

Badania i Rozwój Młodych Naukowców w Polsce

Nauki przyrodnicze

Część I – Fauna i flora



www.mlodzinaukowcy.com

Poznań 2019

Redakcja naukowa

dr inż. Marcin Baran, IOR-PIB

dr inż. Jędrzej Nyckowiak, UPP

Wydawca

Młodzi Naukowcy

www.mlodzinaukowcy.com

wydawnictwo@mlodzinaukowcy.com

ISBN (całość 978-83-66139-18-3)

ISBN (wydanie online 978-83-66392-01-4)

ISBN (wydanie drukowane 978-83-66392-02-1)

Ilość znaków w książce: 453 tys.

Ilość arkuszy wydawniczych: 11.3

Data wydania: kwiecień 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.	Wpływ niedoboru wody oraz wybranych właściwości gleby na plon jęczmienia jarego	7
	<i>Beata Bartosiewicz</i>	
2.	Pomiar krzywej indukcji fluorescencji chlorofilu <i>a</i> w badaniach stanu fizjologicznego roślin	13
	<i>Borkowska Izabela, Hanaka Agnieszka, Wójcik Małgorzata</i>	
3.	Wpływ stężenia i rodzaju cukru na namnażanie <i>Echinacea purpurea</i>	20
	<i>Czerwińska Katarzyna, Madusiok Margareta, Krupa-Mańkiewicz Marcelina</i>	
4.	Wpływ sposobu aplikowania preparatu Actisil na jakość owoców borówki wysokiej (<i>Vaccinium corymbosum</i> L.)	27
	<i>Monika Figiel-Kroczyńska, Ireneusz Ochmian</i>	
5.	Wpływ zakwaszania gleby na jej odczyn i zasolenie oraz jakość owoców borówki wysokiej	33
	<i>Monika Figiel-Kroczyńska, Ireneusz Ochmian</i>	
6.	Charakterystyka enzymów prozapalnych: lipooksygenazy (LOX), cyklooksygenazy (COX) i oksydazy ksantynowej (XO) oraz rola fitozwiązków jako potencjalnych inhibitorów tych enzymów	40
	<i>Habza-Kowalska Ewa, Szafrńska Jagoda, Bochnak Justyna, Mazurkiewicz Ilona</i>	
7.	Hemoglobin-derived bioactive peptides from pork – an <i>in silico</i> study	45
	<i>Paulina Kęska, Joanna Stadnik</i>	
8.	Antioxidant properties of porcine collagen - an <i>in silico</i> approach	53
	<i>Paulina Kęska, Joanna Stadnik</i>	
9.	Rizobiowe czynniki Nod – rola w symbiozie roślin bobowata – <i>Rhizobium</i> oraz zastosowanie w praktyce rolniczej	60
	<i>Mikołaj Krysa, Dominika Kidaj, Iwona Komaniecka, Katarzyna Suśniak, Anna Sroka-Bartnicka</i>	
10.	Wpływ stężenia fruktozy i glukozy na namnażanie jeżówki purpurowej (<i>Echinacea purpurea</i> L.) w kulturach <i>in vitro</i>	67
	<i>Kulik Cecylia, Krupa-Mańkiewicz Marcelina</i>	
11.	Wpływ zasolenia na rozwój petunii ogrodowej (<i>Petunia × atkinsiana</i> D. don), traktowanej mutagenem chemicznym w warunkach <i>in vivo</i>	74
	<i>Cecylia Kulik, Marzena Dymitrienko, Marcelina Krupa-Mańkiewicz</i>	
12.	Czynniki ograniczające plonowanie pszenicy ozimej	80
	<i>Monika Ogórkiewicz</i>	
13.	Optymalizacja warunków oznaczania stężenia trichotecenów grupy A i B w ziarnie pszenicy	87
	<i>Anna Przybylska-Balcerek, Kinga Stuper-Szablewska</i>	
14.	Zanieczyszczenie ziarna kolorowych form użytkowych kukurydzy mikotoksynami i metalami ciężkimi	93
	<i>Anna Przybylska-Balcerek, Kinga Stuper-Szablewska</i>	
15.	Problematyka skażenia dioksynami produktów zbożowych w kontekście zdrowia ludzi i zwierząt	100
	<i>Marcin Różewicz</i>	
16.	Uprawa i wykorzystanie żyta	107
	<i>Marcin Różewicz</i>	

17. Zastosowanie obrazowania spektrometrii mas w badaniach metabolitów roślinnych	112
<i>Suśniak Katarzyna, Krysa Mikołaj, Kidaj Dominika, Komaniecka Iwona, Sroka-Bartnicka Anna</i>	
18. Znaczenie kwasów humusowych w glebie i ich wpływ na plonowanie zbóż	120
<i>Marta Wyzińska, Marcin Różewicz</i>	
19. Wpływ nawożenia azotem na ilość i jakość plonu ziarna pszenicy	126
<i>Marta Wyzińska, Marcin Różewicz</i>	

Przedmowa

Opracowanie jest pracą zbiorową napisaną przez młodych naukowców chcących opublikować swoje dokonania na łamach wydawnictwa „Młodzi Naukowcy”. Przeznaczone jest dla wszystkich zainteresowanych zgłębianiem wiedzy z dość obszernego zakresu nauk przyrodniczych. Dzięki monografii czytelnicy szybko i dokładnie mogą zapoznać się, oraz stwierdzić jakie badania z zakresu nauk przyrodniczych są realizowane w naszym kraju i podejmowanie jakich wyznań daje wymierne efekty badawcze młodym naukowcom. Obecnie utrwała się coraz bardziej i powszechniej przekonanie, że stosowanie jedynie kompleksowych badań z zakresu wszystkich dziedzin nauki, prowadzi do pełniejszego zrozumienia procesów nimi kierujących, dlatego zawarcie w częściach monografii zebranych kompleksów badań może zaowocować szerszym spojrzeniem na wyniki badań oraz skorelować ze sobą pewne zależności oczekując wymiernych efektów ich współpracy.

Żywność i żywienie. W tej części monografii odniesiono się do tak bliskiemu nam wszystkim pojęcia żywienia i żywności. Odpowiednio zbilansowane pożywienie poprzez zaprawianie kompozycjami ziół i dodatków analizowane pod kątem przechowywania, fizykochemicznym, organoleptycznym oraz jakościowym może być produktem jeszcze doskonalszym o poprawionych i zbilansowanych wartościach odżywczych, wspomagającym ogólne samopoczucie. Uświadamianie nas w tej dziedzinie jest ważnym i pomocnym w budowaniu zasadności roli jaką odgrywa pożywienie w naszym życiu.

Ochrona środowiska – Część I. Jest wiele aspektów związanych z ochroną środowiska, i w zależności od punktu widzenia, każde z nich oddziałują na siebie czyniąc siebie w sposób ważnymi. W części pierwszej podjęto się zdefiniowania mechanizmów, opisanie czynników determinujących jakość wód i gleb, zastosowań nowych technik badawczych do opisu stanu i poprawy ich własności fizykochemicznych.

Nauki przyrodnicze – Część I, Fauna i flora. Rolnictwo coraz bardziej dynamicznie stara się wytwarzać produkty lepiej dostosowane do swoich odbiorców poprzez nieustanne badanie naturalnych symbioz między gatunkowych, zgłębianie wiadomości o roślinach i ich biomie oraz wytwarzania nowych odmian. Pozwala to doprecyzować produkt finalny, który poprzez dokonania młodych naukowców zawartych w tej monografii będzie lepszym.

Nauki przyrodnicze – Część II, Fauna. Znalazły się tu opisy bogatego świata zwierząt począwszy od kolorowego świata motyli, przedstawiając zagrożenia związane z hodowlą drobiu, zależnościach między naszymi najpopularniejszymi z milusińskich - psów i kotów, kończąc na wyzwaniach w hodowli koni i ciągłych zagrożeniach ze strony gryzoni.

Dzięki informacjom zawartym w każdej monografii, napisanej poprawnym językiem polskim, czytelnicy będą mogli dowiedzieć się o różnorodnej pracy wykonanej przez młodych naukowców, a gdy ta publikacja trafi do rąk adeptów rozpoczynających drogę naukową na polu nauk biologicznych to pozwoli ona na właściwe przygotowanie się do planowania eksperymentów. Dzięki tej książce czytelnicy dowiadują się jakie badania w ubiegłym sezonie były ważne i miały znaczenie dla młodych naukowców zgłębiających szeroko pojęte zawłości nauk przyrodniczych. Podsumowując stwierdzam, że praca ta jest bardzo potrzebna i będzie przydatna w planowaniu badań dla młodych naukowców w Polsce. Jest to jedyne takie opracowanie w naszym kraju i jak mi wiadomo istnieje duże zapotrzebowanie na informacje zawarte w tej książce. Dobrze, że taka pozycja ukaże się w naszym kraju. Oceniam tę książkę bardzo dobrze i myślę, że korzystający z niej będą tego samego zdania.

dr inż. Marcin Baran
Instytut Ochrony Roślin – PIB

1. Wpływ niedoboru wody oraz wybranych właściwości gleby na plon jęczmienia jarego

The influence of water deficit and soil properties on the yield of spring barley

Beata Bartosiewicz

Zakład Gleboznawstwa Erozji i Ochrony Gruntów, Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – Państwowy Instytut Badawczy w Puławach
Opiekun naukowy: Grzegorz Siebielec

Beata Bartosiewicz: bbartosiewicz@iungpulawy.pl

Słowa kluczowe: stres suszy, zboże, jakość gleby

Streszczenie

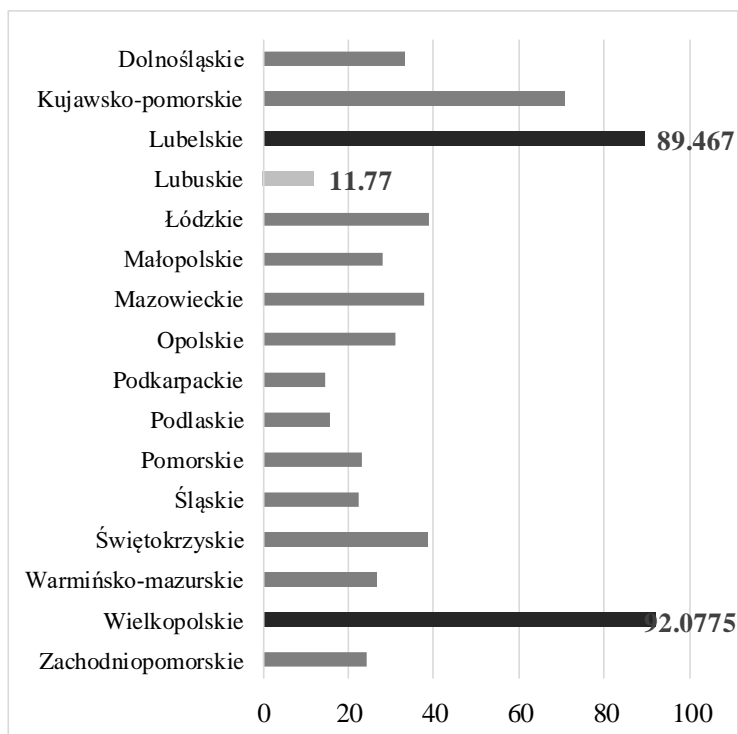
Jęczmień jest zbożem o dużym znaczeniu gospodarczym, wykorzystywanym przez człowieka od tysięcy lat. Obecnie formy jare uprawiane są przede wszystkim na cele paszowe i do produkcji słołu. Spośród zbóż jarych jęczmień odznacza się większą niezawodnością plonowania, jednak niesprzyjające warunki klimatyczne oraz glebowe negatywnie wpływają na ilość i jakość plonu. W ostatnich latach do krajowego rejestru wpisywane są nowe odmiany charakteryzujące się coraz wyższą plennością, oznacza to postęp w hodowli jęczmienia.

1. Wstęp

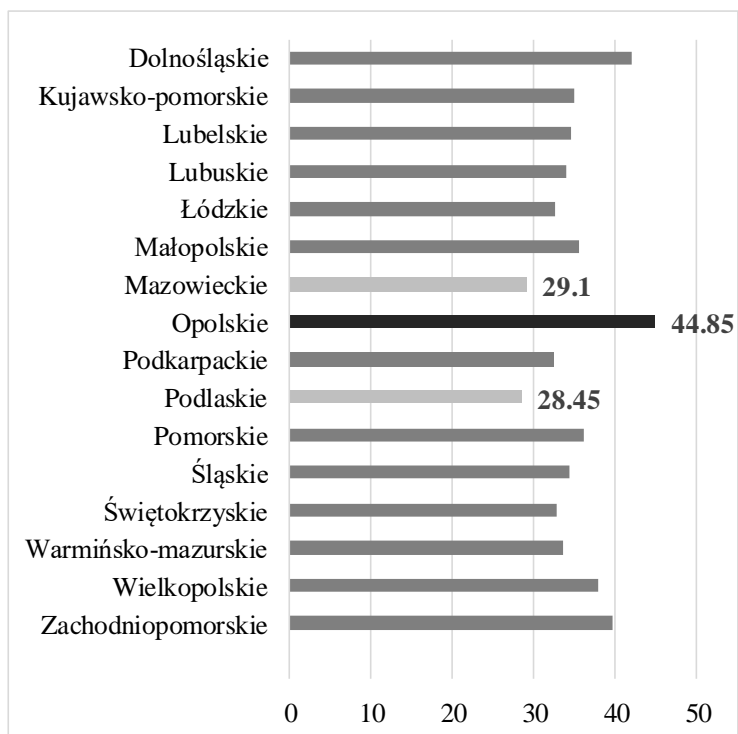
Jęczmień podobnie jak pszenica należy do najstarszych zbóż uprawianych przez człowieka (Budzyński i Szempliński 1999). Udomowienie jęczmienia nastąpiło 10 tysięcy lat temu, jednak jako pożywienie człowiek wykorzystywał go już przed 15 tysiącami lat (Pecio 2002). Badania archeologiczne przeprowadzone w dorzeczu górnego Eufratu i Tygrysu dowiodły, że 7 tysięcy lat p.n.e. uprawiano tam jęczmień dwurzędowy, natomiast rysunki znalezione w grobowcach egipskich faraonów świadczą, że przed 4-5 tysiącami lat p.n.e. znano sześciorzędowy jęczmień nagi i oplewiony, charakteryzujący się krótkimi, zbitymi kłosami. Geograficznie jęczmień wywodzi się z trzech starożytnych centrów uprawy, mianowicie z ośrodka chińskiego, z Bliskiego Wschodu oraz z ośrodka etiopsko-erytrejskiego (Abisynia). Z rejonów Bliskiego Wschodu rozprzestrzenił się na coraz większych obszarach Europy, natomiast na obszarze Polski był znany 2-3 tysiące lat p.n.e. Świadczą o tym ślady ziarniaków jęczmienia wielorzędowego znalezionego w wykopaliskach archeologicznych przeprowadzonych na Dolnym Śląsku i Pomorzu Nadwiślańskim. (Budzyński i Szempliński 1999).

2. Znaczenie gospodarcze

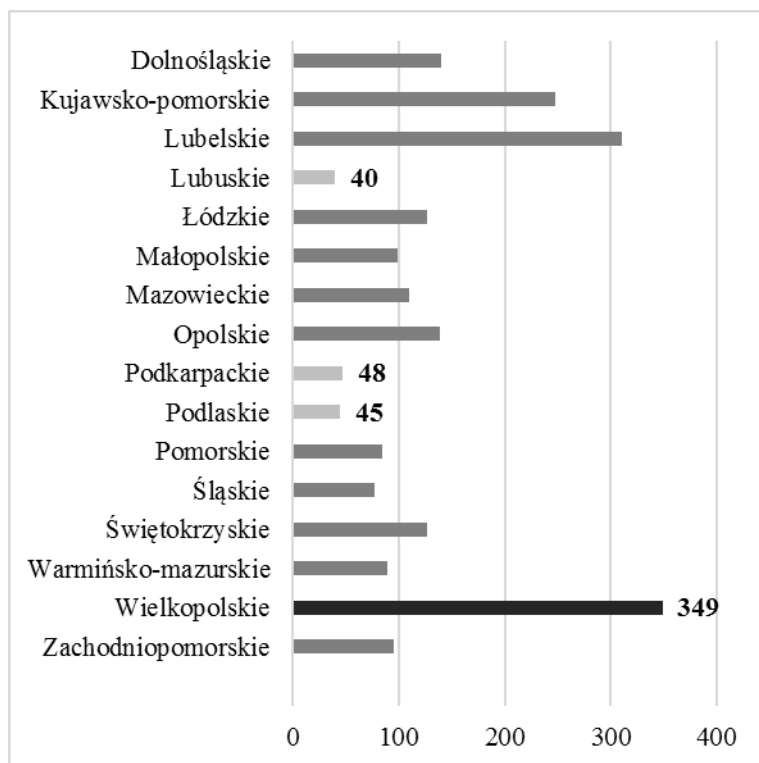
W Polsce uprawiane są głównie jare formy jęczmienia. Ich powierzchnia łącznie z mieszankami w 2017 roku stanowiła około 12% w strukturze zasiewów zbóż (Chojnacka, Faryn, Dybowski, i in. 2018). W 2017 r. na liście krajowego rejestru w Polsce znajdowało się 68 odmian jęczmienia jarego, z czego 39 to odmiany typu pastewnego (www.coboru.pl). Ziarno jęczmienia wykorzystywane jest głównie na cele paszowe oraz do produkcji słołu. Na cele paszowe można uprawiać wszystkie odmiany jęczmienia, również browarne (Chojnacka, Faryn, Dybowski i in. 2018). Ziarno jęczmienia ze względu na niską zawartość substancji antyżywnościowych jest doskonałą paszą dla wszystkich zwierząt gospodarskich. Również słoła ze względu na wyższą zawartość białka i mniejsze porażenie przez choroby ma wyższą wartość paszową niż inne zboża (z wyjątkiem owsa) (Noworolnik 2014). W ostatnich latach widoczny jest postęp w hodowli jęczmienia pastewnego. Powstają nowe odmiany coraz lepiej plonujące i bardziej odporne na niesprzyjające warunki siedliskowe (Chojnacka, Faryn, Dybowski i in. 2018).



Rys. 1. Średnia powierzchnia uprawy jęczmienia jarego w tys. ha według województw w latach 2014-2015 (źródło: GUS 2014-2015).



Rys. 2. Średnie plony jęczmienia jarego w dt ha⁻¹ według województw w latach 2014-2015 (źródło: GUS 2014-2015).



Rys. 3. Średnie zbiory jęczmienia jarego w tys. ton według województw w latach 2014-2015 (źródło: GUS 2014-2015).

3. Wpływ stresu suszy na plon jęczmienia

W ostatnich latach w Polsce zwiększa się częstość występowania suszy powodującej znaczne straty w plonach. Duże niedobory wody są wynikiem występowania w trakcie wegetacji okresów bezopadowych, a także okresów z opadami znacznie mniejszymi niż średnie oraz wzrostem temperatury powietrza (Doroszewski, Jadczyzsyn, Kozyra i in. 2012; Mizak, Pudelko, Kozyra i in. 2011). Według scenariuszy zmian klimatu deficyt wody dla Polski będzie się powiększał. Susza najczęściej rozpoczyna się w okresie wiosenno-letnim i zbiega się z okresami największego zapotrzebowania roślin na wodę (Demidowicz, Doroszewski, Górski 1996; Doroszewski, Józwicki, Wróblewska i in. 2014). Woda pełni w roślinach różnorodne funkcje: decyduje o rozpuszczeniu składników pokarmowych i ich transporcie do tkanek roślin, bierze udział w procesie transpiracji, wpływa na tempo fotosyntezy (Czyż i Dexter 2015), decyduje o ciśnieniu turgorowym oraz wpływa na przebieg procesów biochemicznych, co w konsekwencji oddziałuje na ilość i jakość plonu. Zapotrzebowanie roślin na wodę jest związane z fazą rozwojową i wzrasta w miarę przyrostu masy i transpiracji. Nie mniejsze znaczenie niż suma opadów ma ich rozkład w okresie wegetacji (Dmowski i Dzierżyc 2009). Zapotrzebowanie na wodę w cyklu rozwojowym roślin możemy podzielić na trzy okresy. Pierwszy okres to kiełkowanie nasion i rozwój początkowy - zapotrzebowanie roślin na wodę jest niewielkie. Drugi okres przypada w fazach intensywnego wzrostu oraz rozwoju wegetatywnego i generatywnego: do kwitnienia i zawiązywania ziarniaków, wówczas rośliny wykazują największe zapotrzebowanie na wodę. Trzeci okres to rozwój i dojrzewanie ziarniaków, wówczas zapotrzebowanie na wodę systematycznie maleje (Chmura, Chylińska, Dmowski i in. 2009).

Jęczmień jary ze względu na niski współczynnik transpiracji oraz dużą siłę ssącą korzeni jest jedną z bardziej odpornych roślin na niekorzystne warunki wodne (Noworolnik 2008; Noworolnik i Terelak 2006). W zależności od tego w jakiej fazie rozwojowej jęczmienia wystąpił deficyt wody, wywołuje on różne skutki (Chmura, Chylińska, Dmowski i in. 2009). Niedobór wody w fazie

kiełkowania powoduje przerzedzenie wschodów. W fazie krzewienia następuje zahamowanie rozwoju części nadziemnych oraz korzeni, co skutkuje zmniejszeniem liczby źdźbeł, kłosów oraz kłosków w kłosie. Deficyt wody w tym okresie powoduje redukcję plonu końcowego (Chmura, Chylińska, Dmowski i in. 2009, Budzyński i Szempliński 1999). Wartość plonotwórcza wody w fazie strzelania w źdźbło, która jest jednocześnie okresem krytycznym w rozwoju jęczmienia jest bardzo duża. Deficyt wody w tym czasie wpływa na zmniejszenie powierzchni asymilacyjnej i zmniejszenie przyrostu organów wegetatywnych, co skutkuje małym plonem ziarna i słomy. Stres suszy w fazie kłoszenia i kwitnienia powoduje słabe wykształcenie kłosa, zmniejszenie liczby ziaren w kłosie oraz powstawanie kłosów przelotowych (pustych). Rozwój ziarniaków jest kolejnym okresem krytycznym, wówczas woda jest niezbędna do celu dobrego wypełnienia ziarna. Brak wody w fazie dojrzałości młocnej objawia się słabym wykształceniem ziarna oraz i w konsekwencji mniejszym plonem. W wyniku niedoboru wody powstałe ziarniaki są drobne i zawierają więcej plewek (Chmura, Chylińska, Dmowski i in. 2009; Budzyński i Szempliński 1999).

4. Wpływ warunków glebowych na plon jęczmienia

Poziom plonowania jęczmienia tak jak i wszystkich zbóż uzależniony jest przede wszystkim od nawożenia i warunków glebowych (Noworolnik 2003, 2015, 2018). Do najważniejszych właściwości gleby zaliczamy: skład granulometryczny, zdolność do zatrzymywania wody, zasobność w próchnicę i składniki pokarmowe, odczyn oraz stosunki wodno-powietrzne (Czyż i Dexter 2015; Noworolnik 2008). Jęczmień jary ze względu na słabo rozwinięty system korzeniowy oraz krótki okres wegetacji (około 100 dni) ma wyższe wymagania glebowe niż owies, pszenżyto czy żyto. (Noworolnik 2008). W związku z tym wymaga on gleb utrzymywanych w dobrej kulturze, zasobnych w próchnicę i wapń (Pecio 2002).

