogenaz, stwierdzony na terenach poddanych nasilonej presji antropogenicznej (rys. 2), ma szczególne znaczenie z ekologicznego punktu widzenia. Dehydrogenazy, enzymy występujące w glebie jako integralna część nienaruszonych, żywych komórek drobnoustrojów, są enzymami szczególnie wrażliwymi na działanie stresowych czynników środowiskowych. Aktywność tej grupy enzymów jest stosowana jako wskaźnik zanieczyszczenia środowiska glebowego metalami ciężkimi i WWA (Bielińska i in. 2014). Generalnie, korzystny wpływ zadrzewień na aktywność enzymatyczną gleb związany jest z dopływem świeżej substancji organicznej (opad roślinny) oraz z dynamicznym rozwojem mikroorganizmów w strefie korzeniowej, spowodowanym obfitością łatwo dostępnej substancji energetycznej, a także poprzez zwiększenie puli enzymów wydzielanych przez korzenie drzew do środowiska glebowego. Wydzieliny korzeniowe wpływają zarówno na rozwój mikroorganizmów glebowych, jak i ich adaptację do degradacji zanieczyszczeń, co ma szczególne znaczenie na terenach przyulicznych (Bielińska i in. 2014).



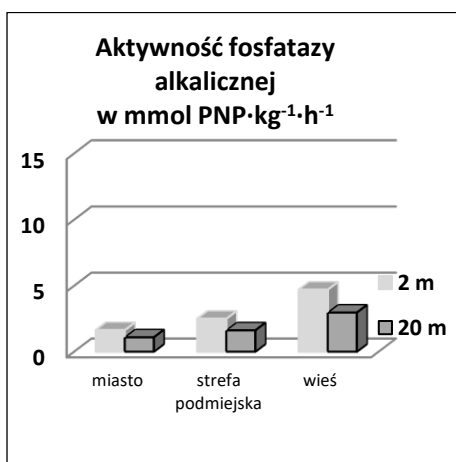
Rys.2. Aktywność dehydrogenaz.



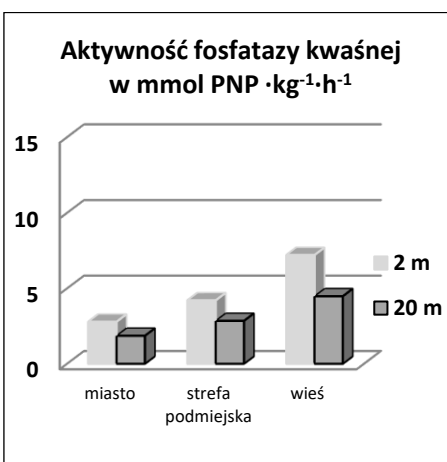
Rys.3. Aktywność proteaz.

Uzyskane wyniki pokazują, że aktywność dehydrogenaz, badanych fosfataz i proteaz w analizowanych glebach zależała istotnie od lokalizacji powierzchni badawczych i wzrastała w następującej sekwencji: miasto < strefa podmiejska < wieś, niezależnie od odległości od krawędzi zadrzewień przyulicznych (Rys. 1). W sąsiedztwie zadrzewień (w odległości 2 m od ich krawędzi) aktywność dehydrogenaz, badanych fosfataz i proteaz była mniejsza w glebie powierzchni zlokalizowanej w obrębie śródmieścia oraz w strefie podmiejskiej niż w glebie ze strefy wiejskiej, odpowiednio o ponad 3,5-, 2,5- i 2,0-krotnie oraz od około 1,5- do 2,0-krotnie (Rys. 2,3,4,5). Osłabienie aktywności większości badanych enzymów glebowych w strefach śródmiejskiej i

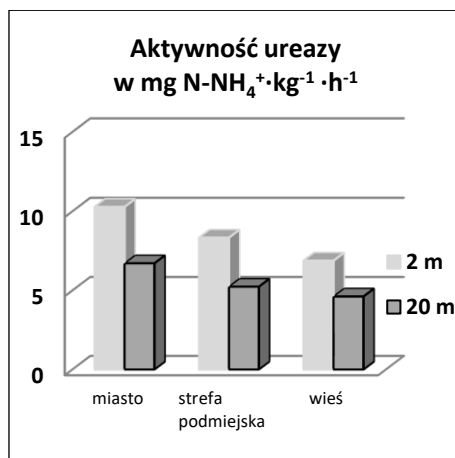
podmiejskiej wiąże się z nasileniem antropopresji wyrażającym się zwiększonym dopływem zanieczyszczeń z terenu miasta, a także jak wspomniano wcześniej, z występowaniem szeregu zjawisk o charakterze degradacyjnym (Bielińska i in. 2006; Bielińska 2007; Greinert 2008). Prawdopodobności takiej nie zanotowano w przypadku ureazy. Aktywność tego enzymu kształtowała się na wyższym poziomie w glebach miejskich i podmiejskich niż w strefie wiejskiej (Rys. 6). Ureaza jest odporna na działanie czynników zewnętrznych, a w warunkach stresowych obserwuje się wzrost jej aktywności. Jedynym czynnikiem limitującym jej aktywność jest dostępność substratu – mocznika, gdyż jako enzym ekstracelularny jest syntetyzowana jedynie w jego obecności (Bielińska i in. 2014). Szczególnie duże aglomeracje miejskie są znaczącymi producentami mocznika. Źródłem mocznika (który jest finalnym produktem metabolizmu białek u zwierząt lądowych, jak również u człowieka) w glebach są m.in.: odpady spożywcze, odchody zwierząt, fragmenty tkanek fauny glebowej, resztki roślinne, komórki mikroorganizmów. Na podstawie aktywności ureazy można ocenić stopień antropogenizacji terenów zurbanizowanych (Bielińska i in. 2006; Bielińska 2007). Wyniki te wskazują, że kierunek i nasilenie badanych procesów biochemicznych zależne były od rodzaju enzymu, co związane jest zarówno z indywidualną wrażliwością i odpornością enzymów na czynniki środowiskowe, jak i z zawartością w glebie specyficznych substratów dla reakcji enzymatycznych (Bielińska i in. 2014).



Rys.4. Aktywność fosfatazy alkalicznej.



Rys.5. Aktywność fosfatazy kwaśnej.



Rys.6. Aktywność ureazy.

4. Wnioski

Przeprowadzone badania pozwoliły na sformułowanie następujących wniosków:

- A. Zadrzewienia przyuliczne złożone z robinii akacjowej przyczyniają się do aktywizacji biologicznej gleb znajdujących się w ich sąsiedztwie.
- B. W badanych glebach aktywność analizowanych enzymów (dehydrogenaz, fosfatazy kwaśnej, fosfatazy alkalicznej, ureazy i proteaz) była istotnie większa w najbliższym sąsiedztwie zadrzewień przydrożnych niż w odległości 20 m od ich krawędzi, co wskazuje, że nasilenie procesów biochemicznych w środowisku glebowym zależy istotnie od odległości od zadrzewień.
- C. Aktywność dehydrogenaz, badanych fosfataz i proteaz w analizowanych glebach zależała istotnie od lokalizacji powierzchni badawczych i wzrastała w następującej sekwencji: miasto < strefa podmiejska < wieś, niezależnie od odległości od krawędzi zadrzewień przyulicznych. Świadczy to, że aktywność biologiczną gleb na terenach zurbanizowanych kształtują zarówno czynniki wewnętrzne oraz nasilenie presji antropogenicznej, jak i sąsiedztwo zadrzewień.
- D. Pomiar aktywności enzymatycznej gleb daje możliwość precyzyjnego określenia wpływu zadrzewień przyulicznych na stan biologiczny gleb, a także reakcji gleby na czynniki stresowe.