Najlepsze plony jęczmienia jarego uzyskuje się na glebach gliniastych oraz pyłowych, należących do kompleksów: pszennego bardzo dobrego i pszennego dobrego. Zadowolające plony można uzyskać także na glebach kompleksów: żytniego bardzo dobrego i żytniego dobrego, pod warunkiem, że utrzymywane są w dobrej kulturze (Noworolnik 2014). Na podstawie wieloletnich doświadczeń stwierdzono, że na glebach kompleksu pszennego dobrego uzyskuje się średnio o 10% wyższe plony jęczmienia jarego niż na glebach kompleksu żytniego bardzo dobrego, o 19% wyższe niż na glebach kompleksu żytniego dobrego i o 32% wyższe niż na glebach kompleksu żytniego słabego (Noworolnik 2014).

Jęczmień spośród zbóż wyróżnia się największą wrażliwością na odczyn gleby. Optymalne pH dla jęczmienia jarego zależy od kategorii agronomicznej gleby i wynosi od 5,5 dla piasku słabogliniastego (kategoria I – gleby bardzo lekkie) do 6,5 dla gliny ciężkiej (kategoria IV - gleby ciężkie) (Lesczczyńska i Noworolnik 2012; www.susza.iung.pulawy.pl). Zbyt kwaśny odczyn ogranicza wzrost i rozwój roślin. Gdy pH ma wartość poniżej 4,5, w roztworze glebowym pojawiają wolne jony glinu i manganu uszkadzające włókniki korzeni, ograniczając tym samym pobieranie wody oraz składników pokarmowych przez rośliny (Lesczczyńska i Noworolnik 2012; Czyż, Daxter, Stanek-Tarkowska i in. 2015).

Jęczmień jest rośliną wrażliwą na niedostateczne napowietrzenie gleby, dlatego wymaga gleb o większej pulchności (Lesczczyńska i Noworolnik 2012) i uregulowanych stosunkach wodno-powietrznych. Ograniczenie ilości tlenu w glebie hamuje procesy życiowe oraz prowadzi do zmian w metabolizmie roślin (Czyż i Dexter 2015). Rośliny słabiej się krzewią i wytwarzają mniej korzeni przybyszowych, co powoduje mniejszą produktywność pędu głównego, którego źródłem zasilania w składniki pokarmowe są pędy boczne (Pecio 2002).

5. Podsumowanie

Na podstawie danych literaturowych można stwierdzić, że zauważalne w ostatnich dekadach globalne zmiany klimatu rzutują na warunki produkcji rolniczej. Zgodnie z najbardziej prawdopodobnymi scenariuszami zmian klimatu w Polsce w następnych kilkudziesięciu latach nastąpi wzrost średniej temperatury powietrza, wydłuży się okres wegetacyjny roślin uprawnych oraz nastąpi wzrost opadów w okresie jesienno-zimowym. W następstwie tych zmian zwiększy się ryzyko

i częstotliwość występowania suszy rolniczej. Ilość i jakość plonu w dużym stopniu związane są z warunkami pogodowymi występującymi w okresie wegetacji. Największe straty w plonach powoduje niedobór wody występujący w tzw. okresach krytycznych rozwoju jęczmienia. Istnieje jednak możliwość zmniejszania negatywnego wpływu suszy poprzez odpowiedni dobór gleby. Wymagania wodne jęczmienia są znacznie większe na glebach bardzo lekkich i lekkich (należących do I oraz II kategorii agronomicznej gleby), niż na glebach średnich czy ciężkich (należących do III oraz IV kategorii agronomicznej gleb).

Tab. 1. Częstotliwość występowania suszy rolniczej w latach 1961-2010 dla zbóż jarych na glebach I-IV kategorii (Susza Rolnicza w Polsce w latach 1961-2010).

Okres	Kategoria gleby			
	I	II	III	IV
1961-1970	8	4	1	0
1971-1980	7	7	2	0
1981-1990	6	5	2	1
1991-2000	9	5	3	2
2001-2010	10	8	5	1

Tab. 2. Częstotliwość występowania suszy na glebach kategorii I-IV (Susza Rolnicza w Polsce w latach 1961-2010).

Kategoria gleby	Częstotliwość występowania suszy
I	średnio co 1,1 roku
II	1,4
III	2,6
IV	4,5

6. Literatura

- Budzyński W, Szempliński W, (1999) Jęczmień. Szczegółowa uprawa roślin. Praca zbiorowa pod redakcją Z Jasińskiej i A Koteckiego. Wydawnictwo Akademii Rolniczej we Wrocławiu. 191-233.
- Chmura K, Chylińska E, Dmowski Z, i in. (2009) Rola czynnika wodnego w kształtowaniu plonu wybranych roślin polowych. Infrastruktura i ekologia terenów wiejskich. 9: 33-44
- Chojnacka W, Faryn A, Dybowski M, i in. (2018) Wyniki porejestrowych doświadczeń odmianowych w województwie mazowieckim. Centralny Ośrodek Badania Odmian Roślin Uprawnych, Stacja Doświadczalna Oceny Odmian w Seroczyniu. ss 59
- Czyż E. A, Dexter A. R, (2015) Fizyczne właściwości gleb. Wademekum klasyfikatora gleb. Praca zbiorowa pod redakcją F. Wocha. IUNG-PIB. Puławy 22-95.
- Czyż E. A, Dexter A. R, Stanek-Tarkowska J, i in. (2015) Wybrane fizykochemiczne właściwości gleb. Wademekum klasyfikatora gleb. Praca zbiorowa pod redakcją F. Wocha. IUNG-PIB. Puławy 96-134.
- Demidowicz G, Doroszewski A, Górski T, (1996) Wpływ niedoboru opadów na straty w produkcji ziemniaka i buraka cukrowego. Zeszyty Problemowe Nauk Rolniczych. 438: 43-52
- Dmowski Z, Dzierżyc H, (2009) Potrzeby opadowe pszenicy jarej na glebach kompleksów pszenno dobrego i żytniego bardzo dobrego w północno-wschodniej Polsce. Acta Agrophysica. 13(1): 39-48.
- Doroszewski A, Józwicki T, Wróblewska E, i in. (2014) Susza rolnicza w Polsce w latach 1996-2010 Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – Państwowy Instytut Badawczy ss 137.
- Doroszewski A, Jadczyzyn J, Kozyra J, i in. (2012) Podstawy systemu monitoringu suszy rolniczej. Woda-Środowisko-Obszary Wiejskie. t.12 z. 2(38): 77-91.

- Leszczyńska D, Noworolnik K, (2012) Metodyka integrowanej ochrony jęczmienia ozimego i jarego dla producentów. Instytut Ochrony Roślin – PIB. ss. 10.
- Mizak K, Pudełko R, Kozyra J, i in. (2011) Wyniki monitoringu suszy rolniczej w uprawach pszenicy ozimej w Polsce w latach 2008-2010. Woda-Środowisko-Obszary Wiejskie. t.11 z. 2(34): 95-107
- Noworolnik K, (2003) Wpływ wybranych czynników agrotechnicznych na plonowanie jęczmienia jarego w różnych warunkach siedliska. Monografie i Rozprawy Naukowe IUNG-PIB. 8: ss 66.
- Noworolnik K, (2008) Wpływ jakości gleby na plonowanie pszenicy jarej i jęczmienia jarego. Acta Agrophysica 11(2): 457-464.
- Noworolnik K, (2013) Plonowanie i jakość ziarna odmian jęczmienia jarego w zależności od dawki azotu. Fragmenta Agronomica 30(3): 123-131.
- Noworolnik K, (2014) Agrotechnika w kształtowaniu plonu i jakości ziarna jęczmienia jarego na cele pastewne i spożywcze. Studia i raporty IUNG-PIB 41(15): 21-37.
- Noworolnik K, (2015) Porównanie plonowania jęczmienia jarego w różnych warunkach glebowych. Polish Journal of Agronomy. 23: 69-73.
- Noworolnik K, (2018) Wpływ zróżnicowanych warunków glebowych na plonowanie odmian pszenżyta ozimego. Fragmenta Agronomica 35(1): 62-71.
- Noworolnik K, Terelak H, (2006) Wpływ agrochemicznych właściwości gleb na plon ziarna i białka jęczmienia jarego i owsa oraz ich mieszanek. Roczniki Gleboznawcze (57) 3/4; 72-79.
- Pecio A, (2002) Środowiskowe i agrotechniczne uwarunkowania wielkości plonu ziarna jęczmienia browarnego. Fragmenta Agronomica, (XIX) 4(76): ss19.
- Rocznik statystyczny, 2014-2015; GUS, Warszawa.
- www.coboru.pl/Publikacje_COBORU/Listy_odmian/lo_rolnicze_2018.pdf
- www.susz.iung.pulawy.pl/kategorie-glebowe/

2. Pomiar krzywej indukcji fluorescencji chlorofilu *a* w badaniach stanu fizjologicznego roślin

Borkowska Izabela, Hanaka Agnieszka, Wójcik Małgorzata

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

Opiekun naukowy: Małgorzata Wójcik

Borkowska Izabela: izabelaborkowska4@gmail.com

Słowa kluczowe: chlorofil, fluorescencja modulowana PAM, fotosynteza, fotosystem II

Streszczenie

Wzrastająca produkcja roślinna stała się jedną z przyczyn poszukiwania metod przewidywania oraz oceny wpływu niesprzyjających warunków na wzrost i rozwój roślin. Skutkami oddziaływania stresorów na rośliny są zaburzone procesy metaboliczne i zmiany w strukturach komórkowych. Do najczęściej występujących zaburzeń zaliczane jest zahamowanie wzrostu oraz zahamowanie procesu fotosyntezy. Celem opracowania jest przybliżenie możliwości wykorzystania pomiarów krzywej indukcji fluorescencji chlorofilu *a* w ocenie sprawności aparatu fotosyntetycznego oraz ogólnego stanu fizjologicznego roślin. Współczesne fluorymetry typu PAM (*ang. pulse amplitude modulation*) służą do oceny wydajności przetwarzania energii fotonów światła fotosyntetycznie czynnego w energię chemiczną oraz wyznaczeniu parametrów indukcji fluorescencji. Pomiaru są stosunkowo łatwe i nieinwazyjne w wykonaniu. Aparaty obrazujące badaną powierzchnię dodatkowo pozwalają na obserwację rozkładu intensywności fluorescencji chlorofilu *a* na powierzchni liścia. Uniwersalność tej czułej metody pozwala na wykonywanie badań na pojedynczych roślinach, jak i całych ekosystemach. Obecnie, analiza parametrów indukcji fluorescencji chlorofilu *a* stała się podstawowym kryterium selekcji roślin w programach hodowlanych, ochronie środowiska i innych dziedzinach gospodarki.

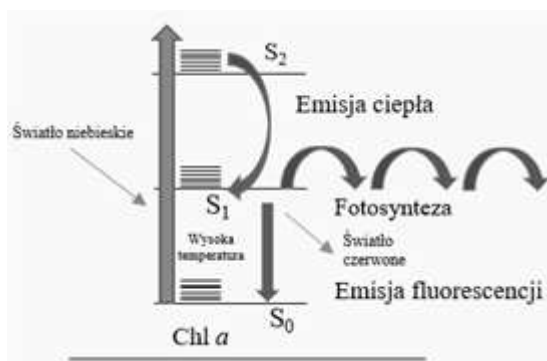
1. Wstęp

Rośliny są narażone na wiele stresogennych biotycznych i abiotycznych czynników środowiska, jak np. atak patogenów i zwierząt roślinożernych, deficyt wody, niska i wysoka temperatura, uszkodzenia mechaniczne, zbyt wysokie natężenie światła fotosyntetycznie czynnego PAR (*ang. photosynthetically active radiation*). Fotosynteza jest procesem metabolicznym szczególnie wrażliwym na czynniki stresowe. W procesie tym organizmy fotosyntezujące przy udziale energii słonecznej pobierają dwutlenek węgla oraz wodę, wytwarzając tlen i glukozę. Zamiana energii światła na energię wiązań chemicznych jest możliwa dzięki absorpcji kwantów światła (fotonów) przez chlorofil. Błona tylakoidu stanowi miejsce przebiegu fazy świetlnej fotosyntezy u roślin eukariotycznych oraz sinic. Zawarte są w niej dwa kompleksy białkowo-barwnikowe – fotosystem I (PSI) oraz fotosystem II (PSII), a także syntaza ATP i cytochrom b_6/f . W absorpcji światła biorą również udział barwniki pomocnicze, do których należą karotenoidy. Obecność ich umożliwia absorpcję większej ilości kwantów światła. Barwniki fotosyntetyczne są zorganizowane w kompleksach zbierających światło, LHC (*ang. light-harvesting complex*), nazywanych także kompleksami antenowymi. Energia pochodząca ze wzbudzonego chlorofilu może być wyemitowana jako kwant światła, co obserwuje się jako czerwone promieniowanie fluorescencyjne lub w postaci ciepła. Gdy na układy fotosyntetyczne oddziałuje stres świetlny, nie są one w stanie przetworzyć całej energii świetlnej na energię chemiczną. Ten czynnik stresowy może prowadzić bezpośrednio lub pośrednio do modyfikacji lub uszkodzenia aparatu fotosyntetycznego (Maciołek i in. 2013). W rezultacie dochodzi do fotoinhibicji – zjawiska, polegającego głównie na destrukcji części rdzeniowej PSII oraz zaburzeniu transportu elektronów. Analiza parametrów indukcji fluorescencji stanowi podstawowy i przydatny instrument badawczy do oceny stanu

fizjologicznego rośliny oraz zmian jakie zachodzą pod wpływem stresu (Peterson i in. 2001). Coraz większą popularność zdobywają również techniki wizualizujące (Chaerle i in. 2001).

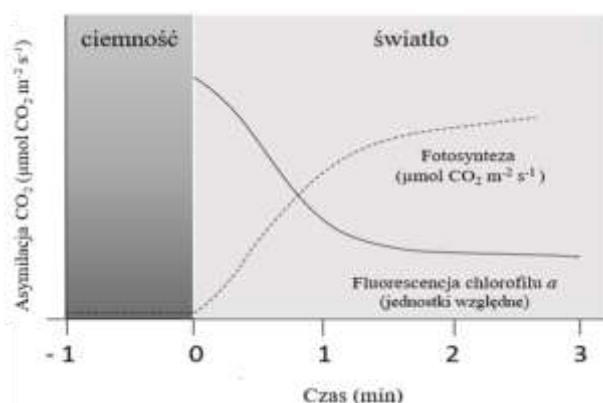
2. Fluorescencja chlorofilu *a*

Pochłonięta energia kwantu światła powoduje wzbudzenie cząsteczki chlorofilu, czyli wybiecie elektronu ze stanu podstawowego na orbital o wyższej energii. Pochłonięcie kwantu światła niebieskiego, powoduje wybiecie elektronu na drugi singletowy stan wzbudzenia (poziom S_2). Jest to jednak stan nietrwały i elektron po bardzo krótkim czasie (10^{-13} s) powraca z jednoczesną emisją energii na sposób nieradiacyjny na pierwszy singletowy stan wzbudzenia (poziom S_1). Poziom S_1 osiągają również elektrony wybijane z cząsteczek chlorofilu wzbudzonych kwantem światła czerwonego. Poziom S_1 jest trwalszy energetycznie niż S_2 . Jego czas trwania wynosi około 10^{-9} s, co jest wystarczające do zajścia zjawiska fluorescencji. Energia pochłoniętych fotonów światła wykorzystywana jest w procesach fotochemicznych fotosyntezy. Część elektronów nie może być wykorzystana w procesach fotosyntetycznych i powraca do stanu podstawowego, a energia kwantu światła, którą zaabsorbował chlorofil, jest oddawana poprzez emisję światła czerwonego, o wartości fali większej niż długość fali światła pochłoniętego (Pagliano i in. 2006) (Rys. 1).



Rys. 1. Singletowe stany energetyczne cząsteczki chlorofilu oraz rodzaje przejść pomiędzy tymi poziomami (zmodyfikowano wg Kautsky i in. 1931).

Jak zauważył Kautsky i współpracownicy, emisja fluorescencji chlorofilu jest odwrotnie skorelowana z wydajnością fotosyntezy (Kautsky i in. 1931) (Rys. 2).



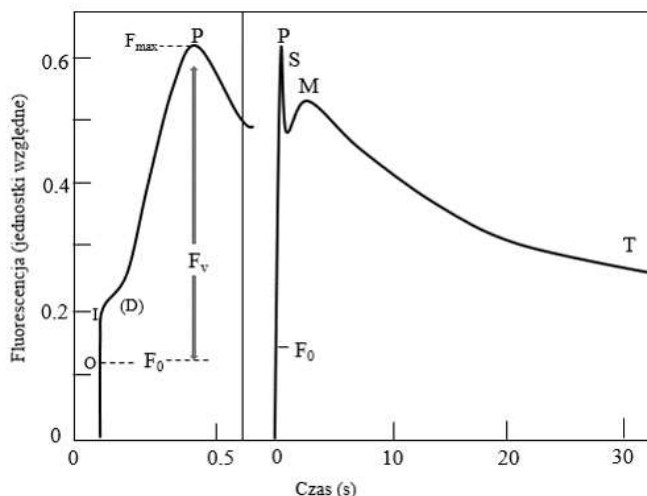
Rys. 2. Relacja pomiędzy intensywnością asymilacji CO_2 a intensywnością fluorescencji chlorofilu *a* w czasie (zmodyfikowano wg Cetner i in. 2016).

Intensywność fluorescencji jest tym większa, im więcej cząsteczek chlorofilu jest wzbudzonych. Tak więc w roślinach zaadaptowanych do ciemności będzie niska (ok. 0,6%

pochłoniętego światła), a w roślinach intensywnie oświetlonych może osiągać 3-5% pochłoniętego światła (Cetner i in. 2016).

2.1 Modulowana fluorescencja chlorofilu *a*

Krzywa indukcji fluorescencji chlorofilu *a* odzwierciedlająca początkowe fazy indukcji fotosyntezy może stanowić doskonałe źródło informacji o tym procesie. W praktycznym zastosowaniu szczególnie skuteczna jest modulowana fluorescencja chlorofilu PAM w połączeniu z metodą impulsu nasycenia. W takim systemie źródło promieniowania świetlnego jest modulowane. Oznacza to, że jest włączane i wyłączane z określoną częstotliwością. Emisja fluorescencji została po raz pierwszy opisana przez Kautsky i Hirsch. Przed pomiarem liście były adaptowane do ciemności przez kilkanaście minut. Po tym okresie zostały oświetlone impulsem światła (0,3 s). Następuje wówczas szybki wzrost poziomu fluorescencji, po czym poziom ten obniża się do momentu uzyskania stanu równowagi (w czasie 3 minut). Kautsky obserwował charakterystyczny kształt krzywej odzwierciedlający kinetykę indukcji fluorescencji chlorofilu – intensywność krzywej początkowo gwałtownie rośnie a następnie maleje – ten wzrost i spadek został nazwany efektem Kautskiego. Poszczególne etapy przebiegu indukcji fluorescencji określane są literami O, I, D, P, S, M, T. W przebiegu krzywej indukcji fluorescencji wyróżnić można dwie fazy: fazę szybką, trwającą od 10^{-12} do 10^{-9} s, obejmującą etapy od O do P oraz fazę wolną, trwającą od kilku do kilkunastu minut, od etapu P do T (Maxwell i in. 2000) (Rys. 3).



Rys. 3. Schemat przebiegu krzywej indukcji fluorescencji chlorofilu *a* w czasie – krzywa Kautskiego (zmodyfikowano wg Govindjee i in. 1995).

Po oświetleniu uprzednio zaciemnionej rośliny światłem o odpowiedniej intensywności, jest ono absorbowane przez kompleksy antenowe, ale elektrony nie docierają jeszcze do centrum reakcji PSII, wszystkie pułapki energetyczne są otwarte, a przenośniki elektronów w PSII są w stanie utlenionym. Fluorescencja osiąga wtedy wartość F_0 (fluorescencja minimalna) – punkt O. Po wzbudzeniu centrum reakcji PSII silnym światłem, krzywa fluorescencji osiąga kolejno: poziom pośredni I, potem etap stopniowego zmniejszania się tempa wzrostu intensywności fluorescencji – D, a następnie gwałtowny wzrost do poziomu fluorescencji maksymalnej (F_M) – P. Punkt I odpowiada stopniowej wędrówce elektronów do puli plastochinonu, gdy Q_A ulega redukcji a fluorescencja szybko wzrasta. Przejściowe obniżenie szybkości wzrostu fluorescencji w punkcie D odpowiada wędrówce elektronów pomiędzy przenośnikami Q_A i Q_B . Po zredukowaniu wszystkich cząsteczek Q_A następuje gwałtowny wzrost fluorescencji do poziomu P, czemu towarzyszy zamknięcie centrów reakcji, a procesy fotochemiczne nie zachodzą. Po osiągnięciu maksimum fluorescencji następuje faza wolna kinetyki indukcji i fluorescencja obniża się osiągając kolejno poziomy S, M i T. Pasma

w widmie fluorescencji dostarczają informacji o odległościach pomiędzy poziomami oscylacyjnymi elektronowego poziomu podstawowego (Juneasu i in. 2005).

3. Parametry krzywej indukcji fluorescencji chlorofilu *a*

Na podstawie krzywej indukcji fluorescencji chlorofilu *a* możliwe jest wyznaczenie szeregu parametrów użytecznych do opisu fotosyntezy. Parametrem opisującym fotochemiczną wydajność fotosyntezy jest stosunek fluorescencji zmiennej do maksymalnej (F_V/F_M). Parametr ten jest wprost proporcjonalny do wydajności fotosyntezy mierzonej jako wydzielanie O_2 lub pobieranie CO_2 . W momencie gdy na roślinę działają czynniki stresowe wartość F_V/F_M zmienia się. Przeciętnie wartość tego stosunku zawiera się w przedziale 0,75-0,85, dla prawidłowo funkcjonujących roślin naczyniowych wynosi średnio 0,83 (Rys. 4), dla sinic przybiera niższą wartość (Hall i Rao 1999).

$$\frac{F_V}{F_M} = \frac{F_M - F_0}{F_M} = 0,83$$

Rys. 4. Parametr F_V/F_M , gdzie:

F_V – fluorescencja zmienna,

F_M – fluorescencja maksymalna,

F_0 – fluorescencja minimalna

W opisie związku między fluorescencją a fotosyntezą dogodne jest użycie parametrów związanych z fotochemicznym (qP – *ang. photochemical quenching*) i niefotochemicznym (qN lub NPQ – *ang. non-photochemical quenching*) wygaszaniem fluorescencji. O stosunku liczby fotonów zaabsorbowanych przez PSII do liczby fotonów wykorzystanych w fazie świetlnej fotosyntezy informuje parametr qP (Kalaji 2010) (Rys. 5).

$$qP = \left(\frac{F_{M'} - F_T}{F_{M'} - F_{0'}} \right)$$

Rys. 5. Parametr qP , gdzie:

$F_{M'}$ – fluorescencja maksymalna w warunkach stanu równowagi

F_T – fluorescencja stacjonarna,

$F_{0'}$ – fluorescencja zerowa obiektów zaadaptowanych do ciemności w warunkach stanu równowagi

Wygaszanie fotochemiczne jest uwarunkowane procesami fotochemicznymi, zmniejsza się proporcjonalnie do wysycenia pułapek energetycznych PSII oraz redukcji Q_A . W momencie, gdy procesy zachodzące w PSII są zahamowane, rośnie wygaszanie niefotochemiczne (qN), związane z deekscytacją termiczną. Kiedy centra reakcji są uszkodzone lub zahamowany jest przepływ elektronów z anten do centrów reakcji PSII, następuje obniżenie wartości parametru F_0 , który służy głównie do ustalania oraz standaryzacji pozostałych parametrów opisujących fotosyntezę. F_0 określa emisję fluorescencji, gdy wszystkie centra reakcji są otwarte, a qP przyjmuje wartość maksymalną ($qP = 1$). Jest to wskaźnik mało zmienny, zazwyczaj przyjmuje stałe wartości. Charakterystyczne dla fotoinhibicji jest jego obniżenie lub wzrost F_V . Wzrost wartości F_0 świadczy o destrukcji PSII, natomiast obniżenie wartości F_V wskazuje na wzrost wygaszania niefotochemicznego NPQ (Štroch i in. 2004) (Rys. 6).

$$NPQ = \left(\frac{F_M}{F_{M'}} \right) - 1 = \frac{(F_M - F_{M'})}{F_{M'}}$$

Rys. 6. Parametr NPQ , gdzie:

F_M – fluorescencja maksymalna,

$F_{M'}$ – fluorescencja maksymalna w warunkach stanu równowagi

Parametr ten jest odzwierciedleniem stopnia rozproszenia energii w sposób termiczny, które zachodzi w antenach fotosyntetycznych. Efektywną wydajność kwantową transportu elektronów w PSII opisuje parametr Yield (Rys. 7).

$$Yield = \frac{(F_{M'} - F_T)}{F_{M'}} = \Delta \frac{F_T}{F_{M'}}$$

Rys. 7. Parametr Yield, gdzie:

$F_{M'}$ – fluorescencja maksymalna w warunkach stanu równowagi,

F_T – fluorescencja stacjonarna

Inne parametry dogodne do opisu zmian w wartościach fluorescencji to LNU oraz P i D. Parametr LNU (*ang. light not utilised*) dostarcza informacji jaka część energii świetlnej, która pada na anteny energetyczne PSII nie jest absorbowana przez fotoukład (Peterson i in. 2006) (Rys. 8).

$$LNU = 1 - \left(\frac{\Delta F}{F_{M'}}\right) \left(\frac{F_V}{F_M}\right)$$

Rys. 8. Parametr LNU, gdzie:

F_V – fluorescencja zmienna,

$F_{M'}$ – fluorescencja maksymalna w warunkach stanu równowagi,

F_V/F_M – stosunek fluorescencji zmiennej do maksymalnej, miara fotochemicznej aktywności PSII

Parametr P określa, jaka część zaabsorbowanej energii jest wykorzystywana w procesach fotochemicznych PSII (Rys. 9), natomiast D – jaka część tej energii jest rozpraszana termicznie (Rys. 10).

$$P = \left(\frac{F_{V'}}{F_{M'}}\right) qP$$

Rys. 9. Parametr P, gdzie:

$F_{V'}$ – fluorescencja zmienna w warunkach stanu równowagi,

$F_{M'}$ – fluorescencja maksymalna w warunkach stanu równowagi,

qP – fotochemiczne wygaszenie fluorescencji chlorofilu *a*

$$D = 1 - \left(\frac{F_{V'}}{F_{M'}}\right)$$

Rys. 10. Parametr D, gdzie:

$F_{V'}$ – fluorescencja zmienna w warunkach stanu równowagi,

$F_{M'}$ – fluorescencja maksymalna w warunkach stanu równowagi

W diagnozowaniu stanu fizjologicznego roślin stosowany jest parametr R_{fd} , czyli wskaźnik witalności. Informuje on o potencjalnej aktywności fotosyntetycznej w danych warunkach świetlnych. Dla organizmów fotosyntetyzujących w warunkach bezstresowych R_{fd} wynosi 3-5,8 (Kalaji 2010) (Rys. 11).

$$R_{fd} = \frac{(F_M - F_T)}{F_T}$$

Rys. 11. Parametr R_{fd} , gdzie:

F_M – fluorescencja maksymalna,

F_T – fluorescencja stacjonarna

4. Obrazowanie fluorescencji chlorofilu *a*

Obrazowanie fluorescencji chlorofilu *a* staje się coraz bardziej popularne jako badanie przesiewowe (Baker i in. 2001) i narzędzie diagnostyczne (Barbagallo i in. 2003).

W przeciwieństwie do pomiarów punktowych, ustawienie wielobarwnego systemu obrazowania fluorescencyjnego o wysokiej rozdzielczości przestrzennej umożliwia jednocześnie przesiewanie kilkuset elementów obrazu liścia i otwiera nowe możliwości w zakresie pomiarów fizjologicznych i wczesnego wykrywania stresu. Dzięki komputerowemu przetwarzaniu danych uzyskuje się barwne obrazy z informacją o intensywności fluorescencji oraz o stosunkach fluorescencji w całych liściach (Li i in. 2014).

Główną zaletą metod fluorymetrycznych są pomiary wykonywane *in vivo*, nie naruszające struktury badanego materiału. Pomiary trwają od kilku sekund do kilku minut i można je wykonać w warunkach polowych, jak i w laboratorium. Ograniczeniem w tego typu pomiarach jest przedstawienie wyłącznie związku między detekcją fluorescencji chlorofilu, a reakcjami fazy świetlnej fotosyntezy. Aby w pełni móc ocenić wydajność całego procesu fotosyntezy, wyniki powinny być korelowane z innymi danymi (Gorbe i in. 2012).

5. Zastosowanie pomiarów krzywej indukcji fluorescencji chlorofilu *a*

Choroby liści roślin można łatwo wykryć za pomocą obrazowania fluorescencji chlorofilu, ze względu na ich wpływ na wykorzystanie energii świetlnej przez aparat fotosyntetyczny (Gorbe i in. 2014). Metale ciężkie znacząco wpływają na zmiany ilościowe i jakościowe barwników w liściach. Jednym z najczęstszych skutków toksyczności metali jest chloroza liści, jak również zmiany stężenia chlorofilu, karotenów i ksantofili. Pomiar krzywej indukcji fluorescencji chlorofilu *a* oraz analiza jej parametrów umożliwia badanie toksycznego wpływu metali na sprawność aparatu fotosyntetycznego. Oparte na tej metodzie aplikacje do monitorowania jakości owoców cieszą się ogromnym zainteresowaniem, ponieważ oferują nieinwazyjną, szybką metodę określania czasu zbioru i kontrolowania/przewidywania jakości nasion po zbiorze. Dzięki zastosowaniu systemu obrazowania stwierdzono np. większą intensywność fluorescencji chlorofilu *a* w niedojrzałych owocach winogron, ponieważ zawartość chlorofilu zmniejsza się podczas dojrzewania winogron (Murchie i in. 2013). Istnieje wiele przykładów wykorzystania obrazowania fluorescencji chlorofilu do wykrywania efektów działania czynników stresowych, takich jak stres suszy (Rahbarian i in. 2011) stres niskiej temperatury (Ehlert 2008) czy żerowanie roślinożernych owadów (Tang i in. 2006). Obrazowanie fluorescencji chlorofilu stosowano również do wykrywania działania herbicydów na roślinę (Barbagallo i in. 2003).

6. Podsumowanie

Pomiar krzywej indukcji fluorescencji chlorofilu *a* jest powszechnie stosowaną techniką w fizjologii roślin pozwalającą na nieinwazyjny pomiar aktywności PSII. Wrażliwość aktywności PSII na czynniki stresowe sprawiła, że jest to kluczowa technika dla zrozumienia mechanizmów fotosyntetycznych oraz monitorowania reakcji roślin na zmiany środowiska. Obrazowanie fluorescencji ma kluczową zaletę przedstawiania rozkładu i zmienności sygnałów w próbce. Stosunkowo szybki pomiar i łatwość zebrania danych spowodowały pojawienie się szerokiej gamy instrumentów do pomiaru oraz analizy parametrów fluorescencji chlorofilu.

7. Literatura

- Baker NR, Oxborough K, Lawson T (2001) High resolution imaging of photosynthetic activities of tissues, cells and chloroplasts in leaves: *Journal of Experimental Botany* 52: 615-621.
- Barbagallo RP, Oxborough K, Pallett KE i in. (2003) Rapid noninvasive screening for perturbations of metabolism and plant growth using chlorophyll fluorescence imaging: *Plant Physiology* 132: 485-493.
- Cetner DM, Dąbrowski P, Samborska IA i in. (2006) Zastosowanie fluorescencji chlorofilu w badaniach środowiskowych: *Kosmos* 2: 197-205.

- Chaerle L, Van Der Straeten D (2001) Seeing is believing: imaging techniques to monitor plant health: *Biochimica et Biophysica Acta* 1519: 153-161.
- Demmig-Adams B, Adams III WW, Barker DH i in. (1986) Using chlorophyll fluorescence to assess the fraction of absorbed light allocated to thermal dissipation of excess excitation: *Physiologia Plantarum* 98: 253-264.
- Ehlert B, Hinch DK (2008) Chlorophyll fluorescence imaging accurately quantifies freezing damage and cold acclimation responses in *Arabidopsis* leaves: *Plant Methods* 4: 12.
- Gorbe E, Calatayud A (2012) Applications of chlorophyll fluorescence imaging technique in horticultural research: a review: *Photochemistry and Photobiology* 138: 24-35.
- Hall DO, Rao K (1999) *Fotosynteza*. Wydawnictwo Naukowe-Techniczne, Warszawa.
- Govindjee (1995) Sixty-three years since Kautsky: Chlorophyll a fluorescence: *Functional Plant Biology* 22: 131-160.
- Juneau P, Green BR, Harrison PJ (2005) Simulation of pulse-amplitude-modulated (PAM) fluorescence: limitations of some PAM-parameters in studying environmental effects: *Photosynthetica* 43: 75-83.
- Kalaji MH (2010) *Fluorescencja chlorofilu w badaniach stanu fizjologicznego roślin*. Wydawnictwo SGGW, Warszawa.
- Kautsky H, Hirsch A (1931) Neue Versuche zur Kohlensäureassimilation, *Naturwissenschaften* 19: 964-964.
- Li L, Zhang Q, Huang D (2014) A review of imaging techniques for plant phenotyping: *Sensors* 14: 20078-20111.
- Maciołek M, Zielińska A, Domarecki T (2013) Oddziaływanie geobiologiczno-chemiczne kadmu i ołowiu na środowisko przyrodnicze: *Journal of Ecology and Health* 14: 63-71.
- Murchie EH, Lawson T (2013) Chlorophyll fluorescence analysis: a guide to good practice and understanding some new applications: *Journal of Experimental Botany* 64: 3983-3998.
- Maxwell K, Johnson G (2000) Chlorophyll fluorescence – a practical guide: *Journal of Experimental Botany* 5: 659-668.
- Pagliano C, Raviolo M, Dalla Vecchia F i in. (2006) Evidence for PSII donor-side damage and photoinhibition induced by cadmium treatment on rice (*Oryza sativa* L.): *Journal of Photochemistry and Photobiology B Biology* 84: 70-78.
- Peterson RB, Oja V, Laisk A (2001) Chlorophyll fluorescence at 680 and 730 nm and leaf photosynthesis: *Photosynthesis Research* 70: 185-196.
- Rahbarian R, Khavari-Nejad R, Ganjeali A i in. (2011) Drought stress effects on photosynthesis, chlorophyll fluorescence and water relations in tolerant and susceptible chickpea (*Cicer arietinum* L.) genotypes: *Acta Biologica Cracoviensia series Botanica* 53: 47-56.
- Štroch M, Špunda V, Kurasova I (2004) Non-radiative dissipation of absorbed excitation energy within photosynthetic apparatus of higher plants: *Photosynthetica* 42: 323-337.
- Tang JY, Zielinski RE, Zangerl AR i in. (2006) The differential effects of herbivory by first and fourth instars of *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae) on photosynthesis in *Arabidopsis thaliana*: *Journal of Experimental Botany* 57: 527-536.

3. Wpływ stężenia i rodzaju cukru na namnażanie *Echinacea purpurea*

Effect carbon sources and its concentration on *in vitro* micropropagation of *Echinacea purpurea*

Czerwińska Katarzyna, Madusiok Margareta, Krupa-Małkiewicz Marcelina

Katedra Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin, Katedra Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin, Wydział Kształtowania Środowiska i Rolnictwa, Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie

Opiekun naukowy: Marcelina Krupa-Małkiewicz

Katarzyna Czerwińska: katarz.czerwinska@gmail.com

Słowa kluczowe: jeżówka purpurowa, węglowodany, mikrorozmnażanie, kultury *in vitro*.

Streszczenie

Celem niniejszej pracy było zbadanie wpływu rodzaju i stężenia węglowodanów na namnażanie jeżówki purpurowej *Echinacea purpurea*. Do pożywek MS dodano sacharozę i maltozę w stężeniach 0- 50 g·dm⁻³. Najlepszym źródłem węgla w podłożu do regeneracji i wzrostu pędów była sacharozą. Najdłuższe pędy (4.8 cm) oraz największą ich liczbę na jednym eksplantacji (2.12) uzyskano u roślin jeżówki na pożywce z dodatkiem 40 g·dm⁻³ sacharozę. Maltoza nie miała stymulującego wpływu na namnażanie pędów jeżówki. Brak źródła cukru w pożywce miał negatywny wpływ na ukorzenianie *Echinacea purpurea*.

Key words: purple coneflower, carbohydrates, micropropagation, cultures *in vitro*.

Abstract: The purpose of this study was to investigate the effects of carbohydrate type and concentration on micropropagation of purple coneflower *Echinacea purpurea*. Sucrose and maltose were tested at concentration ranging from 0 to 50 g·dm⁻³. The best type of carbon sources for shoot regeneration and growth was sucrose. The highest shoot length of *Echinacea* (4.8 cm) and number of new shoots per one explant (2.12) were obtained on medium with addition of 40 g·dm⁻³ sucrose. Maltose did not stimulate proliferation of *Echinacea* shoots. Either the lack of carbon source in the medium was completely ineffective in rooting of *Echinacea purpurea*.

1. Wstęp

Jeżówka purpurowa (łac. *Echinacea purpurea*) jest rośliną wieloletnią należącą do rodziny *Asteraceae*, pochodzi z Ameryki Północnej (Della-Beffa 2004). Cechą charakterystyczną rośliny są okazałe kwiatostany w kolorze purpurowym lub różowym. Jeżówka doskonale nadaje się do uprawy na ogrodowych rabatach ze względu na walory ozdobne oraz wysoką odporność na liczne czynniki środowiskowe (http://www.mobzabrze.pl/materialy/_upload/flora/echinacea_purpurea.pdf). *Echinacea purpurea* ze względu na cenne właściwości zdrowotne jest jedną z najbardziej znanych roślin leczniczych na świecie. Substancje czynne pozyskiwane z jeżówki posiadają właściwości przeciwbakteryjne, przeciwgrzybiczne i przeciwwirusowe. W związku z tym wyciągi z *E. purpurea* stosuje się między innymi w leczeniu pierwszych objawów przeziębienia, profilaktyce nawracających infekcji górnych dróg oddechowych oraz infekcji dróg moczowo-płciowych (Ashwell i in. 2000).

Rozmnażanie jeżówki prowadzi się przez wysiew nasion, podział kłączy albo przez sadzonki korzeniowe (<http://www.ogrodowisko.pl/artykuly/200-jezowka-echinacea-roslina-owwyjatkowych-wlasciwosciach>). Alternatywną metodę pozyskiwania roślin z naturalnych warunków glebowo-klimatycznych stanowią kultury *in vitro*. Mikrorozmnażanie w warunkach *in vitro* jest metodą tanią i szybką. Ponadto jest to technika niezależna od pór roku i warunków klimatycznych, która pozwala na uzyskanie jednorodnych genotypów oraz otrzymanie roślin wolnych od patogenów, a także ochronę gatunków zagrożonych wyginięciem (Chojak 2011).

Rośliny namnażane w kulturach *in vitro* wymagają odpowiedniego podłoża, które dostarcza eksplantatom niezbędnych składników odżywczych. Podstawowy skład pożywki stanowią sole mineralne, związki organiczne i związek będący źródłem węgla. Cukrowce wykorzystywane są jako

ważne źródło energii oraz substrat w różnych szlakach metabolicznych komórek roślinnych (Skucińska 2008).

2. Metodyka i materiały

Doświadczenie przeprowadzono w Laboratorium Kultur Tkankowych Katedry Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin na Wydziale Kształtowania Środowiska i Rolnictwa Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie w 2017 roku. Materiał badawczy stanowiły nasiona *Echinacea purpurea*.

W pierwszym etapie doświadczenia nasiona jeżówki poddano wstępnej dezynfekcji. W tym celu materiał odkażano w 70% roztworze alkoholu przez 20 sekund. Następnie przepłukano 3-krotnie wodą destylowaną. Kolejnym etapem była dezynfekcja właściwa w 15% podchlorynie sodu (NaOCl) przez 15 minut, po czym nasiona płukano 3-krotnie w wodzie sterylnej. Tak oczyszczony materiał został przeniesiony do komory laminarnej. Zdezynfekowane nasiona wykładano po 1 sztuce do probówek Erlenmayera wypełnionych 20ml pożywki MS (Murashige i Skoog 1962), której skład został podany w tabeli 1. Probówki na czas kiełkowania nasion i wzrostu roślin umieszczono w fitotronie o temperaturze 24°C, 16h dnu i natężeniu światła 40µm·m⁻²·s⁻¹.

Po upływie 4 tygodni zainicjowane eksplantaty przekładano na pożywki regeneracyjne MS, wzbogacone o źródła węgla: sacharozę lub maltozę w stężeniach podanych w tabeli 2. Pasażowanie wykonano w warunkach jałowych, pod komorą laminarną. Do słoików szklanych o pojemności 250ml zawierających 30ml pożywki MS z dodatkiem cukrów w różnych stężeniach wykładano 2cm fragmenty pędów. Doświadczenie założono w 8 powtórzeniach po 4 eksplantaty w każdym słoiku. Słoiki inkubowano przez 4 tygodnie w fitotronie w takich samych warunkach, jak na etapie inicjacji. Po namnożeniu roślin dokonano pomiarów cech morfologicznych określając: wysokość roślin (cm), liczbę pędów (szt.), długość korzeni (cm), świeżą masę (mg), suchą masę (mg), zawartość wody (%). Procentową zawartość wody oszacowano według wzoru:

$$\text{Procentowa zawartość wody (\%)} = (\text{świeża masa} - \text{sucha masa} / \text{świeża masa}) \times 100$$

3. Wyniki i dyskusja

Cukrowce są nie tylko ważnym źródłem energii dla organizmów żywych, ale również kontrolują wiele ich funkcji życiowych (Bogunia i Przywara 1999). W kulturach *in vitro* cukier jest jednym z podstawowych substancji niezbędnych do prawidłowego wzrostu i rozwoju. Ze względu na panujące warunki kultury, tj. niska intensywność światła, ograniczona wymiana gazowa, czy też wysoka wilgotność, niezbędne jest ciągle dostarczanie cukru do pożywki. Najczęściej do pożywki stosuje się dodatek cukru sacharozy. Jednakże, nie zawsze jest to optymalne źródło węgla, a w niektórych przypadkach może nawet wykazywać działanie hamujące wzrost i rozwój eksplantatów w kulturach *in vitro*.

Przeprowadzona analiza wariancji wykazała, że rośliny *Echinacea purpurea* namnażanie *in vitro* na pożywkach MS z dodatkiem różnych źródeł cukrów i ich stężeń, różniły się wysoce istotnie pod względem wysokości roślin oraz długości korzeni (tab. 1). Dodatek cukrów do pożywki nie wpłynął znacząco na liczbę pędów oraz masę roślin.

Tab. 1 Analiza wariancji dla badanych cech morfologicznych roślin *Echinacea purpurea* namnażanych w kulturach *in vitro*.

CECHA MORFOLOGICZNA	F EMPIRYCZNE
Wysokość [cm]	8.08**
Liczba pędów	0.07
Długość korzeni [cm]	6.90**
Świeża masa [mg]	0.78
Sucha masa [mg]	0.08

* istotna różnica na poziomie $\alpha=0,05$

** wysoce istotna różnica na poziomie $\alpha=0,01$

Analiza wariancji przeprowadzona za pomocą testu Tukey'a wykazała, że średnie wysokości *Echinacea purpurea* rosnącej na pożywkach z dodatkiem sacharozy, jak i maltozy nie różniły się statystycznie od siebie (tab. 2).

Tab. 2 Wpływ rodzaju i stężenia cukru na wysokość (cm) roślin *Echinacea purpurea* w kulturach *in vitro*.

Źródło cukru (I)	Stężenie cukru [$\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$] (II)							Średnia
	0	10	20	30	40	50		
Sacharoza	1.01 b	2.12 b	2.45 b	2.06 b	4.8 a	2.6 b	2.5 A	
Maltoza	2.15 b	4.08 a	3.87 b	3.42 b	2.93 b	3.28 b	3.29 A	
Średnia	1.58 B	3.1 A	3.16 AB	2.74 AB	3.86 A	2.94 AB		
NIR $\alpha_{0,05}$ = 0.71 NIR II = 1.51 NIR III = 2.00								

* grupy jednorodne

NIR $\alpha_{0,05}$ – Najmniejsza Istotna Różnica na poziomie istotności $\alpha_{0,05}$

Średnie wartości badanej cechy należą do tej samej grupy jednorodnej. Największy wzrost pędów jeżówki niezależnie od rodzaju cukru obserwowano u roślin na pożywce MS uzupełnionej $40 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ (Rys. 1).



Rys. 1 Rośliny jeżówki otrzymane na etapie namnażania.

Najniższe były rośliny na pożywkach bez dodatku sacharozy i maltozy. Eksplantaty jeżówki na podłożu z dodatkiem $40 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ sacharozy osiągnęły najwyższą średnią wysokość pędu – 4.8 cm. Natomiast w przypadku dodatku do pożywki MS maltozy, najwyższe rośliny uzyskano przy stężeniu $10 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$. Najniższe były rośliny namnażane na podłożu bez dodatku cukrów. Ich wysokość wynosiło średnio – 1.01 cm i 2.15 cm.

Przeprowadzona analiza statystyczna nie wykazała istotnych różnic w liczbie wykształconych pędów na jednej roślinie, w zależności od zastosowanego źródła węgla. Otrzymane średnie wartości badanej cechy były do siebie zbliżone (tab. 3).

Bez względu na rodzaj cukru średnio największy przyrost pędów u *Echinacea purpurea* zaobserwowano przy stężeniach 40 i $50 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ w pożywce namnażającej MS. Najmniej rozgałęzione były rośliny na podłożu bez cukru oraz z dodatkiem $30 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ sacharozy i $40 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ maltozy.

W niniejszych badaniach określono wpływ cukru sacharozy i maltozy na mikrorozmnazanie jeżówki. Na podstawie przeprowadzonych obserwacji stwierdzono, że najlepszą kombinacją do namnażania pędów *Echinacea purpurea* jest pożywka uzupełniona 40 g·dm⁻³ sacharozy. Eksplantaty uzyskane na tym podłożu charakteryzowały się największą długością pędu oraz liczbą wykształconych pędów bocznych. Z badań własnych wynika, że najdłuższe korzenie miały rośliny na pożywce uzupełnionej 20 g·dm⁻³ maltozy. Podczas, gdy brak cukru w pożywce całkowicie hamował ich wzrost. Podobne do badań własnych wyniki uzyskał Chae (2013) u *Echinacea angustifolia*. Do namnażania tej rośliny zastosowano pożywki z dodatkiem różnych źródeł węgla (fruktoza, glukoza, laktoza, maltoza i sacharoza) w pięciu stężeniach (10, 20, 30, 40 i 50 mg/l). Autorzy potwierdzili, że najlepszym źródłem węglowodanów mającym pozytywny wpływ na wzrost i formowanie nowych pędów miała sacharoza w stężeniu 40 g·dm⁻³. Korzystność sacharozy w porównaniu do innych źródeł cukru potwierdzono w badaniach Kim i in. (2016) na *Aloe saponaria*.