5. Literatura

- Astaraei AR (2008) Microbial count and succession, soil chemical properties as affected by organic debris decomposition. *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences* 4(2): 178-188.
- Bielińska EJ, Baran S, Futa B (2006) Wpływ ryzosfery na aktywność enzymatyczną gleb ogródków działkowych z terenów zurbanizowanych. *Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych* 515:15-22.
- Bielińska EJ, Futa B, Mocek-Płóćiniak (2014) Enzymy glebowe jako bioindykatory jakości i zdrowotności gleby. Monografia Naukowa. Towarzystwo Wydawnictw Naukowych "LIBROPOLIS".
- Bielińska EJ (2007) Aktywność enzymów glebowych w ryzosferze mniszka lekarskiego jako wskaźnik stanu ekochemicznego gleb miejskich. *Journal of Research and Applications in Agricultural Engineering* 52(3): 10-14.
- Bielińska EJ, Kołodziej B (2009) The effect of common dandelion (*Taraxacum officinale* Web.) rhizosphere on heavy metal content and enzymatic activity on soils. *Acta Horticulturae* 826: 345-350.
- Cieszewska A (2004) Problemy Ekologii Krajobrazu. Wydawnictwo SGGW 14: 13-16.
- Greinert A (2008) Poprawa właściwości sorpcyjnych gleb jako warunek utrzymania w dobrym stanie terenów zieleni miejskiej. *Roczniki Gleboznawcze* 60(3): 75-83.
- Haber Z, Urbański P (2005) Kształtowanie terenów zieleni z elementami ekologii: Wydawnictwo Akademii Rolniczej w Poznaniu.
- Kocur-Bera K, Dudzińska M (2013) Identyfikacja funkcji zadrzewień przydrożnych. *Acta Scientiarum Polonorum* 12(4): 27-39.
- Lee YC, Nam JN, Kim JG (2011) The influence of black Locust (*Robinia pseudoacacia*) flower and leaf fall on soil phosphate.
- Maliński M (2004) Weryfikacja hipotez statystycznych wspomaganą komputerowo: Wydawnictwo Politechniki Śląskiej.
- Mazurek R, Józefowska A, Piotrowska A (2011) Influence of distance from Black Locust (*Robinia pseudoacacia*) shelterbelts on dehydrogenase activity in arable soils. *Ecological Chemistry and Engineering A*. 18(3): 385-390.
- Piotrowska A, Mazurek R (2007) Enzyme activities of carbon and nitrogen transformation in typical brown soil of Black Locust (*Robinia pseudoacacia* L.) influence area. *Humic Substances in the Ecosystems* 7: 111-115.
- Piotrowska A, Mazurek R (2009) Assessment of Black Locust (*Robinia pseudoacacia* L.) shelterbelt influence on enzymatic activity and some chemical parameters of Eutric Cambisol. *Polish Journal Soil Science* 42(1): 31-41.

- Russel S, Wyczółkowski AI, Bieganowski A (2006) Selected methodological aspects of soil enzyme activity tests. Institute of Agrophysics PAS.
- StatSoft (2006) Elektroniczny podręcznik statystyki PL. Kraków. WEB: <http://www.statsoft.pl/textbook/stathome.html>.
- Systematyka Gleb Polski (2011) Soil Science Annual 62 (3): 5-142.
- Walczak B (2008) Zawartość całkowita oraz form łatwo przyswajalnych niklu i kadmu w pyłach drogowych w Zielonej Górze. Zeszyty Naukowe Uniwersytetu Zielonogórskiego 133: 420-430.
- Zhen-Yi Y, Jian-Xin X, Li X, et.al (2013) Study on soil fertility of a Robinia pseudoacacia plantation in an abandoned iron tailing area in Huangshi. Journal of South China University 34(2): 219-223.
- Zimny H. (2005) Ekologia miasta. Agencja Reklamowo-Wydawnicza Arkadiusz Gregorczyk. Warszawa.
- Żarska B (2003) Ekologiczno-przestrzenne problem stref podmiejskich dużych miast na przykładzie Warszawy. Architektura Krajobrazu. Studia i Prezentacje: 1-2, 16-19.

17. Ryzobakterie promujące wzrost roślin (PGPR)

Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR)

Karolina Włodarczyk

Zakład Genetyki i Mikrobiologii, Wydział Biologii i Biotechnologii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

Opiekun naukowy: Monika Marek-Kozaczuk, Jerzy Wielbo

Karolina Włodarczyk: k.włodarczyk06@gmail.com

Słowa kluczowe: PGPR, rizobium, ryzosfera, bezpośrednie mechanizmy działania PGPR

Streszczenie

Gleba stanowi heterogenne środowisko, które jest doskonałym miejscem bytowania dla mikroorganizmów. Charakteryzuje się dużą bioróżnorodnością organizmów, których największe zagęszczenie przypada na ryzosferę, przestrzeń bezpośrednio stykającą się z korzeniami roślinnymi, gdzie ilość bakterii szacowana jest na około 10^{10} - 10^{12} CFU (Siebyła i in. 2017). Wśród mikroorganizmów zasiedlających ryzosferę, wyróżniana się ryzobakterie promujące wzrost roślin (PGPR), wykazujące właściwości stymulujące wzrost, zwiększające biomasę oraz poprawiające żywotność swoich gospodarzy roślinnych. Obecnie stanowią one ważny aspekt badań, gdyż dzięki różnym mechanizmom stymulujących wzrost roślin, mogą zostać wykorzystane jako alternatywa dla powszechnie wykorzystywanych w rolnictwie sztucznych nawozów oraz pestycydów.

1. Wstęp

Ryzosfera, to przestrzeń otaczająca system korzeniowy rośliny, który wywiera wpływ na właściwości biochemiczne ziemi. Stanowi strefę gleby, w której obserwuje się intensywnie zachodzące interakcje pomiędzy roślinami, jej częściami oraz mikroorganizmami bytującymi. Zachodzące w ryzosferze procesy charakteryzują się zarówno pozytywnym, negatywnym, a także neutralnym wpływem na wzrost, rozwój i wydajność uprawy roślin. Populacja mikroorganizmów bytujących w ryzosferze powszechnie uznawana jest za najliczniejszą, w porównaniu z mikroflorą innych środowisk. Wśród mikroorganizmów zasiedlających tę sferę gleby, pokazną grupę stanowi populacja bakterii zdolna do promocji wzrostu i rozwoju roślin, tzw. ryzobakterie promujące wzrost roślin (PGPR, ang. *plant growth promoting rhizobacteria*). PGPR stanowią 2-5% wszystkich ryzobakterii, a ich metabolizm może wywierać pozytywny wpływ na wzrost oraz rozwój roślin. Przyczyniają się do zwiększenia dostępności oraz pobierania przez system korzeniowy składników odżywczych znajdujących się w środowisku glebowym. PGPR wpływają także na wzmocnienie systemu odpornościowego roślin w odpowiedzi na czynniki zakaźne i chorobotwórcze, a także na wpływ czynników biotycznych i abiotycznych. Korzystny wpływ PGPR na rośliny przyczynia się do wzrostu wydajności upraw w zrównoważonym rolnictwie, leśnictwie, czy ogrodnictwie (Prasad i in. 2019).

Ważnym mediatorem wpływającym na interakcje ryzobakterii z roślinami stanowią wydzieliny korzeniowe. Roślina pobiera z ryzosfery składniki odżywcze oraz wodę, natomiast mikroorganizmy wykorzystują obecne w tej strefie gleby substancje odżywcze zawarte w wydzielinach roślinnych, takie jak: węglowodany, kwasy organiczne, witaminy, flawonoidy, enzymy, hormony, czy jony nieorganiczne (Tab. 1).

2. PGPR – ogólna charakterystyka

W 1981r. Klopper i Schroth wprowadzili termin – PGPR, który miał opisywać ryzobakterie, jako nieodłączną część mikrobioty ryzosfery, zdolną do stymulacji wzrostu i rozwoju roślin, a także przejawiającą zdolność podwyższenia odporności organizmu roślinnego na czynniki chorobotwórcze.

Obecnie, termin PGPR odnosi się do wszystkich bakterii bytujących w środowisku ryzosfery, które pozytywnie wpływają na wzrost i rozwój roślin (Bhattharyya i in. 2012; Prasad i in. 2019).

PGPR wykazują zdolność do aktywnej kolonizacji systemu korzeniowego gospodarza roślinnego, a przede wszystkim stymulują zarówno jego wzrost, rozwój oraz wpływają na wysokość plonów. Pomimo obecności konkurencyjnej mikroflory, ryzobakteria zaliczane do PGPR przejawiają zdolność do bytowania we wszystkich niszach ekologicznych korzeni, na kolejnych etapach rozwoju i dojrzwania roślin. PGPR ze względu na stopień powiązania z komórkami korzeni roślinnych zostały podzielone na dwie grupy:

- zewnątrzkomórkowe ryzobakteria promujące wzrost roślin (ePGPR, ang. *extracellular plant growth promoting rhizobacteria*)
- wewnątrzkomórkowe ryzobakteria promujące wzrost roślin (iPGPR, ang. *intracellular plant growth promoting rhizobacteria*).

Pierwsze z nich, ePGPR, występują przede wszystkim w ryzosferze, na zewnętrznej powierzchni włóśników korzeniowych (ryzoplana), a także w przestrzeni pomiędzy komórkami kory korzenia. Do tej grupy PGPR zaliczane są bakterie z rodzaju m.in. *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Caulobacter*, *Chromobacterium*. Natomiast iPGPR zlokalizowane są w wyspecjalizowanych strukturach korzeni, które powstają w wyniku interakcji symbiotycznej pomiędzy bakteriami i rośliną, tzw. brodawki korzeniowe. Przedstawicielami tej grupy PGPR są bakterie symbiotyczne z rodzaju *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium*, a także *Frankia*, które biorą udział w biologicznym wiązaniu azotu atmosferycznego (N₂) (BNF, ang. *biological nitrogen fixation*) (Tab. 2) (Bhattharyya i in. 2012; Gupta i in. 2015; Prasad i in. 2019).

Tab. 1. Komponenty wchodzące w skład wydzielin korzeniowych (Prasad i in. 2019).