Inne niż w badaniach własnych wyniki otrzymali Hossain i in. (2002) dla wąkroty azjatyckiej (*Centella asiatica*) którzy wykazali, że dodatek maltozy do pożywki MS zawierającej 0.2 mg/l BAP i 1.5 mg/l Kin miało pozytywny wpływ na rozwój pędów tej rośliny.

Analiza wariancji wykazała, że rośliny *Echinacea purpurea* namnażane w kulturach *in vitro* różniły się statystycznie pod względem długości korzeni. Średnia wartość badanej cechy jeżówki na pożywce MS z dodatkiem sacharozy wynosiła 2.06 cm. Natomiast średnia długość korzeni na pożywce MS z dodatkiem maltozy wynosiła 3.74 cm. (tab. 4).

Tab. 3 Wpływ rodzaju i stężenia cukru na liczbę pędów roślin *Echinacea purpurea* w kulturach *in vitro*.

Źródło cukru (I)	Stężenie cukru [g·dm ⁻³] (II)						Średnia
	0	10	20	30	40	50	
Sacharoza	1.37 a	1.37 a	1.87 a	1.12 a	2.12 a	1.87 a	1.62 A
Maltoza	1.37 a	1.62 a	1.62 a	1.62 a	1.5 a	1.75 a	1.58 A
Średnia	1.37 A	1.5 A	1.75 A	1.37 A	1.81 A	1.81 A	
NIR _{α,05} = 0.39 NIR _{II} =0.83 NIR _{II1} = 1.10							

* grupy jednorodne

NIR_{α,05} – Najmniejsza Istotna Różnica na poziomie istotności α_{0,05}

Tab. 4 Wpływ rodzaju i stężenia cukru na długość korzeni (cm) roślin *Echinacea purpurea* w kulturach *in vitro*.

Źródło cukru (I)	Stężenie cukru [g·dm ⁻³] (II)						Średnia
	0	10	20	30	40	50	
Sacharoz a	0 a	1.5 a 1	1.9 a 6	2.4 a 3	2.7 a 5	3.7 a 5	2.0 B 6
Maltoza	0 b	2.9 a 1	5.9 a 2	4.5 a 6	3.3 a 8	5.6 a 7	3.7 B 4
Średnia	0 B	2.2 A 1	3.9 A 4	3.5 A	3.0 A 6	4.7 A 1	
NIR _{α,05} = 1.64 NIR _{II} =3.48 NIR _{II1} = 4.63							

* grupy jednorodne

NIR_{α,05} – Najmniejsza Istotna Różnica na poziomie istotności α_{0,05}

Eksplantaty namnażane na pożywkach MS z dodatkiem 50 g·dm⁻³ cukru wykształciły średnio najdłuższe korzenie (4,71cm). Podczas gdy, brak cukru w pożywce MS całkowicie hamował proces ryzogenezy (fot.1, tab.6). Najlepszy wzrost korzeni jeżówki (5,92cm) zaobserwowano na pożywce MS uzupełnionej 20 g·dm⁻³ maltozy.

Dodatek cukru sacharozy lub maltozy nie miał istotnego wpływu na średnią świeżą masę badanych roślin. Otrzymane średnie stanowiły jedną grupę jednorodną. Największą świeżą masą roślin (296.25 mg) odnotowano przy stężeniu cukru 40 g·dm⁻³ (tab. 5).

Tab. 5 Wpływ rodzaju i stężenia cukru na świeżą masę (mg) roślin *Echinacea purpurea* w kulturach *in vitro*.

Źródło cukru (I)	Stężenie cukru [$\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$] (II)							Średnia
	0	10	20	30	40	50		
Sacharoza	102.27 b	87 b	227.27 b	120.55 b	375 a	202.75 b	185.80A	
Maltoza	77.75 b	127.75 ab	191.5 ab	240.25 a	217.5 ab	108 ab	160.45A	
Średnia	90.01 B	107.37 B	209.38 AB	180.4 AB	296.25 A	155.37 B		
NIR $\alpha_{0,05}$ = 73.50 NIR Π = 135.38 NIR ΠI = 147.01								

* grupy jednorodne

NIR $\alpha_{0,05}$ – Najmniejsza Istotna Różnica na poziomie istotności $\alpha_{0,05}$

Najmniejszym przyrostem masy charakteryzowały się eksplantaty na pożywce bez dodatku cukru (90.01 mg). Ponadto zaobserwowano, że dodatek do podłoża 30 $\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$ cukru maltozy miał stymulujący wpływ na przyrost świeżej masy tkanki roślinnej (240.25 mg).

W badaniach własnych na podstawie pomiarów cech morfologicznych stwierdzono, że największy przyrost świeżej masy zaobserwowano na pożywce z dodatkiem 40 $\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$ sacharozy. Natomiast stosując pożywkę wzbogaconą cukrem maltozą, największą świeżą masę odnotowano przy stężeniu 30 $\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$. Podobne wyniki otrzymali Kawa-Miszczak i in. (2009), którzy badali wpływ różnych źródeł węglowodanów na wzrost i rozwój liliowca *in vitro*. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że największy przyrost świeżej masy liliowca zaobserwowano na pożywce MS wzbogaconej 30 $\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$ cukru maltozy.

Natomiast Al-Khateeb (2008) stwierdził istotną zależność pomiędzy stężeniem cukru w podłożu a suchą masą roślin. Zaobserwowano, że wraz ze wzrostem stężenia węgla w podłożu wzrastała sucha masa rośliny.

Przeprowadzona analiza wariancji nie wykazała znaczącego wpływu różnego rodzaju i stężenia cukru na suchą masę jeżówki. Średnie wartości badanej cechy należą do jednej grupy jednorodnej. Wśród zastosowanych w doświadczeniu pożywek największą suchą masę (43.96 mg) uzyskały rośliny namnażane na pożywce MS z dodatkiem 40 $\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$ cukru, najmniejszą (10.26 mg) - na podłożu bez cukru (tab. 6).

Tab. 6 Wpływ rodzaju i stężenia cukru na suchą masę (mg) roślin *Echinacea purpurea* w kulturach *in vitro*.

Źródło Cukru (I)	Stężenie cukru (II) [$\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$]												Średnia	
	0		10		20		30		40		50			
Sacharoza	11.15	b*	16.07	b	32.3	ab	23.8	ab	42.72	a	35.67	ab	26.95	A
Maltoza	9.37	b	17	b	31	ab	42.92	ab	45.2	a	25.35	ab	28.47	A
Średnia	10.26	B	16.53	B	31.65	AB	33.36	AB	43.96	A	30.51	AB		
NIR I = 13.24 NIR Π = 24.38 NIR ΠI = 26.48														

* grupy jednorodne

NIR $\alpha_{0,05}$ – Najmniejsza Istotna Różnica na poziomie istotności $\alpha_{0,05}$

Wyniki te potwierdzają również badania Ilczuk i in. (2013). Autorzy odnotowali najwyższy przyrost suchej masy przy stężeniach 40-50 $\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$ cukru w pożywce, a najniższą na pożywce bez dodatku cukru. W badaniach własnych również zaobserwowano podobną zależność. Rośliny z pożywki MS bez dodatku źródła węgla charakteryzowały się niższą suchą masą w porównaniu do pozostałych. Natomiast najwyższą suchą masę obserwowano u roślin Echinacei z pożywki MS (Murashige i Skoog, 1962) uzupełnionej 40 $\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$ cukru sacharozy, jak i maltozy. Jednakże, dalszy wzrost stężenia cukru w pożywce MS powodował obniżenie suchej masy eksplantatów.

Wyniki otrzymane w badaniach własnych oraz przez w/w autorów potwierdzają, że cukier dodany do podłoża hodowlanego ma istotny wpływ na rozwój cech morfologicznych roślin namnażanych w warunkach *in vitro*. Dla wielu gatunków roślin źródło cukru stanowi sacharoza. Jednakże przeprowadzone badania naukowe dowodzą, że może być on z powodzeniem zastąpiony przez inny cukrowiec.

4. Wnioski

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że źródło węgla dodane do podłoża hodowlanego ma istotny wpływ na rozwój cech morfologicznych roślin *Echinacea purpurea* namnażanych w kulturach *in vitro*. Za optymalną pożywkę do namnażania roślin jeżówki można uznać pożywkę MS wzbogaconą $40 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ sacharozy. Dodatek tego cukru do pożywki wykazał stymulujący wpływ na wysokość pędów oraz liczbę pędów bocznych.

Najlepszą pożywką do inicjacji ryzogenezy okazała się pożywka MS z dodatkiem $20 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ cukru maltozy. Brak źródła cukru w pożywce wpływał niekorzystnie na kształtowanie cech morfologicznych jeżówki *Echinacea purpurea* na etapie namnażania.

5. Literatura

- Ashwell M, Bussell G, Clasen L, Egginton J, Gibson S, Govindji A, McClenaghan J, Wilcock F (2000) Uzdrowiająca moc witamin i ziół. Przegląda Reader's Digest. Warszawa. 82-83;
- Barnes J, Anderson LA, Gibbons S, Phillipson J. D (2005) *Echinacea* species (*Echinacea angustifolia* (DC.) Hell., *Echinacea pallida* (Nutt.) Nutt., *Echinacea purpurea* (L.) Moench): a review of their chemistry, pharmacology and clinical properties. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 929-954.
- Bogunia H, Przywara L (1999) Rola cukrowców w roślinnych kulturach *in vitro*. *Wiadomości Botaniczne* 43(1/2): 25:36.
- Chae Sch 2013. Influence of carbon sources on shoot organogenesis in *Echinacea angustifolia* DC. *Life Science Journal*. 10(3)
- Ciereszko I (2007) Odbiór i przekazywanie sygnału wywołanego zmianami poziomu cukrów w komórkach roślinnych. *Postępy Biologii Komórki* 34 (4): 695-713.
- Gauchan DP (2011) Effect on different sugars on shoot regeneration of maize (*Zea Mays* L.). *Kathmandu University Journal of Science , Engineering and Technology*. 119-124.
- George EF, Hall MA, De Klerk GJ (2008) *Plant propagation tissue culture 3rd editio. Volume 1. The background*. Springer. 143-151;
- Gupta M, Sharma D, Sharma A, Kumar V, Goshain OP (2012) A Review on Purple Cone Flower (*Echinacea purpurea* L. Moench). *Journal of Pharmacy Research* 5 (8). 4076-4081.
- Ilczuk A, Jagiełło-Kubiec K, Jacygrad E (2013) The effect of carbon source in culture medium on micropropagation of common ninebark (*Physocarpus opulifolius* (L.) Maxim.) 'Diable D'or'. *Acta Scientiarum Polonorum, Hortorum Cultus* 12(3). 23-33;
- Jukić, H, Habeš, S, Aldžić, A., Durgo, K, Kosalec, I (2015) Antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds of the extracts of *Echinacea purpurea* (L.). *Bulletin of the Chemists and Technologists of Bosnia and Herzegovina*. 44. 4352;
- Kawa-Miszczak L, Węgrzynowicz E, Gabryszewska E, Góraj J, Saniewski M. (2009) Wpływ różnych źródeł węglowodanów na wzrost i rozwój liliowca *in vitro*. *Zeszyty Postępów Nauk Rolniczych* 534: 89-94.
- Kim JK, Baskar TB, Park SU (2016) Effect of carbon sources and sucrose concentrations on shoot organogenesis of *Aloe saponaria*. *Biosciences Biotechnology Research Asia* 13(2), 925-930.
- Kowalczyk K (2013) *Agrobiotechnologia*. Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego, Lublin. 15-26;
- Lewkowicz-Mosiej T (2012) *Rośliny lecznicze leksykon. Świat książki*, Warszawa. 124-125;
- Malepszy S. 2012. *Biotechnologia roślin*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa. 21-24;

- Panathula CS, Mahadev MD, Naidu CV (2014) Effect of different carbohydrates on in vitro plant regeneration of *Centella asiatica* (L.) – An important antijaundice medicinal plant. *International Journal of Medicinal Aromatic Plants*. 4(1). 41-47;
- Skucińska B (2008) Przewodnik do ćwiczeń z roślinnych kultur in vitro. Wydawnictwo Uniwersytetu Rolniczego, Kraków. 5-21;
- Stanisavljević I, Stojičević S, Veličković D, Veljković V, Lazić M (2009) Antioxidant and antimicrobial activities of echinacea (*Echinacea purpurea* L.) extracts obtained by classical and ultrasound extraction. *Chinese Journal of Chemical Engineering*. 17(3). 478-483;
- Yaseen M, Ahmad T, Sablok G, Standardi A, Hafiz IA (2013) Review: role of carbon sources for in vitro plant growth and development. *Molecular Biology Reports*. 40. 2837–2849;
- Zenkeler M (1984) Hodowla komórek i tkanek roślinnych. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.

Spis stron internetowych:

<http://www.e-biotechnologia.pl/Artykuly/kultury-in-vitro>

http://www.mob-zabrze.pl/materialy/_upload/flora/echinacea_purpurea.pdf

<http://www.ogrodowisko.pl/artykuly/200-jezowka-echinacea-roslina-o-wyjatkowychwlasciwosciach>

<http://www.wbp.olsztyn.pl/~krist/skrypt/menu.php>

<http://www.zielonyogrodek.pl/na-sloneczne-stanowisko/jezowka-purpurowa>

<https://plants.usda.gov/java/ClassificationServlet?source=profile&symbol=ECPU&display=3> 1

4. Wpływ sposobu aplikowania preparatu Actisil na jakość owoców borówki wysokiej (*Vaccinium corymbosum* L.)

Effect of applying Actisil the quality of highbush blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.)

Monika Figiel-Kroczyńska, Ireneusz Ochmian

Katedra Ogrodnictwa, Wydział Kształtowania Środowiska i Rolnictwa, Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie
Opiekun naukowy: Ireneusz Ochmian

Ireneusz Ochmian: iochmian@zut.edu.pl

Słowa kluczowe: jakość owoców, jędrność owoców, skład chemiczny owoców

Streszczenie

Borówka wysoka, popularnie nazywana borówką amerykańską, jest gatunkiem rośliny wieloletniej, należącej do rodziny wrzosowatych. W ostatnich latach znacząco wzrosło zainteresowanie tym gatunkiem. Obecnie, przy dużej konkurencji, bardzo ważna jest jakość owoców, zwłaszcza po okresie przechowywania. To ona decyduje o ich cenie i rentowności gospodarstwa. Celem pracy była ocena wpływu krzemowego nawozu Actisil i sposobu jego aplikowania na jakość owoców borówki wysokiej.

Badania wykazały pozytywny wpływ na jakość owoców Actisilu stosowanego w formie oprysku. Owoce były nieznacznie większe, pomimo tego również jędrniejsze. Na zwiększenie jędrności owoców wpływ mogła mieć zwiększona zawartość krzemu w częściach wskaźnikowych krzewu - liściach i owocach. Owoce opryskiwane nawozem krzemowym charakteryzowały się również wyższą zawartością związków bioaktywnych. Zastosowanie nawozu dogłębowo nie przyniosło zamierzonego efektu.

1. Wstęp

Borówka wysoka wywodzi się z Ameryki Północnej, która przoduje w światowej produkcji tej rośliny (Strik i Yarborough 2004; Michalska i Łysiak 2015). Polska znajduje się na pierwszym miejscu w Europie pod względem powierzchni nasadzeń krzewów, jak i ilości zbieranych owoców. Jednakże w naszym kraju występuje duże rozdrobnienie gospodarstw zajmujących się uprawą borówki. W ostatnich latach notuje się znaczny wzrost zainteresowania borówką przez konsumentów, a co za tym idzie przede wszystkim producentów. Borówka wysoka jest rośliną, która produkuje owoce cenione głównie przez odbiorców, jako cenne źródło składników odżywczych, błonnika pokarmowego oraz substancji bioaktywnych. Owoce spożywane są głównie na surowo, jako owoc deserowy, a także znajdują swoje zastosowanie w przetwórstwie. Stały się również w ostatnich latach, cennym materiałem do badań naukowych, mających za cel zastosowanie w medycynie ludzkiej, m.in. przez potencjalną zdolność ograniczania rozwój niektórych nowotworów i chorób naczyniowych (Neto 2007).

Konsumenci żądają wysokiej jakości owoców, która zależy od metody zbioru, charakterystyki odmian, obróbki po zbiorczej i temperatury przechowywania (Chiabrando i in. 2009). Przeprowadzone analizy wskazują, że w kontekście wyboru przez producenta kanału dystrybucji, najbardziej korzystna wydaje się sprzedaż owoców borówki wysokiej na rynku hurtowym i na eksport (Wróblewska i Czernyszewicz 2017). Związane jest to nieodzownie z wydłużeniem czasu przydatności do konsumpcji. Zachowanie jędrności owoców po zbiorze jest jednym z najistotniejszych wskaźników ich świeżości i atrakcyjności konsumpcyjnej (Poterańska i in. 2015). Oczywiście jest, że przechowywanie owoców borówki w chłodniach z kontrolowaną atmosferą, gdzie panują specyficzne, sprzyjające warunki, wydłuża ich przydatność spożywczą (Basiouny i Chem 1988; Paniagua i in. 2014). Ta metoda chociaż skuteczna, jest kosztowna i stosowana tylko przez największych producentów borówki wysokiej w Polsce. Zmiany temperatury lub składu

atmosfery mogą generować znaczne różnice w jakości produktu końcowego (Paniagua i in. 2014). Większość produkowanych w Polsce owoców borówki wysokiej jest spożywana w postaci nieprzetworzonej. Prowadzone badania wskazują, że małe owoce borówki i owoce z tradycyjnych upraw są bardziej jędrne i odporne na uszkodzenia mechaniczne (Ochmian i Kozos 2014). Jednak większość odbiorców na rynku bezpośrednim preferuje duże jagody. Dlatego też, warto jest szukać rozwiązań, które pomogą uzyskać duży owoc z zachowaniem jędrności i świeżości. Jędrność zależy od mikrostruktury owoców i podczas przechowywania jagód może się zmniejszyć, zwiększyć lub pozostać niezmienną (Chiabrando i in. 2009). Na strukturę owoców wpływają takie cechy, jak organelle komórkowe i biochemiczne składniki, zawartość wody oraz ciśnienie turgorowe wytwarzane w komórkach przez osmozę, skład ściany komórkowej (celuloza, pektyny i hemicelulozy) oraz jej integralność (Jackman i Stanley 1995). Jednak struktura owocu nie jest łatwa do zdefiniowania, w szczególności w małych owocach, takich jak borówka, ponieważ nie ma powszechnej znormalizowanej metody do jej zbadania (Chiabrando i in. 2009).

Po zbiorze, owoce muszą mieć wysoką jakość, aby zmaksymalizować czas przechowywania (Forney 2009). W celu przedłużenia możliwości przechowalniczej owoców borówki wysokiej, warto szukać innych rozwiązań, z zastosowaniem nawozów oraz biostymulatorów. Na rynku obecne są produkty, których aplikowanie może zapewnić poprawę jakości po zbiorczej owoców oraz zmniejszyć podatność na uszkodzenia podczas transportu. Uznaje się, że stosowanie krzemu daje taki efekt. Krzem jest drugim najbardziej rozpowszechnionym pierwiastkiem w glebie (Richmond i Sussman 2003). Występuje w znacznych ilościach w wielu gatunkach roślin. Jego dostępność dla roślin jest jednak różna, a często niestety niska (Feng Ma i Yamaji 2006; Trzawczyński 2013). Badania dowodzą, że rośliny nie posiadające dostępnej formy krzemu wykazują zaburzenia we wzroście i rozwoju. Doświadczenia prowadzone w wielu krajach, również w Polsce, wykazują, że krzem kumulując się głównie w ścianach komórkowych, wpływa pozytywnie na ich sztywność i odporność mechaniczną. Najlepszym sposobem zapobiegania niedoborom krzemu jest dokarmianie dolistne, gdyż formy krzemu występujące w glebie są nierozpuszczalne w wodzie, a przez to niedostępne dla roślin (Trzawczyński 2013). Krzem może odgrywać aktywną rolę w poprawie odporności gospodarza na choroby roślin poprzez stymulację mechanizmów reakcji obronnych, przeciwko stresom biotycznym i abiotycznym (Feng Ma i Yamaji 2006). Wcześniejsze doświadczenia dowodzą, że rośliny opryskiwane dolistnie preparatem ActiSil wytworzyły owoce bardziej jędrne i odporne na uszkodzenia mechaniczne (Poterąńska i in. 2015).

Celem pracy było określenie sposobu aplikowania krzemu, dolistnie lub doglebowo, na jakość owoców borówki wysokiej. Określono skład chemiczny owoców oraz ich jędrność i odporność na uszkodzenia mechaniczne.

2. Materiały i metody

Doświadczenie przeprowadzone zostało w Stacji Badawczej Katedry Ogrodnictwa Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie. Materiał badawczy stanowiły krzewy dwóch odmian borówki wysokiej: Duke i Spartan.

Opis odmian: Duke - uznana za najlepszą wcześniej dojrzewającą odmianę. Kwitnie dość późno dzięki czemu unika przymrozków, a mimo to owocuje dość wcześnie. Wielkość owoców oraz ich walory smakowe są bardzo dobre. Możliwy zbiór mechaniczny. Odporność na mróz i zimę jest bardzo dobra. 'Duke' dobrze znosi temperatury do -25 °C. Pokrój krzewu jest kulisty i luźny. Pędy szkieletowe są sztywne, z tendencją do rozchylania się pod ciężarem owoców. Owoce borówki 'Duke' są wyrównanej wielkości. Miąższ zwarty, zielonkawy, słodko-winny, owoce przy szypułce lekko spłaszczone, zebrane w dość luźne grona. Skórka borówki 'Duke' pokryta jest średnio intensywnym nalotem. Idealna odmiana do ciast, deserów i bezpośredniego spożycia. Borówka 'Duke' należy do odmian bardzo wczesnych - dojrzewa kilka dni po odmianie Chanticleer, w pierwszej połowie lipca. Wyróżnia się dużym skoncentrowaniem dojrzewania owoców i uprawiana jest w naszym klimacie na co raz większą skalę.

Spartan - krzewy tej odmiany są polecane zarówno do amatorskich nasadzeń jak i na plantacjach produkcyjnych. Pokrój krzewów kulisty, dość luźny. Pędy średniej grubości, niezbyt rozgałęzione, jednoroczne barwy wiśniowej. Odmiana bardzo plenna, otrzymana w roku 1956, a do

uprawy wprowadzona od 1977 roku. Kwiaty duże, wydłużone, płatki korony białawe z lekkim odcieniem. Szypułki duże, długie, grube, lekko zaróżowione. Dostateczna wytrzymałość roślin na mróz. Liście duże, średniej wielkości, eliptyczne, lekko pomarańczowe, młode z wyraźnym brązowym odcieniem, starsze intensywnie zielone.

Owoce odmiany 'Spartan' są duże, spłaszczone, niebieskie, z intensywnym popielatym nalotem woskowym, zebrane w dość luźne grona. Miąższ zielonkawy, z lekkim zaróżowieniem przy skórce, zwarty, słodko-winny, aromatyczny, bardzo smaczny. Odmiana 'Spartan' dojrzewa dość wcześnie, w połowie lipca. Owoce w pełni dojrzałe łatwo opadają.

Zastosowano preparat chemiczny Actisil (Yara Poland). Jest to nawóz poprawiający kondycję roślin. W jego skład wchodzi kwas ortokrzemowy, cholina oraz wapń. Służy on do sporządzania roztworów wodnych, stosowanych w fertygacji oraz do nawożenia pozakorzeniowego.

Skład nawozu: krzem – 0,6% Si w postaci kwasu ortokrzemowego, stabilizowany choliną.

Krzem w postaci kwasu ortokrzemowego, najbardziej aktywnej i przyswajalnej przez rośliny formie, stabilnej i nieprzechodzącej do form nieprzyswajalnych, dzięki specjalnej formule preparatu. Preparat bardzo korzystnie wpływa na procesy metaboliczne roślin (m.in.: fotosyntezę), pobudza rośliny do syntezy tkanek mechanicznych, dzięki czemu uzyskują one lepszy pokrój oraz sztywność organów. Ponadto zwiększa naturalną odporność na niekorzystne warunki środowiska (susza, niska temperatura, atak patogenów), reguluje gospodarkę wodną (transpirację) oraz poprawia jakość pozbiorczą owoców i kwiatów oraz zmniejsza podatność na uszkodzenia podczas transportu.

Preparat aplikowano trzykrotnie w formie oprysku 0,1% roztworem, a także dogłębowo roztworem o stężeniu 0,1%:

- trzy opryski (1 przed kwitnienie i 2 na owoce) - 0,1% preparatem do pełnego zwilżenia
- trzykrotna fertygacja roztworem nawozu o stężeniu 0,1%
- kontrola - bez nawozów.

W doświadczeniu określono wpływ zastosowanego preparatu na parametry jakościowe owoców. Określono jakość owoców: ich wielkość, jędrność, zawartość ekstraktu, kwasowość, zawartość związków polifenolowych.

Bezpośrednio po zbiorze była określona wielkość oraz jędrność owoców za pomocą niedestrukcyjnego urządzenia połączonego z komputerem FirmTech2. Określona została również odporność na uszkodzenia skórki owocu, stemplem o średnicy 2 mm.

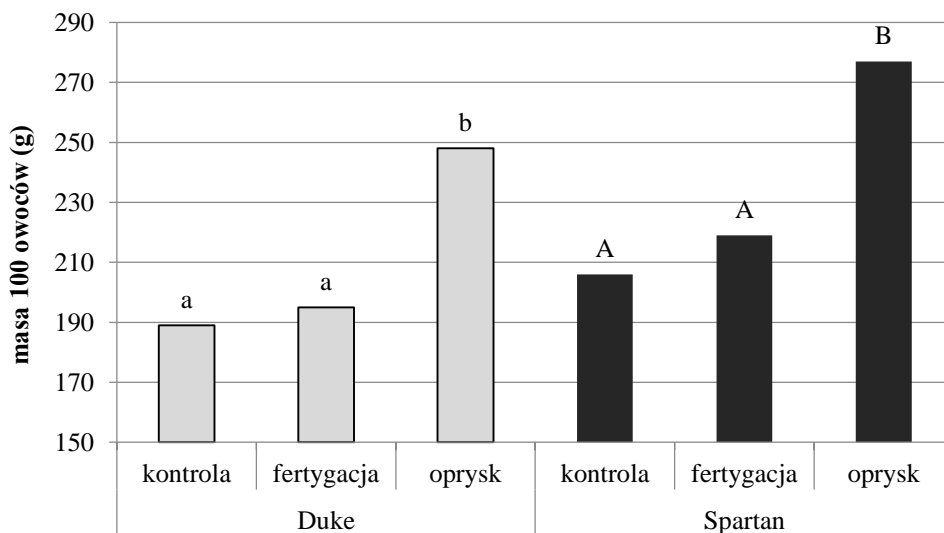
Skład chemiczny owoców oznaczano w soku. W tym celu z jagody macerowano przez 60 min w temp. 50 °C z dodatkiem enzymu PT 400 Pektopol (Biowin, Polska), w dawce 400 mg na kg owoców. Po zakończeniu obróbki enzymatycznej uzyskany miąższ prasowano z użyciem prasy hydraulicznej pod ciśnieniem 3 MPa.

Kwasowość ogólną owoców oznaczano metodą miareczkową w przeliczeniu na kwas cytrynowy, miareczkując wodny roztwór wyciągu z owoców 1 molowym roztworem NaOH do punktu końcowego przy pH = 8,1 (Pehametr Elmetron, Polska). Ogólną zawartość polifenoli oznaczano metodą spektrofotometryczną Folina-Ciocalteu'a (spektrofotometr UV-Vis Helios Gamma, ThermoSpectronic, USA) w przeliczeniu na kwas galusowy.

W celu stwierdzenia istotności różnic przeprowadzono jednoczynnikową analizę wariancji przy użyciu programu Statistica. Istotność różnic została oceniona przy pomocy testu Tukey'a na poziomie istotności $\alpha=0,05$.

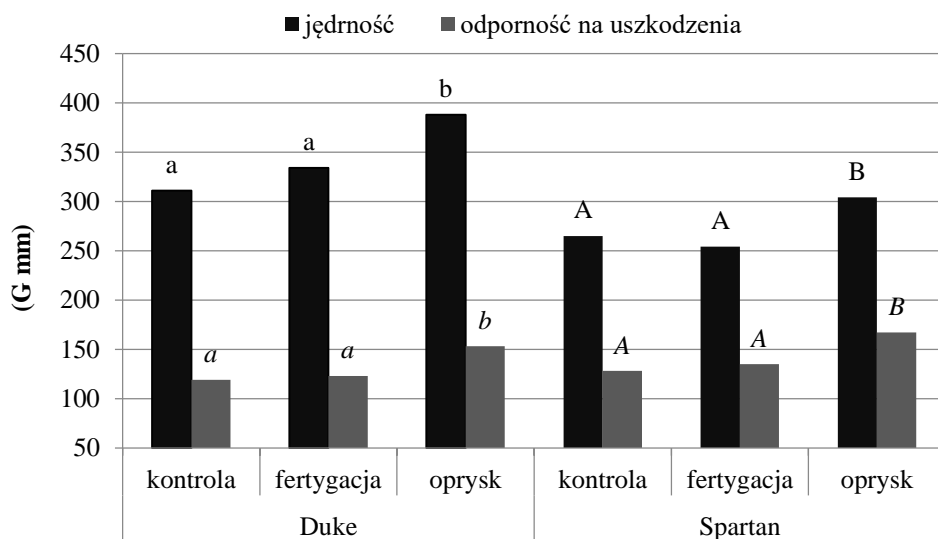
3. Wyniki i dyskusja

Problemem w uprawie borówki wysokiej jest przechowywanie owoców po zbiorze. Dlatego bardzo ważne są wszelkiego rodzaju zabiegi mające na celu zwiększenie jakości owoców borówki wysokiej. Jednym z parametrów definiujących tą cechę, a zarazem mającym istotne znaczenie dla konsumenta jest wielkość owoców. Przeprowadzone badania wykazały, że w przypadku obu badanych odmian zastosowanie preparatu Actisil wpłynęło na zwiększenie wielkości owoców (Rys. 1). Owoce nie odbiegały wielkością od uzyskanych w innych badaniach (Tryngiel-Gac i in. 2013).



Rys. 1. Wielkość owoców borówki wysokiej w zależności od sposobu aplikowania preparatu Actisil.

Wg zaleceń producenta, preparat powinien korzystnie wpływać na procesy metaboliczne roślin, m.in. fotosyntezę i gospodarkę wodną roślin. Wyniki nieopublikowane (w opracowaniu) wykazały znaczne zwiększenie zawartości krzemu w częściach wskaźnikowych (liście i owoce) w porównaniu do pozostałych roślin - kontrolnych i podlewanych tym preparatem. Zwiększona zawartość krzemu przyczyniła się do poprawy jakości owoców.



Rys. 2. Jędrność oraz odporność na uszkodzenia owoców borówki wysokiej w zależności od sposobu aplikowania preparatu Actisil.

Jędrność owoców pozwala ocenić przydatność odmiany do zbioru mechanicznego, przechowywania i transportu. Jędrność jest cechą odmianową, na którą wpływ mają również zabiegi agrotechniczne. Badane odmiany charakteryzują się owocami o mniejszej jędrności, dlatego ważne i uzasadnione jest poszukiwanie sposobów na poprawę tej cechy. Owoce bardziej jędrne są zazwyczaj

mniej podatne na uszkodzenia mechaniczne. Przeprowadzone badania wykazały, że zastosowanie krzemu w formie oprysku dolistnego miało istotny i pozytywny wpływ zarówno na jędrność owoców, jak i na ich odporność na uszkodzenia (Rys. 2). Stosowanie krzemu w formie fertygacji nie przyniosło zamierzonego efektu. Gleba w której rosły krzewy, miała duży kompleks sorpcyjny, zawierała dużo substancji mineralnych. Mogło to wpłynąć na ograniczone pobieranie tego składnika przez krzewy. Pozytywny wpływ Actisilu wykazano również na owocach jagody kamczackiej (Poterańska i in. 2015), a także na wzrost jędrności owoców śliw w trakcie zbioru i w okresie przechowywania w chłodni (Ochmian i in. 2006). Owoce badanych odmian miały wyższą jędrność niż owoce odmiany Duke, których jędrność była uzależniona od poziomu nawadniania roślin, i wynosiła średnio do 179 G mm, zebranych w doświadczeniu Ehreta i in. (2012).

Odpowiednia zawartość ekstraktu i kwasów organicznych wpływa na smak owoców, a zawartość polifenoli świadczy o ich wartości biologicznej. Przeprowadzone badania wykazały, że niezależnie od sposobu aplikowania preparatu Actisil, nie wpłynął on na zawartość ekstraktu w owocach. W niewielkim stopniu wpłynął również na zawartość kwasów organicznych (Tab. 1). Actisil podawany w formie oprysku spowodował natomiast nieznaczne obniżenie odczynu uzyskanego soku. Były to wartości zbliżone do uzyskanych w innym doświadczeniu przeprowadzonym przez Ochmiana i Kozos (2014). Wykazano również niejednoznaczny wpływ krzemu na zawartość polifenoli w owocach borówki wysokiej. Aplikowany w dolistnie w formie oprysku w owocach odmiany Duke istotnie obniżył zawartość polifenoli (o 9%), natomiast w owocach odmiany Spartan zwiększył (o 11%). Zawartość polifenoli w owocach odmiany Spartan, zebranych z krzewów kontrolnych, była zbliżona do wyników uzyskanych przez Skupień (2006).

Tab. 1. Skład chemiczny owoców borówki wysokiej w zależności od sposobu aplikowania preparatu Actisil.

badana cecha	Duke			Spartan		
	kontrola	fertygacja	oprysk	kontrola	fertygacja	oprysk
ekstrakt (%)	15,2 a	15,3 a	14,9 a	13,7 A	13,9 A	13,6 A
kwasowość (g·100 mL ⁻¹)	0,62 a	0,61 a	0,68 b	0,54 A	0,52 A	0,59 A
pH soku	3,81 b	3,76 ab	3,71 a	3,93 B	3,95 B	3,79 A
suma polifenoli (mg·100 mL ⁻¹)	354 b	367 b	321 a	274 A	262 A	305 B

4. Wnioski

Badania wykazały u obu badanych odmian pozytywny wpływ stosowania w formie oprysku preparatu Actisil. Zebrane owoce były większe, jędrniejsze i również bardziej odporne na uszkodzenia mechaniczne. Na zwiększenie jędrności owoców wpływ mogła mieć zwiększona zawartość krzemu w liściach i owocach.

Owoce odmiany Spartan opryskiwane nawozem krzemowym, charakteryzowały się wyższą zawartością polifenoli. Nie stwierdzono natomiast wpływu na zawartość ekstraktu w owocach.

Zastosowanie nawozu doglebowo, w formie płynnej - fertygacji, nie przyniosło spodziewanego efektu.

5. Literatura

Basiouny FM, Chen Y, Effects of harvest date, maturity and storage interval on postharvest quality of rabbiteye blueberry (*Vaccinium ashei* Reade). Proc Fla State Hortic Soc 101:281–284 (1988).

- Chiabrando V, Giacalone G i Rolle L (2009) Mechanical behaviour and quality traits of highbush blueberry during postharvest storage. *J Sci Food Agric* 2009; (89): 989–992.
- Ehret DL, Frey B, Forge T, Helmer T, Bryla DR (2012) Effects of drip irrigation configuration and rate on yield and fruit quality of young highbush blueberry plants. *HortScience*, 47(3), 414-421.
- Feng Ma J, Naoki Yamaji N (2006) Silicon uptake and accumulation in higher plants. *Abiotic stress series. Trends in Plant Science* 11 (8): 392-397.
- Forney C F (2009) Postharvest issues in blueberry and cranberry and methods to improve market-life. *ISHS Acta Horticulturae* 810: IX International Vaccinium Symposium (810): 785-798.
- Jackman R L, Stanley D W (1995) Perspectives in the textural evaluation of plant foods. *Trends in Food Science & Technology*, Volume 6, Issue 6, June, (6) 187-194.
- Michalska A, Łysiak G (2015) Bioactive Compounds of Blueberries: Post-Harvest Factors Influencing the Nutritional Value of Products. *International Journal of Molecular Sciences* (16):18642-18663.
- Neto C C (2007) Cranberry and blueberry: Evidence for protective effects against cancer and vascular diseases. *Molecular Nutrition Food Research, Berry Fruits*, (51): 652 – 664.
- Ochmian I, Grajkowski J, Ostrowska K, Mikiciuk G (2007) Wzrost, plonowanie oraz jędrność owoców dwóch odmian borówki wysokiej (*Vaccinium corymbosum* L.) uprawianej w trzech typach podłoża organicznych. *Zeszyty Naukowe Instytutu Sadownictwa i Kwiaciarnictwa*; (15): 47-54.
- Ochmian I, Grajkowski J, Popiel J (2006) Wpływ nawożenia dolistnego na jakość owoców śliw odmian Opal i Renkloda Ulena w czasie ich przechowywania. *Folia Univ. Agric. Stetin.*, 248, Agric., 101: 291-297.
- Ochmian I, Kozos K (2014) Fruit quality of highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) cv. 'Duke' depending on method of cultivation. *Folia Pomer. Univ. Technol. Stetin., Agric., Aliment., Pisc., Zootech*; 312(31): 117–126.
- Ochmian I, Kozos K (2014) Fruit quality of highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) cv. 'Duke' depending on the method of cultivation. *Folia Pomeranae Universitatis Technologiae Stetinensis. Agricultura, Alimentaria, Piscaria et Zootechnica*, 312(31), 117–126
- Paniagua A C, East A R, Heyes J A (2014) Interaction of temperature control deficiencies and atmosphere conditions during blueberry storage on quality outcomes. *Postharvest Biology and Technology*, September ,(95): 50-59.
- Poterańska N, Mijowska K, Ochmian I (2015) Wpływ aplikowanych dolistnie biostymulatorów i środków wapniowych na wzrost krzewów, plonowanie oraz jakość owoców jagody kamczackiej (*Lonicera caerulea* L.) odmiany Czarna. *Badania i Rozwój Młodych Naukowców w Polsce - Nauki Przyrodnicze*; (21): 132-138.
- Richmond K E i Sussman M (2003) Got silicon? The non-essential beneficial plant nutrient. *Current Opinion in Plant Biology*, Volume 6,(3):268-272.
- Skupień K (2006) Evaluation of chemical composition of fresh and frozen blueberry fruit (*Vaccinium corymbosum* L.). *Acta Sci. Pol. Hortorum Cultus*, 5(1), 19-25.
- Strik B C, Yarborough D (2004) Blueberry Production Trends in North America, 1992 to 2003, and Predictions for Growth. *HortTechnology* 15 (2)391-398.
- Trawczyński C (2013) Wpływ dolistnego nawożenia preparatem Herbagreen na plonowanie ziemniaków. *Ziemniak Polski, Agrotechnika i mechanizacja* (20): 29-33.
- Tryngiel-Gac, A, Treder W, Krawiec A, Klamkowski K (2013) Efektywność nawadniania kilku odmian borówki wysokiej. *Infrastruktura i Ekologia Terenów Wiejskich*, (1/II).
- Wróblewska W, Czernyszewicz E (2017) Poziom i zmienność cen owoców borówki wysokiej (*Vaccinium Corymbosum* L.) uzyskiwanych przez producenta i na rynku hurtowym w latach 2007-2016. *Roczniki Naukowe Stowarzyszenia Ekonomistów Rolnictwa i Agrobiznesu*; XIX (2) 275-281.

5. Wpływ zakwaszania gleby na jej odczyn i zasolenie oraz jakość owoców borówki wysokiej

The effect of soil acidification on its pH, salinity and quality of blueberry fruit

Monika Figiel-Kroczyńska, Ireneusz Ochmian

Katedra Ogrodnictwa, Wydział Kształtowania Środowiska i Rolnictwa, Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie
Opiekun naukowy: Ireneusz Ochmian

Ireneusz Ochmian: iochmian@zut.edu.pl

Słowa kluczowe: Brigitta Blue, Sunrise, wielkość owoców, *Vaccinium corymbosum*

Streszczenie

W Polsce borówka wysoka wciąż jest względnie nową rośliną sadowniczą, która jest coraz chętniej uprawiana. Wymagania glebowe i siedliskowe borówki różnią się w porównaniu do innych roślin sadowniczych. Gleby przeznaczone pod uprawę powinny mieć odpowiednio niski odczyn gleby. Pod uprawę borówki nadają się przede wszystkim gleby kwaśne, próchniczne lekkie oraz dostatecznie wilgotne.

W pracy określono wpływ mieszaniny kwasu azotowego, siarkowego i fosforowego, nawozów Wigor S i fosforan mocznika na zmiany odczynu podłoża, jego zasolenie oraz wielkość owoców dwóch odmian borówki wysokiej.

Wszystkie zastosowane preparaty spowodowały obniżenie odczynu podłoża. W największym stopniu, poniżej wymagań borówki wysokiej, przyczynił się do tego nawóz Wigor S. Zastosowanie nawozu Wigor S spowodowało również największe zasolenia gleby. Krzewy nawożone fosforanem mocznika miały największe owoce. Duże owoce zebrano również z obiektów gdzie stosowano mieszaninę kwasów.

1. Wstęp

Borówka wysoka (*Vaccinium corymbosum* L.), zwana także borówką amerykańską, jest wieloletnią rośliną należącą do rodziny wrzosowatych *Ericaceae* (Vander 1980). Rodzaj *Vaccinium* obejmuje wiele roślin o szerokim zasięgu geograficznym, w tym kilkanaście gatunków posiadających znaczenie gospodarcze (Forney i in. 2012). Naturalnym miejscem występowania borówki wysokiej są północno-wschodnie regiony Ameryki Północnej, gdzie ten gatunek był pierwotnie najintensywniej uprawiany. W Polsce borówka wciąż jest względnie nową rośliną sadowniczą, choć cieszy się coraz większym zainteresowaniem (Loli i in. 2017, Smolarz 2003). Krzewy borówki wysokiej osiągają zazwyczaj wysokość od 1,5 - 3,0 m. Charakteryzują się wzniesionymi, grubymi pędami, z których wyrastają pąki śpiące, wytwarzane u podstawy krzewu oraz z szyjki korzeniowej. Barwa pędów jednorocznych zmienia się z początkowo zielonej na ciemno-czerwoną, lub brunatną. Pędy te drewnieją w drugim roku, tworząc wieloletnią koronę (Smolarz 2003). System korzeniowy borówek jest dobrze rozgałęziony, choć roślina nie posiada korzeni włośnikowych. Ich funkcję pełnią cienkie oraz liczne korzenie właściwe, przez które krzewy pobierają wodę oraz składniki pokarmowe. Zazwyczaj tworzą się one wokół grubszych korzeni (Gough 1993, Smolarz 2003).

Warunki klimatyczne występujące w Polsce są jednym z czynników sprzyjających uprawie borówki (Koszański i in. 2008). Gatunek ten wymaga co najmniej 160-dniowego okresu wegetacji oraz chłodu podczas spoczynku zimowego (Pliszka 2002, Krzewińska i in. 2010). Na plantacjach umiejscowionych w rejonach chłodnych, wiosenny mróz może powodować znaczne straty u młodych pędów borówki wysokiej, jak również w ich pąkach kwiatowych, a nawet powodować zamieranie krzewów (Retamales i Hancock 2012).

Wymagania glebowe i siedliskowe borówki różnią się w porównaniu do innych roślin sadowniczych. Pod uprawę borówki nadają się przede wszystkim gleby kwaśne, próchniczne lekkie oraz dostatecznie wilgotne. Zawartość próchnicy w glebie nie powinna wynosić mniej niż 3,5%,

a optymalne warunki dla wzrostu krzewów zachodzą, gdy zawartość masy organicznej przekracza 7%. Gleby o niskim poziomie wód gruntowych nie są wartościowe dla uprawy tego gatunku. Poziom wody gruntowej powinien utrzymywać się na wysokości 60 - 75 cm, gdyż rośliny te charakteryzują się wysokim zapotrzebowaniem na wodę podczas okresu wegetacji. Optymalna temperatura gleby wynosi wówczas od 18 do 21°C, podczas której borówki cechują się odpowiednią siłą wzrostu. Na płytkie korzenie borówki korzystnie działa również wilgotność oraz przewodność w górnej warstwie gleby (Pliszka 2002, Łabanowska i Tartanus 2017). Odpowiedni odczyn gleby pod uprawę borówki powinien znajdować w przedziale 3,5-4,0 pH (Bryk 2013). Najwartościowszymi stanowiskami dla tego gatunku są dobrze nasłonecznione równiny, z naturalnymi osłonami przed wiatrem. Szkodliwe są natomiast zastoiska mrozowe oraz gleby posiadające nieregularne stosunki wodne (Pliszka 2002, Łabanowska i Tartanus 2017). Krzewy borówki wysokiej mogą być sadzone na różnych typach gleb, które wymagają jednak starannego przygotowania (Krzewińska i in. 2010). W wielu przypadkach najważniejszym elementem w przygotowaniu gleby jest obniżenie odczynu, do optymalnego dla tych krzewów (Finn i in. 1993). Najczęściej do zakwaszania wykorzystywana jest siarka w formie granulowanej i pylistej, jak również użycie nawozów zawierających związki zakwaszające glebę (Hart i in. 2003). W przypadku siarkowania, proces ten należy wykonać co najmniej rok przed założeniem plantacji (Łabanowska i Tartanus 2017). Jeśli pH nie różni się w większym stopniu od wartości optymalnych, proces siarkowania można zastąpić poprzez zastosowanie kwaśnego torfu, trocin lub zmielonej kory sosnowej. Obniżanie odczynu gleby można wykonać również przez użycie odpadów z bawełny czy łusek z orzechów pekanowych (Łabanowska i Tartanus 2017, Ruter i in. 2000). Odpowiednie nawożenie może również wpłynąć korzystnie na odczyn gleby. Najkorzystniejszym nawozem azotowym jest siarczan amonu, a stosowanie go wraz z nawadnianiem obniżania odczynu gleby i pomaga utrzymać go na odpowiednim poziomie (Bryk 2013, Treder i in. 2007).

Celem pracy było określenie wpływu zastosowanych substancji na zmiany odczynu podłoża, jego zasolenie oraz wielkość owoców dwóch odmian borówki wysokiej.