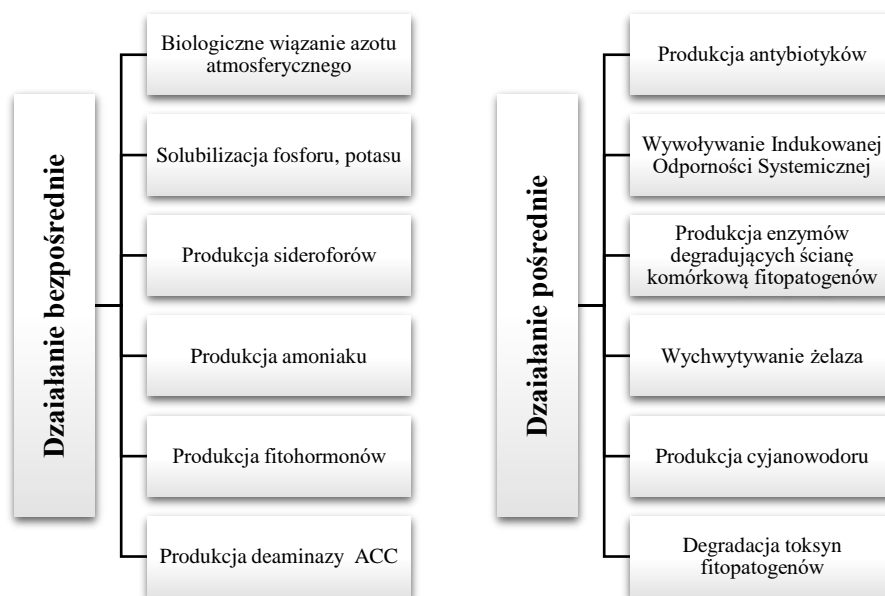
Związki wydzielane przez korzenie roślin	Przykłady
Kwasy organiczne	kwas cytrynowy, kwas szczawiowy, kwas jabłkowy, kwas fumarowy, kwas bursztynowy, kwas octowy, kwas masłowy, kwas salicynowy, kwas mrówkowy, kwas akonitowy, kwas mlekowy, kwas pirogronowy, kwas glutarowy, kwas malonowy, kwas aldonowy, kwas erytrobowy, kwas tetraenowy
Aminokwasy	α - i β -alanina, asparagina, cysteina, cystyna, glutamina, glicyna, izoleucyna, lizyna, metionina, seryna, treonina, prolina, walina, tryptofan, ornityna, histydyna, arginina, homoseryna, fenyloalanina, kwas γ -aminomasłowy, kwas α -aminoadypinowy
Węglowodany	glukoza, fruktoza, galaktoza, ryboza, ksyloza, ramnoza, arabinoza, deoksyryboza, rafinoza, maltoza
Witaminy	biotyna, tiamina, kwas pantotenowy, ryboflawina, niacyna
Enzymy	fosfatazy, inwertazy, amylazy, proteazy
Jony nieorganiczne	HCO ³⁻ , OH ⁻ , H ⁺
Cząsteczki gazowe	CO ₂ , H ₂
Nukleozydy	adenozyna, guanozyna, cytydyna, urydyna

Tab. 2. Przykłady bakterii reprezentujących ePGPR i iPGPR (Bhattharyya i Jha 2012; Gupta i in. 2015; Prasad i in. 2019).

ePGPR	iPGPR
<i>Agrobacterium, Arthrobacter, Azotobacter, Azospirillum, Bacillus, Burkholderia, Caulobacter, Chromobacterium, Erwinia, Flavobacterium, Micrococcus, Pseudomonas, Serratia</i>	<i>Allorhizobium, Azorhizobium, Bradyrhizobium, Mesorhizobium, Rhizobium, Frankia</i>

3. Mechanizm działania PGPR

Regulacja wzrostu, rozwoju oraz plonowania roślin przez bakterie klasyfikowane do PGPR, jest dobrze znanym zjawiskiem zachodzącym w przyrodzie. Wspomniana regulacja może zachodzić w dwojaki sposób: (1) bezpośrednio – wliczając w to ułatwianie pobierania zasobów substancji odżywczych z gleby oraz modulowanie poziomów hormonów roślinnych, (2) pośrednio – poprzez hamowanie różnych patogenów roślinnych, przyczyniających się do rozwoju chorób u roślin, prowadzących do ich śmierci (Rys. 1) (Pawlik i in. 2015; Ramakrishna i in. 2019).



Rys. 1. Mechanizmy działania PGPR (Pawlik i in. 2015; Ramakrishna i in. 2019).

3.1 Biologiczna redukcja azotu

Azot (N) należy do grupy pierwiastków biogennych. Jego obecność jest niezbędna do prawidłowego wzrostu i rozwoju organizmów. Wchodzi on w skład nukleotydów, błon lipidowych, czy aminokwasów budujących białka strukturalne i enzymatyczne (Prasad i in. 2019). Azot stanowi aż 78% składu atmosfery. Jednakże, pomimo ogromnych ilości w jakich występuje w środowisku naturalnym, azot cząsteczkowy (N_2) jest formą niedostępną dla roślin. Rośliny nie są w stanie samodzielnie go zredukować do form łatwo przyswajalnych, czyli jonów amonowych (NH_4^+) oraz jonów azotanowych (NO_3^-), a tym samym swobodnie wykorzystać w procesach wzrostowych. Azot atmosferyczny podlega konwersji do form dostępnych dla roślin w procesie zwanym biologicznym wiązaniem azotu (BNF, ang. *biological nitrogen fixation*). Globalna redukcja azotu cząsteczkowego w procesie BNF dostarcza od 100 do 290 Tg N/rok ($1Tg = 10^{12} g$), z czego około 50-70 Tg N/rok

pochodzi z upraw rolniczych (Stasiak i in. 2016). Przekształcenie azotu w amoniak (NH_3) możliwe jest jedynie przy udziale mikroorganizmów wytwarzających aktywny kompleks enzymatyczny – nitrogenazę. PGPR wykazują zdolność redukcji azotu atmosferycznego oraz przekształcania go w formę łatwo przyswajalną przez rośliny na drodze symbiotycznego lub niesymbiotycznego wiązania azotu. Pierwszy mechanizm, symbiotycznej asymilacji azotu, stanowi przykład mutualistycznego oddziaływania między mikroorganizmami, a roślinami. Początkowo dochodzi do absorpcji bakterii na powierzchni korzeni roślin. W kolejnych etapach symbiozy tworzone są specyficzne struktury, w których przebiega BNF, są to tzw. brodawki korzeniowe. Do PGPR zdolnych zredukować N_2 na drodze symbiotycznej, zalicza się m.in. bakterie z rodzaju *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Ensifer*, czy *Mesorhizobium*. Wszystkie powyższe mikroorganizmy zdolne są do wchodzenia w interakcje symbiotyczne z roślinami bobowatymi.

Niesymbiotyczne wiązanie azotu, przeprowadzane jest przez bakterie diazotroficzne, do których klasyfikuje się bakterie z rodzaju *Azoarcus*, *Azotobacter*, *Acetobacter*, *Azospirillum*, *Burkholderia*, *Diazotrophicus*, *Enterobacter*, *Gluconacetobacter*, *Pseudomonas*, jak i reprezentantów należących do cyjanobakterii (*Anabaena*, *Nostoc*) (Glick 2012; Gupta i in. 2015).

3.2 Produkcja sideroforów

Żelazo (Fe) jest jednym z mikroelementów niezbędnych do prawidłowego rozwoju wszystkich organizmów. Zaangażowany jest w wiele istotnych procesów metabolicznych m.in. w fotosyntezę, oddychanie. Pierwiastek ten jest czwartym pod względem występowania pierwiastkiem na Ziemi. Mimo to, przyswajanie żelaza stanowi duży problem dla bakterii i roślin. Jest to spowodowane występowaniem tego mikroelementu w środowisku w postaci jonów trójwartościowych (Fe^{3+}), które nie podlegają łatwej asymilacji, ze względu na słabą rozpuszczalność. Niektóre z mikroorganizmów wytworzyły mechanizm pozwalający im na chelatację jonów trójwartościowych (Fe^{3+}) przy udziale sideroforów (Gupta i in. 2015).

Siderofory (200 – 2000 Da) wytwarzane są przez wiele organizmów (od bakterii, przez grzyby, a także rośliny), w warunkach limitujących wychwyt żelaza z gleby, w celu zwiększenia przyswajalności tego mikroelementu. Ze względu na występowanie w cząsteczkach sideroforów różnych ugrupowań chemicznych zaangażowanych w wychwyt Fe, klasyfikuje się je do trzech rodzin: (1) katecholowe, (2) hydroksamowe, (3) karboksylowe. Do chwili obecnej odkryto nieco ponad 500 różnych typów sideroforów, a około 270 z nich zostało scharakteryzowanych pod względem strukturalnym. Wiele badań wykazuje, że PGPR zdolne do syntezy sideroforów, poprzez rozpuszczenie i chelatowanie żelaza z organicznych i nieorganicznych postaci, w znaczący sposób przyczyniają się do promowania wzrostu i rozwoju roślin. Badania przeprowadzone przez Yu i wsp. w 2011r. wykazały, że siderofory wytworzone przez szczep *Bacillus subtilis* wyizolowane z kłączy pieprzu, charakteryzują się aktywnością przeciwgrzybiczą (*Fusarium wilt*), a przede wszystkim promują wzrost gospodarza (Beneduzi i in. 2012; Singh i in. 2019).