2. Materiał i metody badań

W doświadczeniu przeprowadzonym w Katedrze Ogrodnictwa Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie, przebadano wpływ wybranych sposobów obniżania odczynu gleby na skład chemiczny podłoża oraz wzrost krzewów i jakość owoców dwóch odmian borówki wysokiej (*Vaccinium corymbosum* L.) 'Brigitta Blue' oraz 'Sunrise'.

'Brigitta Blue' - odmiana wyhodowana w Australii z nasion odmiany 'Lateblue', z wolnego zapylenia, wprowadzona do uprawy w 1980 roku. Charakteryzuje się średnio późnym okresem dojrzewania jagód, wytrzymałością owoców na transport oraz dobrym przechowywaniem w chłodni. Owoce są średniej wielkości, bardzo jędrne i pokryte intensywnym, woskowym nalotem.

'Sunrise' - odmiana umiarkowanie plenna, powstała ze skrzyżowania G-180 x Me-US 6620, wprowadzona do uprawy w 1989 roku. Plonuje umiarkowanie obficie, jagody są średniej wielkości, wyraźnie spłaszczone, o średnio intensywnym nalocie woskowym.

Badania przeprowadzono na glebie lekkiej, piaszczystej o pH 5,8, zawartości materii organicznej 29,4 g w kg gleby. Zawartość węgla organicznego wynosiła 6,75 g w kg gleby, a EC 0,24 mS m⁻¹. W tej glebie, w wyniku długotrwałego ugorowania nastąpił naturalny proces zakwaszania. Jednak odczyn 5,8 jest nieznacznie za wysoki dla wymagań borówki wysokiej. Plantacja borówki wysokiej została założona na skraju lasu, na nieużytkach rolnych.

W celu obniżenia odczynu podłoża zastosowano:

1. kwasy - 3 dawki kwasu azotowego wiosną do 3 dekady maja, następnie kwas siarkowy 3 dawki, od 2 dekady lipca kwas fosforowy. Kwasy rozpuszczano w wodzie do odczynu ok pH 4,5, którą podlewano glebę.
- b) fosforan mocznika - zastosowano 300 kg nawozu na ha (50 kg N/ha) wiosną w trzech dawkach. Jest to całkowicie rozpuszczalny, krystaliczny nawóz wolny od chlorków i sodu. Zawiera 17.5 % azotu (N-NH₂), 44.0 % fosforu (P-P₂O₅). Odczyn 1% roztworu wynosi 1.5-2.0.
- c) Wigor S - zastosowano 50 kg nawozu (45 kg S/ha). **WIGOR S** jest nawozem granulowanym, zawierającym **90% siarki**. Zawarty w nawozie bentonit (pH>7), dzięki swoim właściwościom

pęcznienia w kontakcie z wodą, powoduje rozdrobnienie siarki. Cząsteczki siarki ulegają w glebie utlenieniu przez mikroorganizmy do postaci siarczanowej przyswajalnej przez rośliny. Efekt wzrostu siarczanów w glebie następuje już po siedmiu dniach od zastosowania nawozu, a dalsze systematyczne uaktywnianie się siarki zapewnia odpowiednie zaopatrzenie roślin w ten pierwiastek w trakcie całego okresu wegetacji.

d) kontrola

2.1 Układ doświadczenia

Badania obejmowały doświadczenie dwuczynnikowe, założone w układzie podbloków losowanych, w trzech powtórzeniach, po siedem krzewów w każdym powtórzeniu. Pierwszy czynnik stanowiły odmiany borówki wysokiej – ‘Brigitta Blue’ oraz ‘Sunrise’. Drugim czynnikiem był sposób zakwaszania podłoża.

2.2 Schemat doświadczenia

2 odmiany (‘Brigitta Blue’ i ‘Sunrise’) x 3 sposoby zakwaszania x 3 powtórzenia po 7 krzewów = 63 krzewy dla każdej odmiany + 21 krzewów kontrolnych

Na plantacji nie stosowano środków ochrony roślin przed chorobami grzybowymi. W zimie wykonano oprysk preparatem na bazie parafiny w celu zabezpieczenia roślin przed szkodnikami. Począwszy od marca krzewy nawożone były siarczanem amonu i saletrą amonową w łącznej dawce 50 kg N na hektar (z wyłączeniem krzewów nawożonych fosforanem mocznika). Po zakończeniu kwitnienia, krzewy do września dokarmiano nawozami zawierającymi potas w łącznej dawce 100 kg K na hektar.

2.3 Warunki klimatyczno-glebowe doświadczenia

Średnie miesięczne temperatury powietrza podczas sezonu wegetacyjnego w roku 2017, utrzymane były na zbliżonym poziomie do danych z wielolecia 1951-2012 (Tab. 1). W miesiącach od maja do lipca, podczas dojrzewania owoców borówki wysokiej, wystąpiły natomiast wysokie odchylenia wartości opadów. Silne opady deszczu osiągały w czerwcu wartość 118,1 mm, zaś w lipcu 182,4 mm, co stanowiło ponad dwukrotną wartość średnich z poprzednich lat. Odmienny przebieg pogody zaobserwowano w roku 2018. Średnia temperatura w okresie wegetacyjnym była o 4C wyższa, w porównaniu z okresem wieloletnim. W każdym miesiącu zanotowane temperatury były znacznie wyższe, w porównaniu do wielolecia jak i do roku 2017. Znacznie wyższym temperaturom towarzyszyły okresy suszy. W okresie od kwietnia do października suma opadów wyniosła 214 mm, podczas gdy średnia wieloletnia wynosi 391 mm.

Tab. 1. Średnie temperatury powietrza oraz opadów podczas sezonu wegetacyjnego w roku 2017 i 2018 (dane Stacji Meteorologicznej w Szczecinie Dąbiu) oraz w ujęciu wieloletnim 1951-2012

		Miesiąc							
		IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	
Rok badań	Średnia temperatura powietrza (°C)								Średnia
1951-2012	8,0	13,0	16,4	18,2	17,6	13,8	9,2	13,7	
2017	6,8	13,5	16,8	17,2	17,9	13,3	11,0	13,8	
2018	11,2	16,7	21,5	22,7	23,8	16,6	11,7	17,7	
		Opady deszczu (mm)							Suma
1951-2012	39,7	62,9	48,2	69,6	74,2	58,7	37,3	391,6	
2017	42,3	99,2	118,1	182,4	45,4	31,6	95,1	614,1	
2018	32,2	21,5	28,9	55,3	19,4	25,7	31,2	214,2	

W celu określenia różnic przeprowadzono analizę wariancji, a następnie dokonano oceny istotności różnic przy użyciu testu Tukeya, na poziomie istotności = 0,05. Analizy statystyczne przeprowadzono za pomocą oprogramowania STATISTICA 12.5.

3. Wyniki i dyskusja

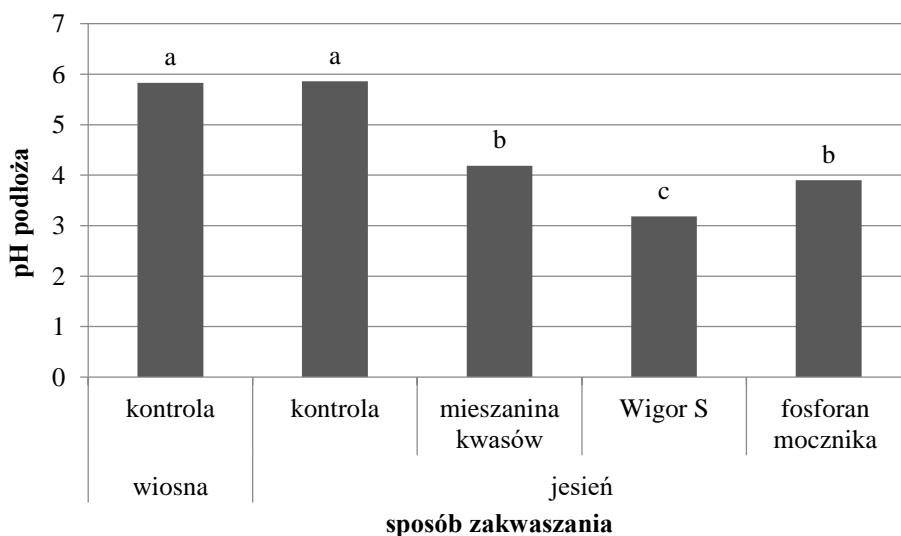
Badania przeprowadzone w latach 2017-2018 wykazały, że wszystkie zastosowane preparaty spowodowały obniżenie odczynu podłoża, pomimo bardzo zróżnicowanych warunków pogodowych, panujących w trakcie trwania doświadczenia (Tab. 1). W największym stopniu nastąpiło obniżenie pH podłoża w obiektach, gdzie zastosowano Wigor S (Ryc. 1). Odczyn na poziomie 3,2 jest jednak za niski w stosunku do wymagań borówki wysokiej. Uzasadnione wydaje się więc stosowanie mieszaniny kwasów lub nawozu fosforan mocznika. Poza wpływem na obniżenie odczynu, dostarczają również niezbędne składniki pokarmowe - azot i fosfor. Pozytywny wpływ fosforanu mocznika zaobserwował również Ochmian i in. (2018).

Zasolenie jest jednym z czynników degradacji gleb. Zasoleniem gleby określa się wagową zawartość soli w jednostce objętości wody glebowej i jest wyrażane w gramach na litr wody. Za proces zasolenia gleby odpowiedzialne jest nadmierne stężenie składników mineralnych w glebie, tj. aniony: azotowe, chlorkowe, siarczanowe - kationy: sodu, potasu, glinu, żelaza oraz kwaśne węglany sodu, potasu i magnezu. Skutkiem zasolenia gleby jest występowanie suszy fizjologicznej dla roślin, czyli stanu polegającego na utracie możliwości pobierania składników mineralnych z roztworu glebowego z powodu wzrostu ciśnienia osmotycznego oraz toksycznych właściwości tych soli.

Klasyfikację zasolenia gleb najczęściej przeprowadza się na podstawie przewodnictwa elektrycznego (EC mS/m) wyciągów wodnych gleby.

Szkodliwość zasolenia określa się na podstawie skali:

- do 0,5 mS/cm - koncentracja soli tolerowana przez wszystkie rośliny,
- do 1,0 mS/cm - wartości graniczne zasolenia dla roślin bardzo wrażliwych,
- do 2,0 mS/cm - występowanie objawów zasolenia przy dobrym uwilgotnieniu u wielu gatunków roślin, a przy przedłużającym się okresie suszy koncentracja soli dla większości roślin jest szkodliwa,
- powyżej 2,0 mS/cm - koncentracja toksyczna dla prawie wszystkich gatunków.



Rys. 1. Wpływ zastosowanych preparatów na zmianę odczynu podłoża w trakcie sezonu wegetacyjnego.

Jako wskaźnika zasolenia gleby używa się również procentowej zawartości soli w suchej masie utworów. Określa się ją na podstawie suchych pozostałości wyciągu wodnego, a otrzymane wyniki określa się zgodnie z przedziałem zasolenia:

- 0 - 0,20 % soli - utwory niezasolone,

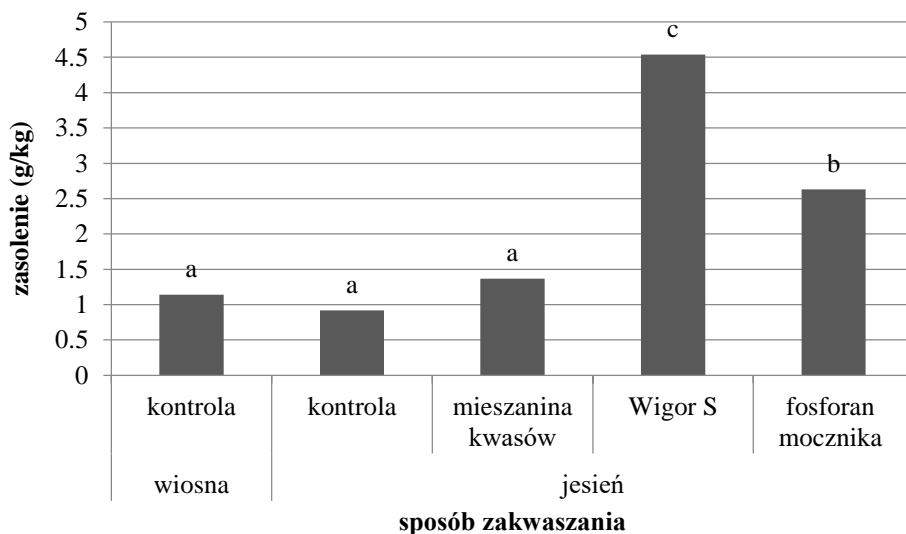
- 0,20 - 0,35 % soli - utwory słabo zasolone,
- 0,35 - 0,55 % soli - utwory umiarkowanie zasolone,
- powyżej 0,55 % soli - utwory silnie zasolone

Poziom zasolenia ma wpływ na procesy życiowe roślin:

- 0 - 5 g/dm³ - stężenie nieszkodliwe dla procesów życiowych,
- 10 - 12 g/dm³ - stężenie hamujące rozwój prawie wszystkich gatunków,
- 20 - 25 g/dm³ - stężenie toksyczne (Gołda 2005)

Zastosowanie nawozu Wigor S w największym stopniu wpłynęło na zwiększenie zasolenia gleby (Ryc. 2). Stwierdzono 4,5 g soli w kilogramie podłoża, podczas gdy fosforan mocznika podniósł stężenie soli do 2,6 g. Były to jednak ilości, które nie powinny negatywnie odbijać się na wzroście i plonowaniu krzewów borówki wysokiej. Poziom zasolenia gleby, na której stosowano mieszaninę kwasów był porównywalny z podłożem kontrolnym.

Przeprowadzona analiza (Ryc. 3) wykazała istotny wpływ zastosowanych substancji do zakwaszania podłoża na masę 100 owoców badanych odmian borówki wysokiej. Owoce o największej masie zebrano z roślin odmiany 'Brigitta Blue' traktowanych fosforanem mocznika, a najmniejsze w przypadku odmiany 'Sunrise' uprawianej na obiekcie kontrolnym i po zastosowaniu nawozu Wigor S. Porównując badaną cechę w zależności od odmiany wykazano, iż masa 100 owoców była istotnie większa dla odmiany 'Brigitta Blue'. Pozytywny wpływ nawozu fosforan mocznika, ale również mieszaniny kwasów, może mieć związek z zawartością w nich azotu, który jest pierwiastkiem plonotwórczym. Bal i in. (2004) podają, że średnia masa jagody dla odmiany 'Brigitta Blue' wynosi 1,7 g, podczas gdy odmiana 'Sunrise' - 1,8 g. Owoce zebrane z własnego doświadczenia odznaczały się istotnie większą masą we wszystkich kombinacjach. Znacznie większe, porównywalne do przedstawionych w pracy, wielkości owoców tych odmian stwierdził Ochmian i Kozos (2015).



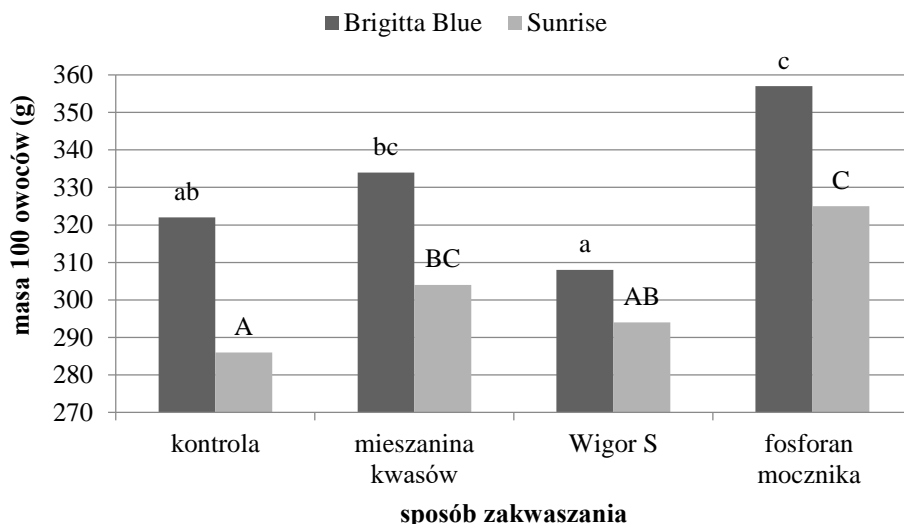
Rys. 2. Wpływ zastosowanych preparatów na zasolenie podłoża w trakcie sezonu wegetacyjnego.

4. Wnioski

Wszystkie zastosowane preparaty (mieszanina kwasu azotowego, siarkowego i fosforowego; Wigor S; fosforan mocznika) spowodowały obniżenie odczynu podłoża. W największym stopniu przyczynił się do tego nawóz Wigor S. Uzyskane pH podłoża było jednak za niskie w stosunku do wymagań borówki wysokiej.

Zastosowanie nawozu Wigor S spowodowało największe zasolenia gleby, jednak jego poziom nie powinien mieć negatywnego wpływu na rośliny.

Największy, pozytywny wpływ na wielkość owoców miał nawóz fosforan mocznika. Duże owoce zebrano również z obiektów gdzie stosowano mieszaninę kwasów.



Rys. 3. Wpływ zastosowanych preparatów na wielkość owoców borówki wysokiej.

5. Literatura

- Bal JJ, Balkhoven J, Peppelman G (2004) May. Results of testing highbush blueberry cultivars in the Netherlands. In VIII International Symposium on Vaccinium Culture 715: 157-162.
- Bryk H. (2013) *Metodyka Integrowanej Ochrony Borówki Wysokiej dla Doradców*. Skierniewice :1-35
- Finn CE, Luby JJ, Rosen CJ, Ascher PD (1993) Blueberry germplasm screening at several soil pH regimes. I. Plant survival and growth. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 118(3): 377-382.
- Forney CF, Kalt W, Vander-Kloet SP (2012) Comparison of berry composition of selected *Vaccinium* species (Ericaceae) with *Gaylussacia dumosa*. *Botany* 90(5): 355-363.
- Gołda T (2005) *Rekultywacja*. Uczelniane Wydawnictwa Naukowo-Dydaktyczne AGH, Kraków.
- Gough RE (1993) *The highbush blueberry and its management*. CRC Press.
- Hart JM, Horneck D, Cogger CG, Bell NNC, Stevens R (2003) Acidifying soil for blueberries and ornamental plants in the yard and garden west of the Cascade Mountain Range in Oregon and Washington.
- Koszański Z, Rumaszy-Rudnicka E, Friedrich S (2008) Wpływ nawadniania i nawożenia NPK na budowę anatomiczną i morfologiczną oraz plonowanie borówki wysokiej (*Vaccinium corymbosum* L.). *Acta Agrophysica* 11(3): 677-684.
- Krzewińska D, Smolarz K, Tryngiel-Gać A, Chlebowska D (2010) Wpływ sposobu przygotowania gleby na wzrost i owocowanie borówki wysokiej (*Vaccinium corymbosum* L.) odmiany 'Bluecrop'. *Zeszyty Naukowe Instytutu Sadownictwa i Kwiaciarnictwa* 18: 71-81.
- Łabanowska B, Tartanus M (2017) *Metodyka Integrowanej Produkcji Borówki Wysokiej, Opracowanie zbiorowe Instytutu Ogrodnictwa, Warszawa: 1-37.*
- Loli RLR, Sánchez M, Pérez E (2017) Internal morphology and histology of blueberry *Vaccinium corymbosum* L.(Ericaceae) in Lima, Peru. *Agronomía Colombiana* 35(2): 176-181.
- Ochmian I, Kozos K (2015) Influence of foliar fertilisation with calcium fertilisers on the firmness and chemical composition of two highbush blueberry cultivars. *Journal of Elementology* 20(1): 185-201.

- Ochmian I, Oszmiański J, Jaśkiewicz B, Szczepanek M (2018). Soil and highbush blueberry responses to fertilization with urea phosphate. *Folia Horticulturae* 30(2): 295-305
- Pliszka K (2002) Borówka wysoka. Praca zbiorowa. Państwowe Wydawnictwo Rolnicze i Leśne. Warszawa.
- Retamales JB, Hancock JF (2012). Blueberries (Vol. 21). Cabi.
- Ruter J, NeSmith S, Clark J, Otts T, Scarborough S, Mullinix B, Krewer G (2000) Performance of low cost organic materials as blueberry substrates and soil amendments. In VII International Symposium on Vaccinium Culture 574: 273-279.
- Smolarz K (2003) Uprawa borówki i żurawiny. Hortpress Sp. zoo. Warszawa.
- Treder W, Krzewińska D, Borowik M (2007) Wpływ sposobu nawożenia borówki na wzrost i plonowanie. *Zeszyty Naukowe Instytutu Sadownictwa i Kwiaciarstwa* 15: 35-45.
- Vander-Kloet SP (1980) The taxonomy of the highbush blueberry, *Vaccinium corymbosum*. *Canadian Journal of Botany* 58(10): 1187-1201.

6. Charakterystyka enzymów prozapalnych: lipooksygenazy (LOX), cyklooksygenazy (COX) i oksydazy ksantynowej (XO) oraz rola fitozwiązków jako potencjalnych inhibitorów tych enzymów

Characteristics of pro-inflammatory enzymes: lipoxygenase, cyclooxygenase and xanthine oxidase and the role of phytochemicals as potential inhibitors of these enzymes

Habza-Kowalska Ewa⁽¹⁾, Szafrąńska Jagoda⁽²⁾, Bochnak Justyna⁽¹⁾, Mazurkiewicz Ilona⁽³⁾

⁽¹⁾Katedra Biochemii i Chemii Żywności, Wydział Nauk o Żywności i Biotechnologii, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

⁽²⁾Zakład Technologii Mleka i Hydrokoloidów, Wydział Nauk o Żywności i Biotechnologii, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

⁽³⁾Instytut Biologicznych Podstaw Produkcji Zwierzęcej, Wydział Biologii, Nauk o Zwierzętach i Biogospodarki, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
Opiekun naukowy: Urszula Gawlik-Dziki

Habza – Kowalska Ewa: ewa.habza1@gmail.com

Słowa Kluczowe: polifenole, wolne rodniki, antyoksydanty, stan zapalny

Streszczenie

Stres oksydacyjny może prowadzić do przewlekłego stanu zapalnego, który z kolei może pośredniczyć w większości chorób przewlekłych takich jak nowotwory, cukrzyca oraz choroby sercowo-naczyniowe, neurologiczne i płucne. Czynnikiem, które mogą w znacznym stopniu przyczynić się do pogłębienia stresu oksydacyjnego są enzymy prooksydacyjne. Głównymi enzymami, których aktywność powoduje stres oksydacyjny są lipooksygenaza (LOX) i cyklooksygenaza (COX) oraz oksydaza ksantynowa (XO). Polifenole, należące do metabolitów wtórnych roślin, obecne są w diecie człowieka i szeroko stosowane zarówno w celach kosmetycznych, jak i leczniczych. Mają wiele właściwości biologicznych korzystnych dla organizmu, w tym antyoksydacyjne, immunomodulacyjne, działają przeciwnowotworowo i przeciwdrobnoustrojowo. Większość badań nad biodostępnością polifenoli wykorzystuje głównie czyste pojedyncze cząsteczki (wyizolowane z żywności lub zsyntetyzowane chemicznie), chociaż ich biodostępność z całej żywności może być zasadniczo różna. Istnieją badania potwierdzające zdolność hamowania XO przez ekstrakty roślinne, a tym samym wykazujące, że preparaty roślinne mogą być alternatywą dla leków wytwarzanych przez syntezę chemiczną. Na szczególną uwagę zasługuje fakt, że preparaty roślinne, w przeciwieństwie do leków syntetycznych, nie powodują niepożądanych skutków ubocznych dla organizmu. W przeciwieństwie do syntetycznych środków farmaceutycznych, opartych na pojedynczych substancjach chemicznych, wiele fitozwiązków wywiera korzystne działanie poprzez addytywne lub synergistyczne współdziałanie kilku związków chemicznych w pojedynczych lub wielu miejscach docelowych związanych z procesem fizjologicznym.

1. Wstęp

Stan zapalny to naturalny mechanizm obronny przeciwko patogenom. Związany jest z wieloma patogennymi chorobami, takimi jak infekcje bakteryjne czy wirusowe, ekspozycja na alergeny, promieniowanie i toksyczne chemikalia, choroby autoimmunologiczne i przewlekłe, otyłość, spożywanie alkoholu, palenie tytoniu i wysoko kaloryczna dieta. Wiele chorób przewlekłych związanych z wysoką produkcją reaktywnych form tlenu (ROS) powoduje stres oksydacyjny i utlenianie białek. Głównymi enzymami, których aktywność powoduje stres oksydacyjny, są lipooksygenaza (LOX) i cyklooksygenaza (COX) (Zhang i in. 2003).

2. Przegląd literatury

Lipooksygenazy (LOX, EC 1.13.11.12) występują powszechnie u roślin i zwierząt. Znane są jako diooksygenazy zawierające żelazo. Lipooksygenazy to grupa enzymów zdolnych do katalizowania utleniania kwasów tłuszczowych i estrów o układzie cis, cis-1,4-pentadienu w celu wytworzenia sprzężonych nienasyconych kwasów tłuszczowych oraz wodoronadtlenków. Analiza 15 – lipooksygenazy – 1 i stabilizowanej 5 – lipooksygenazy wykazała, że struktura lipooksygenazy składa się z N - końcowej domeny beta – cylindrycznej i dłuższej C – końcowej helikalnej domeny katalitycznej, otaczającej pojedynczy atom niehemowego żelaza. Przykładem reakcji katalizowanej przez większość lipooksygenaz jest reakcja wielonienasyconych kwasów tłuszczowych z tlenem z wytworzeniem wodoronadtlenku kwasu tłuszczowego. Proces ten przebiega w kilku etapach. Pierwszym etapem jest ograniczenie szybkości wiązania wodoru z węgla metylenowego. Następnym jest utworzenie rodnika kwasu tłuszczowego na tym węglu. Kolejnym etapem jest przegrupowanie rodnika do innego centrum węgla i dodanie tlenu cząsteczkowego do wcześniejszego przegrupowanego centrum rodnikowego węgla. Następnie dochodzi do utworzenia wiązania peroksyrodnika z tym węglem. Na końcu zachodzi redukcja peroksyrodnika do odpowiadającego mu anionu (Kuhn i in. 2015). W komórkach ssaków substraty wielonienasyconych kwasów tłuszczowych są utrzymywane na niskim poziomie, ponieważ działanie lipooksygenazy zależy od ich dostępności. Kluczowymi regulatorami w tworzeniu metabolitów zależnych od lipooksygenazy są fosfolipazy A2 i lipazy diacyloglicerolowe, które są aktywowane podczas stymulacji komórek. Ponadto, aktywowane komórki niekiedy mogą przenosić uwolnione wielonienasycone kwasy tłuszczowe do pobliskich komórek, które następnie są zdolne do ich metabolizowania podczas przebiegu szlaków lipooksygenazy w procesie nazywanym metabolizmem międzykomórkowym lub biosyntezą międzykomórkową (Capra i in. 2015).

Lipooksygenazy są najbardziej powszechnymi enzymami roślin. Są zaangażowane w wiele różnych procesów fizjologicznych, takich jak wzrost, odporność na szkodniki lub starzenie się czy reakcje na zranienie. Enzym ten występuje również u ssaków. Izoenzymy lipooksygenaz biorą udział w metabolizmie eikozanoidów, takich jak prostaglandyny lub nieklasycznych eikozanoidów. Ludzkie lipooksygenazy znajdują się na chromosomie 17.p13 za wyjątkiem genu 5-LOX (zlokalizowanego na chromosomie 10q11.2) Ludzkie lipooksygenazy wraz z ich produktami są powiązane z chorobami o podłożu zapalnym i alergicznym, miażdżycą i kilkoma rodzajami nowotworów (Barden i in. 2016).

Cyklooksygenaza (COX, EC 1.14.99.1) znana jako syntaza prostaglandyny H lub syntaza prostaglandynowa (PTGS) jest katalizatorem pierwszych dwóch etapów biosyntezy prostaglandyn (PG). Zamienia ona kwas arachidonowy w prostanoidy, które obejmują prostaglandyny (PG), tromboksan i prostacyklinę. Może być wytwarzana w odpowiedzi na różne bodźce, na przykład hormony, mitogeny, cytokiny, różne mediatory zapalne i czynniki wzrostu. Istnieją dwie izoformy COX: COX-1 i COX-2. COX-1 jest enzymem, który odpowiada za produkcję prostanoidów w większości tkanek (Kirkby 2013). Izoformy COX są hamowane poprzez działanie niesteroidowych leków przeciwzapalnych, co wskazuje na rolę tych enzymów w gorączce i bólu, stanach zapalnych i powstawaniu nowotworów. Enzymy COX mają znaczenie kliniczne, ponieważ są mediatorami regulującymi wiele funkcji układu nerwowego, układu sercowo-naczyniowego, przewodu pokarmowego i układu moczowo-płciowego. Hamowanie COX przez aspirynę i inne niesteroidowe leki przeciwzapalne łagodzi stany zapalne, zakrzepowe, neurodegeneracyjne i onkologiczne. COX-2 jest enzymem występującym w miejscach zapalenia i infekcji, a także w obszarach niezwiązanych z zapaleniem, takich jak mózg, grasicca, jelito lub nerka. COX-2 może być hamowany przez leki takie jak ibuprofen, naproksen lub diklofenak (Fitzpatrick 2004).

Aktywność cyklooksygenazy stwierdzono również w błonie naczyniowej gałki oka i w spojówce. Badacze zaobserwowali mniejszą aktywność COX w stosunku do błony naczyniowej oka i spojówki, w innych częściach oka: rogówce, soczewce i siatkówce. Wysoka aktywność COX w błonie naczyniowej gałki ocznej i spojówce jest ważna dla organizmu z powodu wytwarzania PGE2 i PGF2, które obniżają ciśnienie śródgałkowe, a także zmniejszają ryzyko zapalenia. Badania wykazały w tych tkankach wykrywalne ilości produktów COX pochodzących z kwasu arachidonowego (Kirkby 2013).

Syntaza prostaglandyny H zawiera dwa aktywne miejsca. Pierwszym z nich jest hem o aktywności peroksydazy. Drugim miejscem jest miejsce cyklooksygenazy, które jest odpowiedzialne za redukcję PGG₂ do PGH₂, gdzie kwas arachidonowy jest przekształcany w prostaglandynę G₂. Pomiędzy obydwoma miejscami znajduje się reszta tyrozyny utleniana przez hem do formy rodnikowej, a także służąca do wydzielenia atomu wodoru z substratu kwasu arachidonowego (Cleland 2006).

Niesteroidowe leki przeciwzapalne (NLPZ) są głównymi inhibitorami COX. Typowe inhibitory COX nie są selektywne; hamują wszystkie typy COX, czego skutkiem jest hamowanie syntezy prostaglandyn i tromboksanu. Mają działanie zmniejszające stan zapalny, a także działanie przeciwbólowe i przeciwzapalne. Niekorzystnym działaniem NLPZ jest podrażnienie błony śluzowej żołądka, a ponieważ NSAID są kwasowe, mogą powodować dodatkowe uszkodzenia przewodu żołądkowo-jelitowego. Naturalnymi inhibitorami COX są między innymi grzyby, na przykład maitake, mogące częściowo hamować COX-1 i COX-2 (Zhang i in. 2003), oleje rybne mogące dostarczać alternatywne kwasy tłuszczowe, których formy są przekształcone przez cyklooksygenazę w przeciwzapalne prostacykliny zamiast prozapalne prostaglandyny. Innym inhibitorem, który hamuje tylko COX-1 jest hiperforyna, wykazująca kilka razy silniejsze działanie niż aspiryna (Cleland 2006), natomiast inhibicja COX-2 jest możliwa dzięki zastosowaniu kalcytriolu. Do najczęstszych działań niepożądanych niesteroidowych leków przeciwzapalnych (NLPZ) należą: problemy żołądkowe, w tym ból, zaparcia, biegunka, wzdęcia, nudności i wrzody żołądka, problemy z nerkami, niedokrwistość, zawroty głowy, obrzęk nóg, nieprawidłowe wyniki testów wątrobowych (badania krwi), bóle głowy, podatność na powstawanie siniaków, dzwonięcie w uszach, wysypka. (Moreno i in. 2006). Wymienione działania niepożądane potwierdzają słuszność badań przeprowadzonych z użyciem związków fitochemicznych zamiast związków syntetyzowanych chemicznie.

Oksydaza ksantynowa (XO, zwana także "XAO", EC 1.17.3.2) jest postacią oksydoreduktazy ksantynowej. Enzym ten katalizuje utlenianie hipoksantyny do ksantyny, utlenianie ksantyny do kwasu moczowego i wytwarzanie reaktywnych form tlenu, takich jak rodniki ponadtlenkowe i nadtlenek wodoru. Bierze również udział w katabolizmie puryn u niektórych gatunków, w tym u ludzi. Jest to flawoproteina, w budowę której wchodzi molibden, niehemowe żelazo i labilna siarka. Oksydaza ksantynowa może występować w dwóch postaciach: pierwszej o aktywności dehydrogenazy (dehydrogenaza ksantynowa), drugiej o aktywności oksydazy. Pierwsza przekształca się w drugą poprzez utlenianie grup tiolowych enzymu w obecności wysokich stężeń tlenu (Ying i in. 2014).

Masa cząsteczkowa XO wynosi 290 kDa. Jest to homodimer należący do rodziny białek zawierających jeden molibden, FAD oraz dwa centra żelazowo-siarkowe (2Fe-2S) typu ferredoksyny w każdej z dwóch niezależnych podjednostek. Na czas reoksydacji XO tlen cząsteczkowy odgrywa rolę akceptora elektronów i tworzy rodnik ponadtlenkowy i nadtlenek wodoru. W kolejnym etapie powstają anionowe rodniki ponadtlenkowe i H₂O₂. Następnie aniony ponadtlenkowe są modyfikowane za pomocą enzymu dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) lub spontanicznie przekształcane w nadtlenek wodoru i tlen (Flemmig i in. 2011).

Reakcja organizmu na wyższe poziomy aktywności XO, a także na stres oksydacyjny, który jest typowy dla wielu stanów chorobowych naczyń, może skutkować wyższym stężeniem kwasu moczowego. Konsekwencją nadaktywności oksydazy ksantynowej jest stan znany jako dna moczanowa i ostre zapalenie stawów. Istnieją badania dotyczące powiązania występowania kwasu moczowego z nadciśnieniem tętniczym i cukrzycą (Kivity i in. 2013). Aby wyleczyć te choroby należy zmodyfikować poziom kwasu moczowego i zwiększyć jego wydalanie lub zmniejszyć wytwarzanie. W tym celu można zastosować inhibitory oksydazy ksantynowej. Zmniejszają one naczyniowy stres oksydacyjny i krążące ilości kwasu moczowego. Wyniki różnych badań nad XO wskazują na jego związek z różnymi postaciami niedokrwieniami, innymi rodzajami uszkodzeń tkanek i naczyń oraz przewlekłą niewydolnością serca. Inhibitor oksydazy ksantynowej – allopurinol, wykazuje pozytywne działanie w leczeniu tych stanów u zwierząt doświadczalnych, a także w niewielkich badaniach klinicznych na ludziach (Umamaheswari i in. 2007).

XO jest enzymem powszechnie występującym wśród różnych gatunków, a jego izolacja obejmuje ekstrakcję z szerokiego zakresu źródeł, na przykład bakterii, organów różnych zwierząt lub mleka. XO jest skoncentrowany w mleku/białkach otoczki kuleczek tłuszczowych mleka. Z tego powodu w metodach izolacji stosuje się śmietanę jako materiał wyjściowy. Głównym czynnikiem redukującym poziom kwasu moczowego w surowicy krwi, oprócz diety o niskiej zawartości puryn, jest hamowanie aktywności XO. Najczęściej stosowanym w medycynie inhibitorem XO jest allopurinol (analog purynowy, konkurencyjny inhibitor), chociaż może powodować niepożądane działania uboczne. Istnieją badania potwierdzające zdolność hamowania XO przez ekstrakty roślinne (Gawlik-Dziki 2012), a tym samym wykazujące, że preparaty roślinne mogą być alternatywą dla leków wytwarzanych na drodze syntezy chemicznej. Na szczególną uwagę zasługuje fakt, że preparaty roślinne, w przeciwieństwie do leków syntetycznych, nie powodują niepożądanych skutków ubocznych dla organizmu.

W literaturze związku z udokumentowanej aktywności podwójnego inhibitora 5-LOX / COX opisano jako potencjalne leki do leczenia zapaleń wywołanych aktywnością enzymów prozapalnych. Działają one poprzez blokowanie tworzenia się zarówno prostaglandyn, jak i leukotrienów, ale nie wpływają na tworzenie lipoksyny (Martel-Pelletier i in., 2003).

Stres oksydacyjny wynika przede wszystkim z nadmiernej produkcji ROS nieusuniętych przez naturalne mechanizmy naprawcze. Mogą być one wspomagane przez dostarczanie organizmowi substancji o działaniu przeciwutleniającym, charakterystycznym dla związków fitochemicznych. Związki fenolowe to grupa wtórnych metabolitów roślinnych o szeroko udokumentowanej aktywności biologicznej. Ich skuteczność jako przeciwutleniaczy wynika z wielokierunkowej aktywności: mogą być inhibitorami reakcji rodnikowej poprzez hamowanie tworzenia się rodników lipidowych, zakłócanie propagacji reakcji samoutleniania łańcucha, tłumienie singletowego tlenu, mogą działać jako czynniki redukujące nadtlenki wodoru do stabilnych związków, jako związki chelatujące jony metali przejściowych oraz jako inhibitory enzymów prooksydacyjnych. Dlatego uważa się, że dieta bogata w żywność pochodzenia roślinnego stanowi ważny element zapobiegania chorobom cywilizacyjnym (Carocho i Ferreira, 2013).

Wiele badań epidemiologicznych wykazało, że spożywanie żywności i napojów o wysokiej zawartości związków fenolowych wiąże się z zapobieganiem chorobie wieńcowej, nowotworom itp. (Scalbert i Williamson, 2000).

Aby uzyskać biologiczną aktywność polifenoli, muszą być w pewnym stopniu dostępne w tkance docelowej. Dlatego biologiczne właściwości dietetycznych polifenoli mogą zależeć od ich wchłaniania w jelitach oraz ich biodostępności. Ilość dostępnych biologicznie polifenoli spożywczych może różnić się ilościowo i jakościowo od polifenoli zawartych w bazach danych o żywności. Co więcej, większość badań nad biodostępnością polifenoli wykorzystuje głównie czyste pojedyncze cząsteczki (wyzolowane z żywności lub zsyntetyzowane chemicznie), chociaż ich biodostępność z całej żywności może być zasadniczo różna (Saura-Calixto i in., 2007). Ponadto aktywność związków fenolowych badanych *in vitro* (po ich wyizolowaniu z żywności) nie musi być zgodna z aktywnością wykazywaną w organizmie człowieka. Proste, tanie i powtarzalne narzędzia do badania biodostępności składników żywności stanowią modele *in vitro* oparte na fizjologii człowieka. Znajdują szerokie zastosowanie do badania zmian strukturalnych, strawności i uwalniania składników pokarmowych w symulowanych warunkach przewodu pokarmowego (Oomen i in., 2002). W przeciwieństwie do syntetycznych środków farmaceutycznych, opartych na pojedynczych substancjach chemicznych, wiele fitozwiązków wywiera korzystne działanie poprzez addytywne lub synergistyczne działanie kilku związków chemicznych w pojedynczych lub wielu miejscach docelowych związanych z procesem fizjologicznym (Williamson, 2001). Pomysł ten znalazł zastosowanie w farmakologii podczas badań nad kombinacjami kilku metabolitów w terapii wielokierunkowej (Birskin, 2000).

3. Podsumowanie

Synergizm związków bioaktywnych odgrywa znaczącą rolę lecz wciąż istnieje niewiele badań dotyczących tej kwestii w tak skomplikowanym systemie, jakim jest żywność. Dalszy rozwój badań ukierunkowanych na wzajemne zależności pomiędzy poszczególnymi składnikami żywności,

a także między składnikami żywności a matrycą żywności, w której występują może przynieść ciekawe efekty i wspomóc profilaktykę i leczenie chorób cywilizacyjnych.

4. Literatura

- Barden AE, Mas E, Mori TA (2016). n-3 Fatty acid supplementation and proresolving mediators of inflammation. *Current Opinion in Lipidology*. 27 (1): 26–32.
- Birskin, DP (2000) Linking plant biochemistry and physiology to human health. *Plant Physiol*. 124, 507–514.
- Capra V, Rovati GE, Mangano P, et al. (2015). Transcellular biosynthesis of eicosanoid lipid mediators. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1851 (4): 377–82.
- Carocho M, Ferreira ICFR (2013) A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food Chem. Toxicol*. 51, 15–25.
- Cleland LG, James MJ, Proudman SM (2006) Fish oil: what the prescriber needs to know". *Arthritis Research and Therapy*. 8 (1): 202.
- Fitzpatrick FA (2004) Cyclooxygenase enzymes: regulation and function. *Curr Pharm Des*. 10(6):577-588.
- Flemmig J, Kuchta K, Arnhold J, Rauwald HW (2011). *Olea europaea* leaf (Ph.Eur.) extract as well as several of its isolated phenolics inhibit the gout-related enzyme xanthine oxidase. *Phytomedicine*, 18 (7):561–566.
- Gawlik-Dziki U (2012) Dietary spices as a natural effectors of lipoxygenase, xanthine oxidase, peroxidase and antioxidant agents. *LWT - Food Science and Technology* 47: 138-146.
- Kirkby NS et al. (2013) LC-MS/MS confirms that COX-1 drives vascular prostacyclin whilst gene expression pattern reveals non-vascular sites of COX-2 expression. *PLoS One* 8(7):69-92.
- Kivity S, Kopel E, Maor E (2013) Association of serum uric acid and cardiovascular disease in healthy adults. *The American Journal of Cardiology*. 111(8): 1146–1151.
- Kuhn H, Banthiya S, van Leyen K (2015). Mammalian lipoxygenases and their biological relevance. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1851 (4): 308–30.
- Martel-Pelletier J, Lajeunesse D, Reboul P, Pelletier J-P, (2003). Therapeutic role of dual inhibitors of 5-LOX and COX, selective and non-selective non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Ann Rheum Dis*. 62:501–509
- Moreno J, Krishnan AV, Peehl DM, Feldman D (2006). Mechanisms of vitamin D-mediated growth inhibition in prostate cancer cells: inhibition of the prostaglandin pathway. *Anticancer Research*. 26 (4A): 2525–30.
- Oomen AG, Hack A, Minekus M, et al. (2002). Comparison of five in vitro digestion models to study the bioaccessibility of soil contaminants. *Environmental Science and Technology*. 36: 3326–3334.
- Saura-Calixto F, Serrano J, Goñi I (2007). Intake and bioaccessibility of total polyphenols in a whole diet. *Food Chemistry*, 101 492–501.
- Scalbert A, Williamson G, (2000). Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J. Nutr*. 130: 20735–20855.
- Umamaheswari M, AsokKumar K, Somasundaram A, Sivashanmugam T, Subhadradevi V, Ravi TK (2007) Xanthine oxidase inhibitory activity of some Indian medical plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 109(3):547–551.
- Williamson EM (2001) Synergy and other interactions in phytomedicines. *Phytomedicine*, 8: 401–409.
- Ying Tang, Jiankang Liu (2014) Cancer, Other Pathologies, Inflammation, Immunity, Infection, and Aging. *Autophagy* 3:45-58.
- Zhang Y, Mills GL, Nair MG (2003). Cyclooxygenase inhibitory and antioxidant compounds from the fruiting body of an edible mushroom, *Agrocybe aegerita*. *Phytomedicine*. 10 (5): 386–90.

7. Hemoglobin-derived bioactive peptides from pork – an *in silico* study

Paulina Kęska, Joanna Stadnik

Department of Animal Raw Materials Technology, Faculty of Food Science and Biotechnology,
University of Life Sciences in Lublin

Paulina Kęska: paulina.keska@up.lublin.pl

Key words - biological activity, food proteins, by-products, meat industry, *in silico* hydrolysis, bioinformatic analysis

Abstract

The results of *in silico* hydrolysis using commercial enzymes or a combination thereof are presented. Selected sequences of porcine hemoglobin (various types) came from a database UniProt, the peptide sequences - from a database BIOPEP-UWM. Enzymes capable of hydrolysis: proteinase K (EC.3.4.21.14), papain (EC.3.4.22.2) bromelain (EC.3.4.22.4), thermolysin (EC.3.4.24.27) or combinations thereof (up to three enzymes simultaneously) has been used, and released peptides were evaluated for bioactive properties. It has been shown that the sequences of hemoglobin are potential sources of bioactive peptides with antioxidant, antihypertensive (ACE-I inhibitory) and antidiabetic (DPP-IV inhibitory) properties.

1. Introduction

The meat industry produce huge amounts of by-products, which generate the high disposal costs for meat processing, as well as an important threat to the environment. Depending on the production technology, among the by-products are meat, bones, blood and skin. As an example, during slaughter a pig produces approximately 3 L of blood (Wei and Chiang, 2008). Currently, the industry is looking for alternative processing methods to produce new products and functional ingredients with significant added value. One of the most promising solutions is the production of hydrolysates of protein products and the release of many short sequences (Lafarge and Hayes, 2014; Mora et al. 2014). Blood is a major by-product of meat industry, rich in protein. Porcine blood contains 170-180 g·kg⁻¹ protein so is thus a good source of protein for food (Wei and Chiang, 2008). They can be divided into two main fractions: cell elements (which contains red and white blood cells), and plasma. An important protein present in muscle meat is hemoglobin, the main component of blood (Bah et al., 2013). In vertebrates, hemoglobin (Hb) is a tetramer consisting of two chains of alpha globin and beta globin, each of which comprises a prosthetic group, whose main function is an oxygen binding and transport via the blood to all tissues. Recent literature indicates that peptides derived from Hb may play an additional physiological functions in different tissues (Gomes et al., 2010). Protein sequences showing various activities in the human body are collectively referred to as bioactive peptides. There are usually 2-20 amino acid sequence, which after reaching a living body can cause physiological response of the body. Preparation of bioactive peptides is of interest both scientists and food producers. Modern research in that regard includes several aspects, such as the enrichment of food in peptides that maintain activity or the optimization and design of products with health claims, rich in endogenous source of bioactivity.

Proteolytic cleavage of large precursor proteins is one of the ways for the preparation of biologically active peptides. So, the blood is a meat-industry by-product of slaughterhouse and interesting as a source of biologically active peptide emphasizing their potential applications in functional foods for the prevention of noncommunicable diseases (NCD). However, the selection of appropriate enzymes and the sequences of the precursor protein as a biologically active sequence must be made.