3.3 Solubilizacja fosforu

Kluczowym makroelementem odgrywającym istotną rolę we wzroście i rozwoju roślin, zaraz po azocie jest fosfor (P). Bierze on udział w licznych procesach metabolicznych, do których zalicza się m.in. przemianę i uwalnianie energii, respirację, transdukcję sygnału, biosyntezę makromolekuł, fotosyntezę. W naturze duże ilości fosforu zmagazynowane są w postaci nierozpuszczalnych soli mineralnych, skał fosforanowych (fosforyty), fosforanie wapnia czy hydroksyapatycie. W glebie fosfor występuje w dwóch formach: organicznej i nieorganicznej. Rośliny nie są zdolne do korzystania ze znajdującego się w niej fosforu, gdyż około 95-99% tego pierwiastka występuje w jednej z trzech postaci: nierozpuszczalnej, zimmobilizowanej oraz wytrąconej. Rośliny posiadają zdolność asymilacji fosforu w postaci jonów jednozasadowych (H_2PO_4) i dwuzasadowych (HPO_4^{2-}). PGPR znajdujące się w ryzosferze wytworzyły trzy mechanizmy uwalniania fosforu. Do tych mechanizmów zaliczamy:

- uwalnianie składników kompleksujących lub rozpuszczalników mineralnych,
- wydzielanie do środowiska enzymów zewnątrzkomórkowych (biochemiczna mineralizacja fosforu),

- uwalnianie fosforu podczas degradacji substratu (biologiczna mineralizacja fosforu).

Do solubilizacji fosforu zdolne są mikroorganizmy określane terminem bakterii solubilizujących fosfor (PSB, ang. *phosphorus solubilizing bacteria*), do których zalicza się rodzaje *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, czy *Serratia*. PBS mogą być wykorzystywane jako alternatywna solubilizacja w zrównoważonym rolnictwie (Bhattacharyya i in. 2012; Gupta i in. 2015; Prasad i in. 2019).

3.4 Solubilizacja potasu

Potas (K) jest ważnym makroelementem wpływającym na aktywność enzymów, syntezę białek, czy też proces fotosyntezy. Stężenie tego pierwiastka w glebie utrzymuje się na znacząco niskim poziomie, a 90% potasu występuje w formie nierozpuszczalnych skał i krzemionek. Deficyty poziomu K u roślin przejawiają się m.in. słabo rozwiniętym systemem korzeniowym, produkcją małych nasion, powolnym wzrostem i plonowaniem.

PGPR wykazują zdolność solubilizacji potasu ze skał, poprzez zakwaszenie środowiska produkując i wydzielając kwasy organiczne. Bakterie takie jak *Acidithiobacillus*, *Bacillus edaphicus*, *Ferrooxidans*, *Pseudomonas*, *Burkholderia* oraz *Paenibacillus* są zdolne do uwalniania potasu ze skał potasowych, i konwertowania w postaci łatwo dostępne dla roślin (Gupta i in. 2015; Prasad i in. 2019).

3.5 Wytwarzanie cyjanowodoru

Niektóre z bakterii reprezentujących PGPR charakteryzują się zdolnością do syntezy cyjanowodoru (HCN). Związek ten jest powszechnie stosowany jako wskaźnik kontrolujący poziom toksyczności w systemach rolniczych. Z drugiej strony, HCN stosowany jest również jako związek chelatujący jony metali ciężkich, a także pośrednio uczestniczy w uwalnianiu fosforu do środowiska. PGPR zdolne do syntezy HCN mogą posłużyć jako bionawóz zwiększający produkcję, wzrost oraz plonowanie roślin uprawnych. Badania przeprowadzone na cyjanogennym szczepie *Pseudomonas fluorescence*, wykazały, iż odgrywa on potencjalną rolę w biokontroli, wzmacnianiu długości łodyg i korzeni, kiełkowaniu nasion ryżu, jęczmienia oraz pszenicy. Niektóre szczepy wytwarzające HCN mogą również syntetyzować amoniak (NH₃), a synergiczny efekt działania obu związków przyczynia się do regulacji metabolizmu organizmu roślinnego (Glick 2012; Singh i in. 2019).

3.6 Produkcja fitohormonów

Organizmy bytujące w ryzosferze posiadają zdolność produkcji i wydzielania hormonów roślinnych. Fitohormony to substancje organiczne, które mogą hamować, promować lub modyfikować wzrost i rozwój roślin już przy bardzo niskim stężeniu (<1mM). U PGPR wykazano zdolność do produkcji giberelin, auksyn, cytokin oraz etyleny (Kalitkiewicz i in. 2008; Prasad i in. 2019).

Wśród PGPR rozpowszechniona jest synteza auksyn, szczególnie kwasu indolilo-3-octowego (IAA, ang. *indole-3-acetic acid*). IAA oddziałuje na takie procesy roślinne jak: podział komórek, inicjację korzeni, foto- i geotropizm, stymulowanie nasion, biosyntezę różnych metabolitów, czy także odporność na warunki stresowe. Szacuje się, że około 80% ryzobakterii, które kolonizują nasiona i korzenie roślin, syntetyzuje egzogenny IAA, który wraz z endogennym odpowiednikiem, oddziałuje na proliferację komórek i wzrost wychwyty przez gospodarza roślinnego mineralnych składników zawartych w glebie. Głównym prekursorem w biosyntezie IAA, zachodzącej w komórkach bakterii, jest tryptofan pochodzący z wydzielin korzeniowych. Zdolność syntezy i wydzielania IAA przez ryzobakterie pozwala na detoksyfikację tryptofanu i jego analogów, co umożliwi ochronę komórek bakteryjnych przed jego szkodliwym wpływem. PGPR zdolne do syntezy i wydzielania IAA są reprezentowane przez szczepy *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Klebsiella* (Gupta i in. 2015; Prasad i in. 2019).

U przedstawicieli PGPR z rodzajów *Azotobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas* i wielu innych, wykazano zdolność do syntezy giberelin i cytokin, stymulujących podziały komórek roślinnych oraz kontrolujących rozwój systemu korzeniowego roślin. Gibereliny odpowiadają m.in. za przerywanie spoczynku nasion, kiełkowanie nasion, wzrost łodygi, rozwój kwiatostanu oraz stymulację wzrostu korzenia (Kalitkiewicz i in. 2008; Bhattacharyya i in. 2012; Glick 2012).

Etylen to kluczowy fitohormon o szerokim spektrum działania na roślinny. Odgrywa ważną rolę w wielu procesach m.in. inicjacji i inhibicji elongacji korzenia, promowaniu dojrzewania owoców, stymulowaniu spoczynku nasion, a także aktywuje syntezę innych hormonów roślinnych. W niskich stężeniach, etylen może wspomagać wzrost i plonowanie roślin, jednak jego wysokie stężenie prowadzi do indukcji defoliacji oraz innych procesów prowadzących do spadku plonów (Glick 2012; Dubois i in. 2018).

3.7 Deaminaza ACC

Jednym z ważniejszych mechanizmów wspomagających wzrost i rozwój roślin przez PGPR, jest produkcja deaminazy kwasu 1-aminocyklopropano-1-karboksyowego (deaminaza ACC). Enzym ten przekształca prekursor etylenu – kwas 1-aminocyklopropano-1-karboksyowy (ACC) do amoniaku (NH_3) i α -ketomaślanu, redukując w ten sposób poziom etylenu w tkankach roślinnych i wpływając na wzrost i rozwój roślin w warunkach stresu wywołanego czynnikiem biotycznym lub abiotycznym. Obniżenie poziomu etylenu z punktu gospodarza roślinnego, jest korzystnym mechanizmem, ponieważ wysoki poziom etylenu w tkankach roślinnych może prowadzić do hamowania wzrostu i rozwoju roślin, a w konsekwencji do śmierci. Deaminaza ACC stymuluje wzrost i rozwój roślin w dwojaki sposób. Po pierwsze, powstawanie amoniaku podczas reakcji przekształcania ACC, stanowi dodatkowe źródło łatwo przyswajalnego azotu dla roślin. Z kolei, hydroliza ACC prowadzi do obniżenia poziomu etylenu w tkankach roślinnych, co skutkuje uodpornieniem na warunki stresowe w środowisku (Kalitkiewicz i in. 2008; Saleem i in. 2007, Dubois i in. 2018).

3.8 Wywoływanie Indukowanej Odporności Systemicznej

Oddziaływania między bakteriami, a roślinami mogą prowadzić do infekcji tkanek roślinnych. W celu zapobiegania chorobom, PGPR wykazują możliwość wywoływania indukowanej odporności systemicznej (ISR, ang. *induced systemic resistance*) przeciwko szerokiemu spektrum patogenów. ISR definiowana jest jako fizjologiczny stan wzmocnionej zdolności obronnej wywołany odpowiedzią na określone czynniki środowiskowe. W indukowanej przez PGPR ISR, częstokami sygnałnymi jest kwas jasmonowy i etylen, których akumulacja w roślinie zwiększa odporność na czynniki chorobotwórcze, do których zalicza się m.in. lipopolisacharydy (LPS), substancje lotne (2,3-butanodiol), czy laktony homoseryny (Bent 2006; Bhattacharyya i in. 2012; Glick 2012; Gupta i in. 2015).

3.9 Produkcja enzymów litycznych

Stymulacja wzrostu rośliny przez szczepy zaliczane do PGPR wiąże się również ze zdolnością do syntezy, przez te mikroorganizmy, licznych enzymów takich jak chitynazy, dehydrogenazy, β -glukanazy, lipazy, fosfatazy, proteazy i wielu innych. Enzymy te umożliwiają eliminację fitopatogenów z ryzosfery, poprzez uszkodzenie ich ścian komórkowych. Dzięki tej aktywności, PGPR odgrywają znaczącą rolę w promowaniu wzrostu i rozwoju roślin, szczególnie ochronie przed niekorzystnymi czynnikami biotycznymi np. patogennymi grzybami (*Botrytis cinera*, *Fusarium oxysporum*, *Pythium ultimum*) (Gupta i in. 2015).

4. Podsumowanie

Powszechnie stosowane sztuczne nawozy oraz pestycydy mające na celu poprawę upraw rolniczych, przyczyniają się do zubożenia środowiska glebowego, a co za tym idzie, pogorszenia warunków uprawnych i zubożenia zbiorów. Liczne badania wskazują, że bakterie ryzosferowe należące do PGPR, dzięki wykazywaniu licznych mechanizmów oddziałujących na rośliny, mogą stanowić alternatywną metodę bionawożenia upraw. Poprzez poprawę warunków glebowych (zwiększenie dostępności źródeł P i K, dostęp do łatwo przyswajalnych źródeł N, zwiększeniu odporności przeciwko patogenom) PGPR mogą znacząco wpływać zarówno na wzrost, rozwój, jak plonowanie roślin uprawnych. Należy mieć na uwadze, że opisane wyżej mechanizmy charakteryzują się synergistycznym działaniem, które jest częścią prawidłowej interakcji symbiotycznej między PGPR a ich gospodarzami roślinnymi. Obecnie bionawozy stają się coraz

częściej wybieraną naturalną metodą wspomaganie upraw przez rolników w zrównoważonym rolnictwie, leśnictwie czy ogrodnictwie.

5. Literatura

- Beneduzi A, Ambrosini A, Passaglia LMP (2012) Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Their potential as antagonist and biocontrol agents. *Genetics and Molecular Biology* 35: 1044-1051.
- Bent E (2006) Induced systemic resistance mediated by plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and fungi (PGPF). *Multigenic and Induced Systemic Resistance in Plants*. ISBN 9780387232669.
- Bhattacharyya PN, Jha DK (2012) Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 28: 1327-1350.
- Dubois M, Van den Broeck L, Inze D (2018) The pivotal role of ethylene in plant growth. *Trends in Plant Science* 23: 311-323.
- Glick BR (2012) Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. *Scientifica* ID 963401.
- Gupta G, Parihar SS, Ahirnar N, i in. (2015) Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): current and future prospects for development of sustainable agriculture. *Journal of Microbial and Biochemical Technology* 7: 96-102.
- Kalitkiewicz A, Kępczyńska E (2008) Wykorzystanie ryzobakterii do stymulacji wzrostu roślin. *Biotechnologia* 2: 102-114.
- Kloepper JW, Schroth MN (1981) Relationship of in vitro antibiosis of plant growth promoting rhizobacteria to plant growth and the displacement of root microflora. *Phytopathology* 71: 1020-1024.
- Pawlik M, Płociniczak T, Piotrowska-Seget Z (2015) Bakterie endofityczne i ich znaczenie w mikrobiologii środowiskowej, medycynie i przemyśle. *Postępy Mikrobiologii* 54: 115-122.
- Prasad M, Srinivasan R, Chandhary M, i in. (2019) Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) for sustainable agriculture: perspectives and challenges. *PGPR Amelioration in Sustainable Agriculture – Chapter 7*, ISBN 9780128158791.
- Ramakrishna W, Yadav R, Li K (2019) Plant growth promoting bacteria in agriculture: two sides of a coin. *Applied Soil Ecology* 138: 10-18.
- Saleem M, Arshad M, Hussain S, i in. (2007) Perspective of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) containing ACC deaminase in stress agriculture. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 34: 635-648.
- Siebyła M, Hilszczańska D (2017) Różnorodność biologiczna i rola bakterii glebowych w środowisku leśnym. *Sylvan* 161: 155-162.
- Singh M, Singh D, Gupta A, i in. (2019) Plant growth promoting rhizobacteria: Application in biofertilizers and biocontrol of phytopathogens. *PGPR Amelioration in Sustainable Agriculture – Chapter 3*, ISBN 9780128158791.
- Stasiak G, Mazur A, Koper P, i in. (2016) Symbioza rizobiów z roślinami bobowatymi (Fabaceae). *Postępy Mikrobiologii* 55: 289-299.
- Yu H, Ai C, Xin L, i in. (2011) The siderophore-producing bacterium, *Bacillus subtilis* CAS15, has a biocontrol effect on *Fusarium* wilt and promotes the growth of pepper. *European Journal of Soil Biology* 47: 138-145.

18. Interakcja symbiotyczna pomiędzy roślinami bobowatymi (Fabaceae), a bakteriami z rodziny *Rhizobiaceae*

The symbiosis relationships between legumes and rhizobium bacteria

Karolina Włodarczyk

Zakład Genetyki i Mikrobiologii, Wydział Biologii i Biotechnologii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

Opiekun naukowy: Monika Marek-Kozaczuk, Jerzy Wielbo

Karolina Włodarczyk: k.wlodarczyk06@gmail.com

Słowa kluczowe: symbioza, rośliny bobowate (Fabaceae), rizobium, czynniki Nod, flawonoidy

Streszczenie

Azot (N) to jeden z najważniejszych pierwiastków niezbędnych do prawidłowego wzrostu i rozwoju roślin. Pomimo jego ogromnych ilości w środowisku naturalnym, nie jest on dostępny dla organizmów roślinnych. Biologiczna redukcja azotu atmosferycznego (N₂) przez bakterie glebowe z rodziny *Rhizobiaceae*, dostarcza łatwo przyswajalnych przez tkanki roślinne form azotu. Możliwe jest to dzięki interakcji symbiotycznej między kompatybilnymi partnerami, roślinami bobowatymi (Fabaceae) oraz bakteriami glebowymi (*Rhizobiaceae*). Jednakże, do prawidłowego przebiegu procesu symbiotycznego, konieczne jest wzajemne rozpoznanie organizmów symbiotycznych. Zajście procesu możliwe jest dzięki wydzielanym przez korzenie roślinne – flawonoidom, a także bakteryjnym czynnikom Nod, które produkowane są w odpowiedzi na sygnał roślinny. Efektywna symbioza może umożliwić wzrost roślin, hodowanych na glebach ubogich w azot, a tym samym wpłynąć pozytywnie na wzrost i plonowanie roślin uprawnych bez konieczności stosowania sztucznych nawozów czy pestycydów.

1. Wstęp

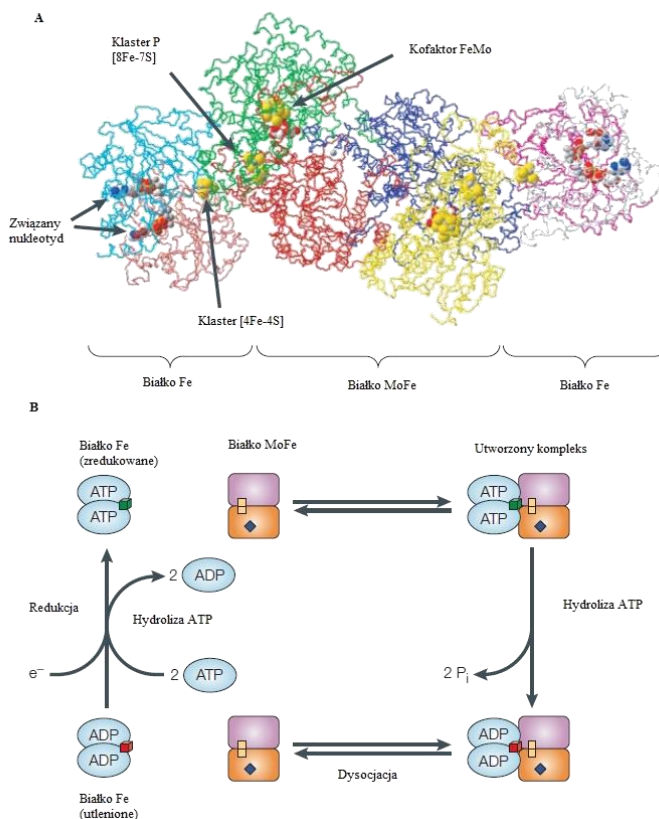
Azot (N) jest jednym z pierwiastków biogennych (obok wodoru – H, węgla – C, tlenu – O, fosforu – P, siarki – S), który stanowi element budujący nukleotydy, białka, jak również lipidy wchodzące w skład błon komórkowych. Pomimo powszechnego występowania w środowisku naturalnym, w atmosferze stanowi prawie 80% jej składu, azot atmosferyczny (N₂) nie jest łatwo przyswajalną formą, przez organizmy roślinne. Z pomocą roślinom przychodzi proces biologicznego wiązania azotu (BNF, ang. *biological nitrogen fixation*), który polega na konwersji azotu atmosferycznego (N₂) do postaci łatwo przyswajalnych przez tkanki roślinne, czyli jonów amonowych (NH₄⁺). BNF przeprowadzają bakterie zdolne do redukcji azotu, bakterie wolno żyjące - diazotrofy oraz wchodzące w układy symbiotyczne z roślinami bobowatymi - rizobia. Warunkiem koniecznym do zajścia procesu wiązania azotu jest synteza aktywnego kompleksu enzymatycznego, nitrogenazy. BNF stanowi ważne ogniwo w zachowaniu równowagi między ilością azotu atmosferycznego, a jonami amonowymi (NH₄⁺) w środowisku (Dixon i in. 2004). Uważa się, że dzięki procesowi BNF, dostarczane jest blisko 200 mln ton azotu rocznie do jego globalnego obiegu (Martyniuk 2008). Stechiometrycznie równanie biologicznego wiązania azotu (BNF) przedstawia się następująco:



Kompleks enzymatyczny nitrogenazy to metaloenzym umożliwiający proces aktywacji i biologicznego wiązania azotu atmosferycznego (N₂). Należy do dwukomponentowych systemów, na który składają się dwie współpracujące ze sobą metaloproteiny: 1) reduktaza dinitrogenazowa (białko żelazowe, Fe) oraz 2) dinitrogenaza (białko molibdenowo-żelazowe, MoFe) (Rys. 1) (Dixon i in. 2004).

Reduktaza dinitrogenazowa (białko Fe) kodowana jest przez gen *nifH*. Występuje w formie dimerycznej, na którą składają się dwie identyczne γ -podjednostki, o łącznej masie cząsteczkowej

wynoszącej 30-72 kDa. Monomery połączone są ugrupowaniem 4Fe-4S, a także posiadają dwa miejsca umożliwiające związanie MgATP. Drugą komponentę stanowi dinitrogenaza (białko MoFe), która jako heterotetramer kodowany przez geny *nifD* i *nifK*, zbudowana jest z dwóch α - i β -podjednostek, tworzących układ $\alpha_2\beta_2$. Masa cząsteczkowa dinitrogenazy wynosi 180-240 kDa. Enzym ten charakteryzuje się specyficnością gatunkową oraz posiada w swojej budowie miejsce redukujące azot atmosferyczny (N_2). Centrum aktywne zbudowane jest z dwóch rodzajów klastrów metalosiarkowych: 1) klaster P – stanowi go kompleks 8Fe-7S, w którym żelazo za pomocą sześciu wiązań kowalencyjnych łączy się z resztami cysteinowymi nitrogenazy oraz 2) kofaktor FeMo – klaster w postaci 1Mo-7Fe-9S-homocytrynianu. Kompleks nitrogenazy jest niezwykle wrażliwy na działanie tlenu (O_2), ponieważ nawet jego śladowe ilości powodują nieodwracalne uszkodzenie enzymu (Dixon i in. 2004; Łyszcz i in. 2016).



Rys. 1. A. Nitrogenaza – struktura kompleksu enzymatycznego B. Schemat cyklu białka żelazowego nitrogenazy (opracowanie na podstawie Dixon i in. 2004).

Mechanizm działania nitrogenazy wymaga redukcji białka Fe przez donory elektronów jakimi są związki: ferrodoksyna (Fd) i flawodoksyna (Fld). Otrzymane przez reduktazę dinitrogenazy elektrony, uczestniczą w tworzeniu kompleksu wraz z dwoma jonami magnezu ($2Mg^{2+}$) i ATP. Kolejno kompleks ten ulega połączeniu z dinitrogenazą, a elektrony redukują białko MoFe, i transportowane są począwszy od klastru P do kofaktora FeMo. Redukcja dinitrogenazy sprzężona jest z hydrolizą MgATP (Dixon i in. 2004; Łyszcz i in. 2016; Martyniuk 2008).

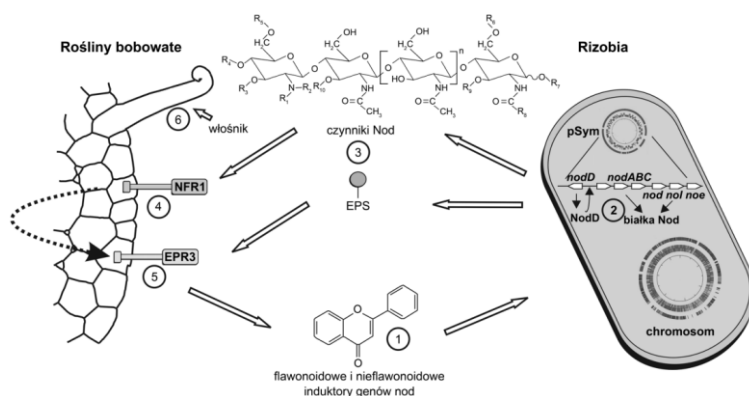
2. Układ symbiotyczny rizobia – rośliny bobowate

Rizobia stanowią heterogenną grupę bakterii glebowych na ziemi. Pod względem taksonomicznym, należą do klasy α -Proteobakterii, obejmującej takie rodzaje jak: *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizorium* (*Ensifer*), *Bradyrhizobium*, *Burkholderia*, *Phyllobacterium*,

Microvirga, *Azorhizobium*, *Ochrobacterium*, *Methylobacterium*, *Cupriavidus*, *Devosia* czy *Shinella* (Maj i in. 2010; Stasiak i in. 2016; www.rhizobia.co.nz). Rizobia charakteryzują się dużą tolerancją metaboliczną, która pozwala im na przystosowanie się do panujących warunków środowiskowych. Bakterie te mogą występować w glebie, jako wolno żyjące lub wchodzić w układy symbiotyczne z roślinami. W wyniku interakcji z roślinami bobowatymi dochodzi do wytworzenia na korzeniach roślin specyficznych struktur roślinnych – brodawek korzeniowych, wewnątrz których zachodzi proces biologicznej asymilacji azotu atmosferycznego (N₂) (BNF) (Maj i in. 2010; Stasiak i in. 2016; Poole i in. 2018).

Do przeprowadzenia efektywnej symbiozy wymagana jest obecność dwóch kompatybilnych organizmów, pierwszy stanowią bakterie symbiotyczne, natomiast drugim partnerem są rośliny bobowate (Fabaceae). Rośliny te reprezentują liczną rodzinę roślin okrytozalążkowych, charakteryzującą się rozległym występowaniem (od strefy klimatu umiarkowanego do tropikalnego). Bobowate mają istotne znaczenie gospodarcze, ze względu na fakt, że wielu przedstawicieli tej rodziny to rośliny uprawne stanowiące źródło pożywienia dla ludzi oraz zwierząt (Jasiński i in. 2009). Zdolność do wchodzenia w interakcje symbiotyczne z Gram-ujemnymi bakteriami glebowymi dostarcza im wielu korzyści. Przede wszystkim, rizobia wiążące w tym układzie azot atmosferyczny (N₂) przekształcają go do formy łatwo przyswajalnej dla roślin - jonów amonowych (NH₄⁺). Proces ten wpływa pozytywnie na wzrost, rozwój oraz plonowanie gospodarza roślinnego (Janczarek i in. 2014; Stasiak i in. 2016; Poole i in. 2018).

Interakcja między rizobiami – roślinami bobowatymi stanowi złożony, ściśle kontrolowany, wieloetapowy proces, który obejmuje m.in. wymianę i odbiór sygnałów molekularnych, zróżnicowanie morfologiczne komórek korzenia, jak również dostosowanie metabolizmów partnerów symbiotycznych (Rys. 2) (Stasiak i in. 2016).



Rys. 2. Etap inicjacji procesu symbiozy rizobium – rośliny bobowate. Objasnienia: 1 – Aktywacja ekspresji genów *nod* poprzez flawonoidowe i nieflawonoidowe induktory, 2 – Synteza czynników Nod (NF), 3 – Czynnik Nod i EPS (egzopolisacharyd) poprzez receptory NFR1 i EPR3 (4 i 5) inicjują kaskadę sygnałową prowadzącą do (6) powstania zagięcia włosników korzeniowych (Stasiak i in. 2016).

Pierwszy etap konieczny do zajęcia efektywnej symbiozy to wzajemne rozpoznanie kompatybilnych biologicznie partnerów. Jest to możliwe dzięki cząstkom sygnałowym, które syntetyzowane i wydzielane są zarówno przez gospodarza roślinnego – m.in. flawonoidy, jak również produkowane są przez rizobia – czynniki Nod. W rozpoznaniu znaczącą rolę odgrywają także struktury powierzchniowe bakterii, m.in. egzopolisacharyd (EPS), kapsularne polisacharydy (CPS), β-glukany, oraz lipopolisacharyd (LPS) (Stasiak i in. 2016). Dzięki wzajemnemu rozpoznaniu partnerów symbiozy, dochodzi do adsorpcji bakterii na powierzchni włosników korzeniowych rośliny. Proces ten przebiega w dwóch etapach. W pierwszym etapie dochodzi do specyficznej, jak i niespecyficznej adhezji bakterii zależnej od stężenia wapnia (Ca²⁺) obecnego w środowisku reakcji. W drugim etapie rozwoju symbiozy zachodzi adhezja specyficzna dla danego gatunku rośliny,

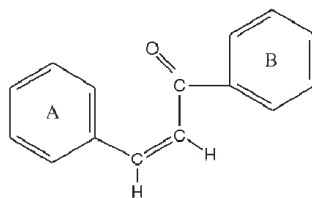
bakterii. W procesie tym uczestniczą produkty genów *nod* i genów specyficzności gospodarza, tzw. *hsn* (ang. *hist specific nodulation*), dzięki którym proces przebiega poprawnie. EPS, LPS, CPS ułatwiają adhezję bakterii symbiotycznych do powierzchni włóśników rośliny. W wyniku adsorpcji bakterii na włóśniach oraz działania czynników Nod, dochodzi do deformacji włóśników korzeniowych i utworzenia struktury zwanej „laską pasterza” (ang. *shepherd's cook*). Spowodowane jest to napłynięciem wapnia do wnętrza komórek korzenia, skutkującym depolaryzacją błony komórkowej. Zachodząca zmiana w budowie cytoszkieletu oraz powstanie nici preinfekcyjnej, przyczynia się do zmiany panujących warunków środowiskowych, które umożliwiają dalszą infekcję tkanek roślinnych przez bakterie (Stasiak i in. 2016). Kolejnym etapem symbiozy jest formowanie się nici infekcyjnej (IT, ang. *infection thread*). Spowodowane jest to miejscowym namnożeniem się bakterii, produkcją czynników Nod, a także hydrolizą ściany komórkowej. Nic infekcyjna, pochodzenia roślinnego, przypomina swoją budową rurkę wypełnioną dzielącymi się bakteriami. Jej rozwój początkowo odbywa się w miejscu infekcji włóśnika, a następnie przechodzi wzdłuż kolejnych warstw komórek kory korzenia. W ten sposób możliwe jest uwolnienie bakterii do zawiązka brodawki – primordium (Skorupska i in. 2010; Stasiak i in. 2016). Następnie bakterie uwalniane są z nici infekcyjnej, przekształcają się w wiążące azot bakteroidy i otoczone są błoną peribakteroidalną, pochodzenia roślinnego, tworzą strukturę zwaną symbiosomem. Widocznym objawem prawidłowego zajścia tego procesu jest formowanie funkcjonalnej brodawki korzeniowej (Gage 2004; Skorupska i in. 2010; Wielbo i in. 2003; Stasiak i in. 2016).

2.1 Flawonoidy

Flawonoidy to grupa niskocząsteczkowych związków, stanowiące metabolity wtórne syntetyzowane i wydzielane przez szeroką gamę roślin (od roślin zarodnikowych, naczyniowych, poprzez glony oraz mchy). Związki te pełnią różnorodne funkcje w organizmie roślinnym. Po pierwsze, determinują barwę kwiatów (żółtą, czerwoną, niebieską, fioletową), zapach, oraz smak owoców. Dzięki ich akumulacji w organach roślinnych (pylniki, słupki) uczestniczą w rozwoju i otwieraniu się pąków kwiatowych. Stanowią także naturalne repelenty odstrasżające drapieżniki m.in. zwierzęta roślinożerne. Wykazują właściwości toksyczne w stosunku do szkodników, patogennych bakterii czy grzybów. Chronią rośliny przed infekcjami działając ochronnie przeciwko infekcjom roślinnym. Biorą udział w interakcjach alleopatycznych między różnymi osobnikami roślinnymi. Flawonoidy to także fitoaleksyny, pełniące funkcję obronną przed czynnikami patogennymi. Związki te, chronią rośliny także przed szkodliwym działaniem promieniowania UV, gdyż w swojej budowie flawonoidy posiadają układ chromoforowy (pierścień aromatyczny wraz z sprzężonymi wiązaniami podwójnymi). Przyczynia się to do zmniejszenia docierającej do roślin, ilości promieniowania zarówno UV-A, jak i UV-B. Chronią w ten sposób rośliny przed oksydacyjnymi uszkodzeniami organelli roślinnych. Stwierdzono także, że posiadają właściwości ochronne przed powstającymi reaktywnymi formami tlenu (ROS, ang. *reactive oxygen species*), tj. tlenem singletowym ($^1\text{O}_2$), rodnikiem hydroksylowym (HO^\bullet), czy anionorodnikiem ponadtlenkowym ($\text{O}_2^{\bullet-}$). Mechanizm działania flawonoidów opiera się na neutralizowaniu ROS poprzez indukcję enzymów – dysmutazy ponadtlenkowej i peroksydazy oraz chelatowaniu jonów metali. Flawonoidy wraz z białkami transportowymi oraz nośnikowymi uczestniczą w polarnym transporcie auksyn (PAT, ang. *polar auxin transport*) (Jasiński i in. 2009; Janczarek i in. 2014; Liu i in. 2016).

Podstawowy szkielet flawonoidów zbudowany jest z połączenia dwóch pierścieni aromatycznych poprzez mostek, w wyniku którego tworzy się charakterystyczny układ: C6-C3-C6 (Rys. 3). Biosynteza flawonoidów jest złożonym procesem. Prekursory tych związków podlegają licznym przemianom na drodze dwóch szlaków: 1) w szlaku kwasu malonowego – w którym produktem końcowym jest malonylo-CoA, 2) w szlaku kwasu szikimowego – w którym powstały erytrozo-4-fosforan oraz fosfoenolopirogronian zostają przekształcone w kwas szikimowy, który w dalszych etapach ulega konwersji do aminokwasów – tyrozyny (Tyr) i fenyloalaniny (Phe). Następnie powstałe aminokwasy aromatyczne zostają przekształcone w kwas cyanomonowy, który z kolei poprzez kwas p-kumarowy, ulega konwersji do p-kumaroilo-CoA. W kolejnym etapie ma miejsce cyklizacja p-kumaroilo-CoA do chalkonu pod wpływem działania enzymu – syntazy

chalkonowej. Jednakże, chalkon będąc nietrwałym związkiem, ulega przekształceniu do flawanu, a ten z kolei może ulec dalszym modyfikacjom enzymatycznym (Jasiński i in. 2009).

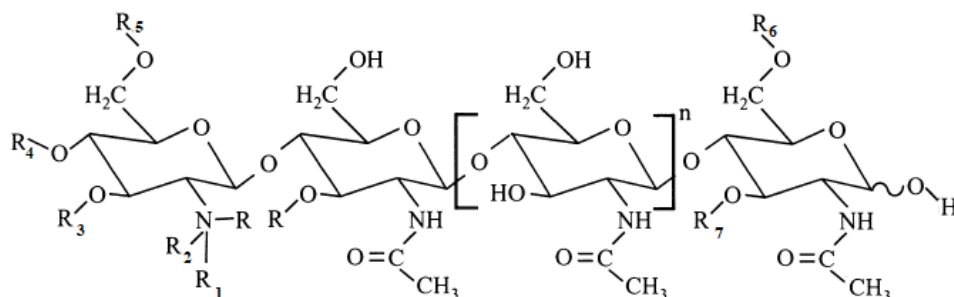


Rys. 3. Podstawowa struktura flawonoidów (Jasiński i in. 2009).

Do dziś poznano ponad 10 000 flawonoidów, a ich liczba stale rośnie. Ze względu na indywidualne modyfikacje podstawowej struktury wyróżnia się kilka klas tych związków: flawony, flawonole, flawanony, flawanole, izoflawony, antocyjany, chalkony. Szkielet flawonoidów może ulegać modyfikacjom chemicznym, wśród których wyróżnia się m.in. glikozylację, metylację, hydroksylację, czy polimeryzację. Obecność różnych podstawników prowadzi do zmian związanych z ilością oraz rodzajem produktów końcowych, jak również ich funkcją, lotnością, czy procesem degradacji (Janczarek i in. 2014).

2.2 Czynniki Nod

Czynniki Nod (NF, ang. *nodulation factors*) są to lipochitoooligosacharydy (LCO), które będąc produktami bakterii glebowych, uczestniczą w zainicjowaniu procesu symbiozy z roślinami bobowatymi. Szkielet NF zbudowany jest z oligosacharydowego rdzenia, który tworzą jednostki N-acetylo-D-glukozaminy (od dwóch do sześciu podjednostek) połączone wiązaniem β -1,4-glikozydowym. Do nieredukującego końca szkieletu dołączane są cząsteczki wielonienasyconych i długołańcuchowych kwasów tłuszczowych, oraz inne podstawniki (np. wodór, grupa metylowa, grupa karbamoilowa, grupa acetylowa) (Rys. 4). Czynniki Nod syntetyzowane i wydzielane przez różne szczepy bakterii glebowych, jak również przez jeden szczep bakteryjny, mogą wykazywać różnice na poziomie strukturalnym. Wynika to z modyfikacji strukturalnych w rdzeniu LCO, które dotyczą: 1) liczby oraz typu podstawników, 2) stopnia polimeryzacji rdzenia, jak i 3) rodzaju długołańcuchowych kwasów tłuszczowych przyłączonych do nieredukującego końca rdzenia (Gage 2004; Janczarek i in. 2014).

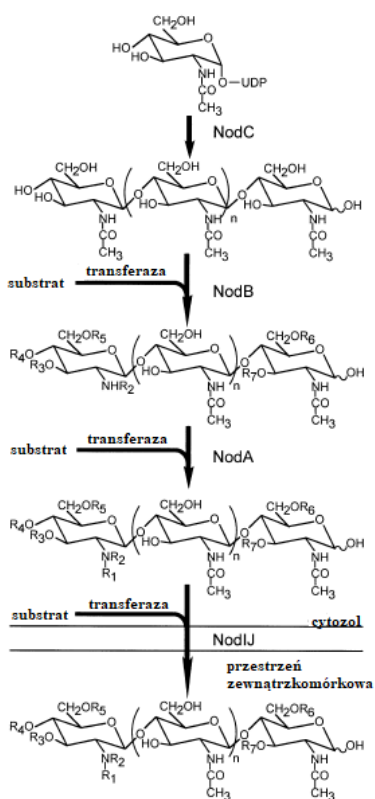


Rys. 4. Schematyczna struktura czynników Nod. Objaśnienia: R₁ – kwas tłuszczowy, R₂ – wodór lub grupa metylowa, R₃ – wodór lub grupa karbamoilowa, R₄ – wodór lub grupa karbamoilowa, R₅ – wodór, grupa karbamoilowa lub grupa acetylowa, R₆ – wodór, monosacharyd, grupa acetylowa lub grupa siarczanowa, R₇ – wodór lub monosacharyd, n – 3-6 (opracowanie na podstawie Janczarek i in. 2014).

Czynniki Nod kodowane są przez zespół genów *nodABC*, które występują w genomie wszystkich bakterii z rodziny *Rhizobiaceae*, zdolnych do wytworzenia specyficznych struktur na korzeniach roślinnych – brodawek. Mutacja w tych genach, może zahamować syntezę czynników Nod. Ekspresja genów *nodABC* rozpoczyna się od zsyntetyzowania chitynowego rdzenia (LCO).

Pierwszym enzymem biorącym udział w biosyntezie jest N-acetylglukozaminotransferaza (kodowana przez gen *nodC*), który uczestniczy w powstawaniu chitooligosacharydu z wykorzystaniem substratu jakim jest UDP-N-acetylglukozamina. Nieredukujący koniec szkieletu oligosacharydowego zostaje poddany deacetylacji przy udziale enzymu N-deacetylazy (kodowanej przez gen *nodB*), następnie ulegając N-acetylowaniu w obecności enzymu N-acylotransferazy (kodowanej przez gen *nodA*). Zachodzące modyfikacje zarówno redukującego, jak i nieredukującego końca rdzenia LCO są specyficzne gatunkowo, zależne od genów kodujących transferazy wprowadzające substytucje, oraz od enzymów syntetyzujących prekursorsy wykorzystywane przez transferazy (Rys. 5). Rizobia w swoim genomie posiadają również geny *nodII*, których produkty ekspresji należą do rodziny transporterów ABC, a ich zadaniem jest wydzielanie zsyntetyzowanych czynników Nod do przestrzeni zewnątrzkomórkowej. Zaobserwowano, iż mutacje w genach *nodII* nie hamują poziomu sekrecji NF, a jedynie zmniejszają jej poziom. Może to wskazywać na istnienie alternatywnego systemu uwalniania czynników (Mergaert i in. 1997; Janczarek i in. 2014).

Syntetyzowane i wydzielane przez korzenie roślinne flawonoidy, stymulują ekspresję bakteryjnych genów *nod*. Na wczesnym etapie rozwoju symbiozy, czynniki Nod wywołują szereg zmian rozwojowych u gospodarza roślinnego m.in. depolaryzację błony komórkowej, przyczyniają się do skręcania włókników korzeniowych, wpływają na zmiany poziomu wewnątrzkomórkowego wapnia (Ca^{2+}), oraz uczestniczą w inicjacji podziałów komórek korzenia, które przyczyniają się do formowania merystemu brodawki korzeniowej (Sujkowska 2009).



Rys. 5. Biosynteza czynników Nod. Produkty genów *nodA*, *nodB* i *nodC* uczestniczą w syntezie szkieletu głównego czynnika Nod. Modyfikacje struktury chemicznej NF warunkują swoistość zakażenia. W zależności od szczepu rizobium, szlak ten może ulegać przedłużeniu oraz modyfikacjom katalizowanym przez transferazy (opracowanie na podstawie Mergaert i in. 1997).

3. Podsumowanie

Dzięki oddziaływaniom symbiotycznym między roślinami bobowatymi (Fabaceae) a rizobiami (m.in. *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*), możliwe jest uniknięcie przez rośliny tzw. „głodu azotowego” spowodowanego brakiem przyswajalnych form azotu (N). Przeprowadzany przez bakterie proces biologicznego wiązania azotu atmosferycznego (BNF) dostarcza roślinom łatwo dostępnej jego formy - amoniaku (NH₃). Poznanie mikrosymbiontów uczestniczących w układach symbiotycznych z gatunkami roślin uprawnych, przyczynia się do stworzenia naturalnych bionawozów wspomagających wzrost oraz plonowanie roślin co ma istotne znaczenie dla rolnictwa, ochrony środowiska i gospodarki. W konsekwencji, możliwe jest zmniejszenie ilości stosowanych na szeroką skalę nawozów sztucznych oraz pestycydów, które przyczyniają się do zubożenia środowiska naturalnego. Mikroorganizmy zidentyfikowane w oparciu o proces symbiozy, mogą posłużyć do stworzenia biopreparatu wspomagającego ochronę i reintrodukcję roślin zagrożonych wyginieciem.

4. Literatura

- Dixon R, Kahr D (2004) Genetic regulation of biological nitrogen fixation. *Nature Reviews Microbiology* 2: 621-631.
- Janczarek M, Rachwał K, Marzec A, i in. (2014) Signal molecules and cell-surface components involved in early stages of the legume-rhizobium interactions. *Applied Soil Ecology* 85: 94-113.
- Jasiński M, Mazurkiewicz E, Rodziewicz P, i in. (2009) Flawonoidy – budowa, właściwości i funkcja ze szczególnym uwzględnieniem roślin motylkowatych. *Biotechnologia* 2: 81-94.
- Liu ChW, Murray JD (2016) The role of flavonoids in nodulation host-range specificity: an update. *Plants* 5: 1-13.
- Martyniuk S (2008) The importance of biological fixation of atmospheric nitrogen in ecological agriculture. *Journal of Research and Application in Agricultural Engineering* 53: 9-14.
- Łyszcz M, Gałązka A (2016) Proces biologicznego wiązania azotu atmosferycznego. *Studia i raporty IUNG-PIB* 49: 59-70.
- Gage DJ (2004) Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing Rhizobia during nodulation of temperate legumes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 68: 280-300.
- Mergaert P, Van Montagu M, Holsters M (1997) Molecular mechanisms of Nod factor diversity. *Molecular Microbiology* 25: 811-817.
- Sujkowska M (2009) Przebieg procesu infekcji w układzie symbiotycznym rośliny motylkowate-Rhizobium. *Wiadomości Botaniczne* 53: 35-53.
- Maj D, Wielbo J, Marek-Kozaczuk M, i in. (2010) Response to flavonoids as a factor influencing competitiveness and symbiotic activity of *Rhizobium leguminosarum*. *Microbiological Research* 165: 50-60.
- Poole P, Ramachandran V, Terpolili J (2018) Rhizobia: from saprophytes to endosymbionts. *Nature Review Microbiology* doi:10.1038/nrmicro.2017.171.
- Wielbo J, Skorupska A (2003) Ewolucja układu symbiotycznego Rhizobium – rośliny motylkowate. *Postępy Mikrobiologiczne* 43: 263-283.
www.rhizobia.co.nz/taxonomy/rhizobia
- Skorupska A, Wielbo J, Kidaj D, i in. (2010) Enhancing Rhizobium – legume symbiosis using signaling factors. *Microbes for Legume Improvement*. Springer-Verlag 27-54.