The prognostic approach *in silico* analyzes are consistent with the idea of QbD (ang. Quality by design), denoting quality through design. According to the concept of QbD quality cannot be tested at the stage of the product, it should be evaluated at the design stage (Tsirk 2010). With *in silico* methods, such as inter alia the programming protein hydrolysis process for obtaining biologically

active peptides, proteins can be explored at the stage prior to testing in the laboratory. Therefore appropriate to introduce of *in silico* before the step of *in vitro* assay significantly facilitates the discovery of new bioactive peptides present in proteins.

In this study, the potential therapeutic applications of Hb-derived bioactive peptides using the *in silico* method was determined.

2. Materials and methods

Selected porcine hemoglobin sequences were analyzed (Tab. 1). All the sequences were derived from the UniProtKB database (Swiss-Prot, TrEMBL; access 12.2017) (<http://www.uniprot.org>). Hydrolysis *in silico* was performed using commercial proteolytic enzymes (Tab. 2). The analysis was performed using the "enzyme (s) of action" option in the protein sequence and bioactive peptides database BIOPEP-UWM (access 12.2017).

Tab.1. List of porcine hemoglobin (various types) available in the Uniprot database and used in the *in silico* analysis.

Protein ¹	Amino acid chain length	Mass (kDa)	Entry name
Hemoglobin subunit alpha	141	15.039	P01965 (HBA_PIG)
Hemoglobin subunit beta	147	16.166	P02067 (HBB_PIG)
Hemoglobin subunit theta	146	15.980	P04246 (HBT_PIG)
Hemoglobin subunit zeta	141	15.403	P02009 (HBAZ_PIG)
Hemoglobin subunit epsilon	147	16.095	P02101 (HBE_PIG)

¹ all protein sequences have "reviewed" status and "experimental evidence at protein level" as annotation score

The high potential of the selected types of hemoglobin for releasing peptides with antioxidant properties were confirmed by determining the frequency of release of fragments with given activity by selected enzymes (A_E) using the equation:

$$A_E = d/N;$$

where: d - the number of peptides with activity released by given enzyme (i.e. proteinase K),
N - the number of amino acid residues in protein.

Tab.2. List of enzymes used in the *in silico* hydrolysis.

Enzymes	Abbreviation	EC number	Cutting sequence
proteinase K	PRO	EC.3.4.21.14	F,V,I,L,Y,W,P,M
papain	PAP	EC.3.4.22.2	R,K,E,H,G,Y,A
bromelain	BRO	EC.3.4.22.4	K,A,Y,G
thermolysin	THE	EC.3.4.24.27	A,L,I,V,M,F

3. Results and discussion

The hemoglobin sequences were hydrolyzed using various enzyme variants and their combinations and the results are shown in Table 3. Analyzing individual enzymes, PRO and THE usually generate of large number of peptides, however by using PAP a greatest number of biologically active sequences was obtained (Tab. 3), especially peptides with DPP-IV inhibiting activity (Tab. 5). The worst results were obtaining with BRO in generation of total number of peptides from P02067, P04246, P02009 and P02101. An increase in the number of biologically active peptides was observed using a combination of two enzymes. However, using combination of three hydrolytic enzymes in this same time, reduces the bioactive potential, due to excessive proteolysis and a large number of free amino acids (Fig.1).

Tab 3.The effect of in silico hydrolysis using various combinations of proteolytic enzymes.

ENZYMES	HEMOGLOBIN SEQUENCES				
	P01965	P02067	P04246	P02009	P02101
PRO	34 ¹ /15/10	37/21/12	37/20/10	35/18/12	37/22/9
PAP	28/30/11	34/27/14	36/24/20	33/23/16	38/22/21
BRO	29/15/15	30/11/13	30/12/14	30/9/14	31/12/15
THE	40/20/18	37/26/13	35/24/10	40/21/16	35/26/13
PRO+PAP	27/76/16	24/92/17	26/87/23	33/71/27	27/88/25
PRO+BRO	38/52/25	35/61/27	36/60/28	40/47/26	36/62/31
PRO+THE	28/66/15	30/69/15	30/66/17	30/65/22	29/69/16
THE+PAP	34/54/20	32/65/26	33/61/29	35/56/24	33/65/32
THE+BRO	36/43/23	36/52/28	34/52/25	37/47/23	34/54/28
BRO+PAP	29/30/11	34/27/14	36/24/20	33/23/16	38/22/21
PRO+THE+PAP	16/106/7	12/120/7	14/115/12	17/107/17	13/118/11
PRO+THE+BRO	21/93/9	20/104/12	18/103/12	20/96/13	17/106/11
PRO+BRO+PAP	28/77/16	24/92/17	26/87/23	33/71/27	27/87/25
THE+BRO+PAP	34/54/20	32/64/26	33/61/29	35/56/24	33/63/32

¹ Total number of released peptide sequences / total number of released amino acids/ **total number of peptides with biological activity** (a sequence having two different activities were treated as two different peptides)

Due to the advanced hydrolysis, the worst results were obtained for the PRO + PAP (see also PRO + THE+ PAP and PRO + THE + BRO) where released a low number of peptides and a large number of individual amino acids (Table 3, Figure 1). The most effective combination of three enzymes in the generation of peptides including those biological properties has proved to be THE+BRO+PAP (Table 3).

The enzymatic hydrolysis of the selected hemoglobinsequences released peptides with diverse activities. Biological activity profiles were performed based on BIOPEP-UWM database and fragments with 7 types of activity: antioxidative, angiotensin converting enzyme inhibition (ACE inhibitor), dipeptidyl peptidase IV inhibition (DPP-IV inhibitor), activating ubiquitin-mediated proteolysis, hypotensive, inhibitor, stimulating were identified. Among all, the peptides with DPP-IV inhibiting activity were the most indicated - their presence was determined in every proteins after hydrolysis using enzymes or combinations thereof. DPP-IV is aminodipeptidase which cleaves the incretin, such as glucose-dependent insulinotropic peptide and glucagon-like peptide-1, causing the loss of their insulinotropic activities, what in turn leads to diabetes (Power et al., 2014). Among the different courses of action, inhibition of dipeptidyl peptidase IV by peptide inhibitors can improve blood glucose control in diabetic patients.

The peptides inhibit DPP-IV, constitute from 26% to 86% of biologically active peptides contained in the sequence of the hemoglobin (Tab. 5). The use of PRO, PRO+PAP or PRO+THE+PAP results in a greatest number of peptides that inhibit DPP-IV. The worst result were achieved using BRO, THE+BRO (except P02009) and THE+BRO+PAP (except P01965; Tab. 3). Analyzed sequences have also proved to be a good source of peptides with ACE inhibiting activity properties. The properties of this specific peptide motifs revealed by interference in one of the most important mechanisms governing the functioning of the cardiovascular system, i.e. the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS). Its most important element is the action of ACE (EC 3.4.15.1). It is exopeptidase which converts an inactive form of angiotensin I (decapeptide) to a potent vasoconstrictor agent - angiotensin II (octapeptide). Therefore, the inhibition of the catalytic reaction of ACE have antihypertensive effect (Iwaniak et al. 2014).

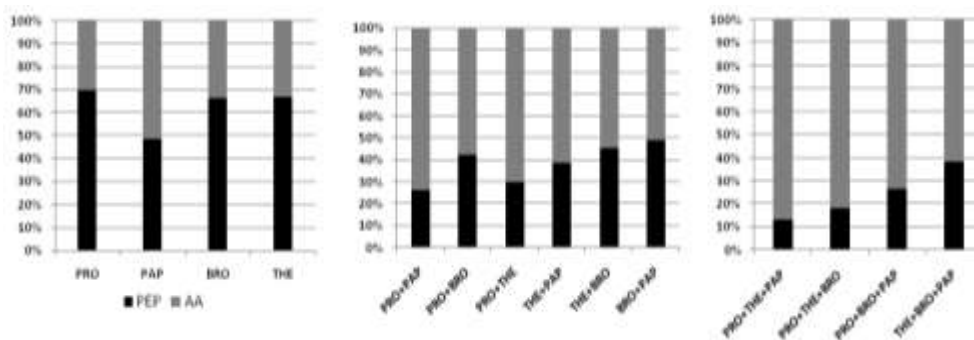


Fig.1.The cumulative contribution of the peptides and free amino acids released during the hydrolysis determined for P01965 (Hemoglobin subunit alpha).

Tab. 4. The maximum value of A_E ratio determined for the different types of hemoglobin.

ENZYMES	ACTIVITY						
	antioxidative	ACE	DPP IV	activating ubiquitin- mediated proteolysis	hypotensive	inhibitor	stymulating
PRO	P02067 A_E : 0.0065	P01965 A_E : 0.0204	P02009 A_E : 0.0552	n.d.	P02009 A_E : 0.0068	P02009 A_E : 0.0068	n.d.
PAP	P04246 A_E : 0.0200	P02101 A_E : 0.0464	P04246 A_E : 0.0667	P02009 A_E : 0.0069	n.d.	n.d.	n.d.
BRO	P02067 A_E : 0.0132	P01965 A_E : 0.0544	P02009 A_E : 0.0414	P02009 A_E : 0.0069	n.d.	n.d.	n.d.
THE	P01965 A_E : 0.0138	P01965 A_E : 0.0345	P01965 A_E : 0.0759	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
PRO+PA P	P01965 P02009 A_E : 0.0069	P04246 A_E : 0.0400	P02009 A_E : 0.1379	n.d.	n.d.	n.d.	P02009 A_E : 0.0069
PRO+BR O	P01965 A_E : 0.0207	P02067 A_E : 0.0728	P02101 A_E : 0.1325	P02009 A_E : 0.0069	P02101 A_E : 0.0066	P02101 A_E : 0.0066	n.d.
PRO+TH E	P02009 A_E : 0.0207	P02009 A_E : 0.0483	P02009 A_E : 0.0759	n.d.	n.d.	n.d.	P02009 A_E : 0.0069
THE+PA P	P01965 A_E : 0.0397	P02101 A_E : 0.0795	P02101 A_E : 0.0966	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
THE+BR O	P01965 A_E : 0.0331	P02067 A_E : 0.0861	P02009 A_E : 0.0897	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
BRO+PA P	P04246 A_E : 0.0200	P02101 A_E : 0.0464	P04246 A_E : 0.0667	P02009 A_E : 0.0069	n.d.	n.d.	n.d.

ENZYMES	ACTIVITY						
	antioxidative	ACE	DPP IV	activating ubiquitin- mediated proteolysis	hypotensive	inhibitor	stimulating
PRO+TH E+PAP	P01965 P02009 <i>AE:</i> 0.0069	P02009 <i>AE:</i> 0.0276	P02009 <i>AE:</i> 0.0759	P02009 <i>AE:</i> 0.0069	n.d.	n.d.	n.d.
PRO+TH E+BRO	P01965 <i>AE:</i> 0.0138	P04246 <i>AE:</i> 0.0267	P04246 <i>AE:</i> 0.0467	n.d.	n.d.	n.d.	P02009 <i>AE:</i> 0.0069
PRO+BR O+PAP	P02009 <i>AE:</i> 0.0069	P04246 <i>AE:</i> 0.0400	P02009 <i>AE:</i> 0.1379	n.d.	n.d.	n.d.	P02009 <i>AE:</i> 0.0069
THE+PA P+BRO	P02067 <i>AE:</i> 0.0397	P02101 <i>AE:</i> 0.0795	P02101 <i>AE:</i> 0.0993	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

According to this study, ACE inhibiting peptides was released from proteins used in this study under the individual enzymes action or combinations thereof (except P01965 in a combination of enzymes PRO+THE+PAP; Tab. 5). The largest percentage of ACE inhibitory was achieved using BRO, THE+BRO (except P02101) and THE+BRO+PAP. The least effective was the use of the enzyme PRO (except P01965), or a combination of PRO+PAP and PRO+THE+PAP (except P02009; Tab. 5).

The antioxidant peptides are another large group of biologically active sequences determined in this study. They are effective in the fight against oxidative stress, i.e. condition inside the body caused by a disturbance of the balance between the production of free oxygen radicals and the cell's ability to eliminate them. Peptides interrupting free radical chain reactions may decrease the rate of oxidation processes (Power et al., 2013). It has been found that the PAP hydrolysis (for P02067, P04246 and P02101) and THE (in the case P01965, P02009) is the most effective in the generation of antioxidant peptides. Also, the combination of THE +PAP and PRO+THE or THE+BRO+PAP also proved to be effective - the percentage of antioxidant peptides in the total pool of bioactive sequences was the largest (Tab. 5). The worst effect was achieved for a single enzyme PRO or a combination (PRO+PAP and also PRO+THE+BRO; PRO+BRO+PAP). No antioxidant peptides were detected from P02067, P04246 or P02101 for listed enzyme variants.

Other biologically active peptides were also defined in this study, i.e. acting as antihypertensive properties (other than ACE) (see P02009 after hydrolytic degradation with PRO and P02101 after use PRO+BRO in Tab. 4), stimulating various processes in the body - using the enzyme combination PRO+PAP, PRO+THE+PAP, PRO+THE+BRO and PRO+BRO+PAP (for all proteins excepted P01965), and acting as an inhibitor other as ACE and DPP-IV; (see P02009 by using PRO or P02101 after use PRO+BRO in Tab. 4). A large part of the peptides showed activating properties of ubiquitin-mediated proteolysis. Their presence has been detected after use PAP, BRO, PRO+BRO, BRO+PAP (except P01965).

The profile of the biologically active peptides released due to hydrolysis of the different types of hemoglobin represent mostly the two-amino acid sequences (Tab. 6). According to Dziuba et al. (2005), short sequences, mainly di- and tripeptides are most often released from animal proteins. In addition, peptides in that form more easily enter into the blood circulation from the GI tract (Darewicz et al. 2013; López-Barrios et al. 2014). Moreover, more than one effect assigned to one sequence was observed, e.g. GF, NF, HL or VK showed both ACE inhibitory and DPP-IV inhibitory activity (Tab.6).

Tab.5. Percentage of peptides of defined biological activity resulting by in silico hydrolysis [%].

ENZYMES	HEMOGLOBIN SEQUENCES				
	P01965	P02067	P04246	P02009	P02101
PRO	0/30/70	8/25/67	0/20/80	0/17/67	0/22/78
PAP	9/36/55	21/36/36	15/30/50	13/31/50	14/33/48
BRO	7/53/40	15/54/23	7/50/36	7/43/43	7/47/40
THE	11/28/61	8/31/62	10/20/70	19/19/63	8/23/69
PRO+PAP	6/13/81	0/29/65	0/26/70	4/19/74	0/24/72
PRO+BRO	12/28/60	7/41/52	0/36/64	4/23/69	0/29/65
PRO+THE	13/27/60	7/33/53	6/41/47	14/32/50	6/44/44
THE+PAP	10/35/55	23/38/38	17/38/45	8/33/58	16/38/47
THE+BRO	9/43/48	18/46/36	16/44/40	9/35/57	14/43/43
BRO+PAP	9/36/55	21/36/36	15/30/50	13/31/50	14/33/48
PRO+THE+PAP	14/0/86	14/14/71	0/25/67	6/24/65	0/27/64
PRO+THE+BRO	22/33/44	0/33/58	0/33/58	8/23/62	0/36/55
PRO+BRO+PAP	6/13/81	0/29/65	0/26/70	4/19/74	0/24/72
THE+BRO+PAP	10/35/55	23/38/38	17/38/45	8/33/58	16/38/47

¹ - antioxidative activity / ACE inhibitor activity/ DPP-IV inhibitor activity

Tab. 6. Results of enzymes actions to generate the bioactive peptides from P01965 (Hemoglobin subunit alpha).

ENZYMES	RESULTS OF ENZYMES ACTION
PRO	<i>ACE inhibitor:</i> GF [35-36]I, NF [99-100]; KL [101-102] <i>DPP IV inhibitor:</i> NP [120-121], DP [96-97], GF [35-36], HF [45-46], NF [99-100], NL[47-48], TL [110-111]
PAP	<i>Antioxidative:</i> TY [41-42] <i>ACE inhibitor:</i> WG[14-15], VG[17-18][72-73], DA[66-67] <i>DPP IV inhibitor:</i> VA[64-65], WG[14-15], QA[20-21], TY[41-42], VG[17-18][72-73]
BRO	<i>Antioxidative:</i> TY[41-42] <i>ACE inhibitor:</i> VG [17-18][72-73], DA [66-67], WG [14-15], HG [24-25][58-59], EA [27-28] <i>DPP IV inhibitor:</i> VA [65-65], WG [14-15], QA [20-21], TY [41-42], VG [17-18][72-73]
THE	<i>Antioxidative:</i> LH [88-89], AHK [90-92] <i>ACE inhibitor:</i> LPG[78-80], VK [10-11][55-56], AG [21-22], LG [34-35] <i>DPP IV inhibitor:</i> AD [65-66], AE [26-27], AG [21-22], AS [127-128], FN [46-47], LH [88-89], VH [125-126], VK [10-11][55-56], VN [98-99], VT [109-110]
PRO+PAP	<i>Antioxidative:</i> TY [41-42] <i>ACE inhibitor:</i> DA [66-67], NF [99-100], <i>DPP IV inhibitor:</i> NP [120-121], SL [128-129], DP [96-97], NF [99-100], NL [47-48], NV [9-10][135-136], QA [20-21], SH [49-50][104-105], TK [69-70], TL [110-111], TY [41-42]
PRO+BRO	<i>Antioxidative:</i> HHP [114-115], HL [74-75], TY [41-42] <i>ACE inhibitor:</i> HL [74-75]

ENZYMES	RESULTS OF ENZYMES ACTION
	DPP IV inhibitor: HA [89-90][126-127], NP [120-121], HL [74-75], SL [128-129], DP [96-97], HF [45-46], NF [99-100], NL [47-48], NV [9-10][135-136], QA [20-21], TK [69-70], TL [110-111], TY [41-42]
PRO+THE	Antioxidative: AHK [90-92], AW [13-14] ACE inhibitor: AW [13-14], AG [21-22], GH [73-74], GK [15-16], DPP IV inhibitor: NP [120-121], AW [13-14], AD [65-66], AE [26-27], AG [21-22], AS [127-128], DP [96-97], GH [73-74], TK [69-70]
THE+PAP	Antioxidative: LH [88-89], TY [41-42] ACE inhibitor: LPG [78-80], VK [10-11][55-56], VG [17-18][72-73], WG [14-15], LG [35-36] DPP IV inhibitor: WG [14-15], FN [46-47], LH [88-89], TY [41-42], VG [17-18],[72-73], VH [125-126], VK [10-11][55-56], VN [98-99], VT [109-110]
THE+BRO	Antioxidative: LH[88-89], TY[41-42] ACE inhibitor: LPG [78-80], VK [10-11][55-56], VG [17-18][72-73], WG [14-15], HG [24-25][58-59], LG [34-35], HK [91-92], DPP IV inhibitor: WG [14-15], FN [46-47], LH [88-89], TY [41-42], VG [17-18][72-73], VH [125-126], VK [10-11][55-56], VN [98-99], VT [109-110]
BRO+PAP	Antioxidative: TY [41-42] ACE inhibitor: VG [17-18][72-73], DA [66-67], WG [14-15] DPP IV inhibitor: VA [64-65], WG [14-15], QA [20-21], TY [41-42], VG [17-18][72-73]
PRO+THE+PAP	Antioxidative: TY [41-42] DPP IV inhibitor: NP [120-121], DP [96-97], SH [49-50][104-105], TK [69-70], TY [41-42]
PRO+THE+BRO	Antioxidative: HHP [114-116], TY [41-42] ACE inhibitor: HG [24-25][58-59], HK [91-92] DPP IV inhibitor: NP [120-121], DP [96-97], TK [69-70], TY [41-42]
PRO+BRO+PAP	Antioxidative: TY [41-42] ACE inhibitor: DA [66-67], NF [99-100] DPP IV inhibitor: NP [120-121], SL [128-129], DP [96-97], NF [99-100], NL [47-48], NV [9-10][135-136], QA [20-21], SH [49-50][104-105], TK [69-70], TL [110-111], TY [41-42]
THE+PAP+BRO	Antioxidative: LH [88-89], TY [41-42] ACE inhibitor: LPG[78-80], VK [10-11][55-56], VG [17-18][72-73], WG [14-15], LG [34-35] DPP IV inhibitor: WG [14-15], FN [46-47], LH [88-89], TY [41-42], VG [17-18][72-73], VH [125-126], VK [10-11][55-56], VN [98-99], VT [109-110]

¹ peptide sequence and its location [value in brackets]

4. Conclusion

The results presented in this study support the potential of hemoglobin as a source of biologically active sequences. These proteins can be effective in the prevention of NCD, inter alia, caused by oxidative stress, hypertension, and abnormal blood glucose level. The *in silico* analysis not expressly stated protein sequences or enzyme referred to as the most effective in the generation of biologically active peptides - it depends on the desired biological activity. The observed differences are related also to the specificity of the enzymes used. The wider the specificity of the enzyme, the

potentially more peptide bonds are hydrolysed, which promotes the release of more of the peptides with the biological activity. However, the performed analysis shows that the use of two proteolytic enzymes is the most efficient in the generation of peptides with biological properties. Thus, *in silico* approach can serve as a screening test, allows pre-selection of protein sequences and/or hydrolytic enzymes to predict the potential biological activity and indicate new ways of release of bioactive peptides from by-products on a commercial scale.

5. References

- Bah CS, Bekhit AEDA, Carne A. et al. (2013). Slaughterhouse blood: an emerging source of bioactive compounds. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 12(3), 314-331.
- Darewicz M, Borawska J, Minkiewicz P. et al. (2013) Peptydy biologicznie aktywne jako składniki żywności funkcjonalnej. *Przemysł Spożywczy*, 67, 38-44
- Dziuba J, Niklewicz M, Iwaniak A. et al. (2005) Structural properties of proteolytic-accessible bioactive fragments of selected animal proteins. *Polimery*, 50, 424- 428.
- Gomes I, Dale CS, Casten K. et al. (2010). Hemoglobin-derived peptides as novel type of bioactive signaling molecules. *The AAPS journal*, 12(4), 658-669.
<http://www.uniprot.org>
<http://www.uwm.edu.pl/biochemia/index.php/pl/biopep>
- Iwaniak A, Minkiewicz P, Darewicz M (2014) Food originating ACE inhibitors, including antihypertensive peptides, as preventive food components in blood pressure reduction. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13,114-134.
- Lafarga T, Hayes M. (2014). Bioactive peptides from meat muscle and by-products: generation, functionality and application as functional ingredients. *Meat Science*, 92, 227-239.
- López-Barrios L, Gutiérrez-Urbe JA, Serna-Saldívar SO (2014) Bioactive peptides and hydrolysates from pulses and their potential use as functional ingredients. *Journal of Food Science*, 79, R273-R283.
- Mora L, Reig M, Toldrá F. (2014). Bioactive peptides generated from meat industry by-products. *Food Research International*, 65, 344-349.
- Power O, Jakeman P, FitzGerald RJ. (2013). Antioxidative peptides: enzymatic production, in vitro and in vivo antioxidant activity and potential applications of milk-derived antioxidative peptides. *Amino Acids*, 44(3), 797-820.
- Power O, Nongonierma AB, Jakeman P. et al. (2014). Food protein hydrolysates as a source of dipeptidyl peptidase IV inhibitory peptides for the management of type 2 diabetes. *Proceedings of the Nutrition Society*, 73(01), 34-46.
- Tsirk A. (2010). Quality by design: a peptide CMO approach. *PharManufacturing: The International Peptide Review*, 28-31
[www.polypeptide.com/web/upload/medias/1401702669538c490d8501f.pdf].
- Udenigwe C., Howard A. (2013) Meat proteome as source of functional biopeptides. *Food Research International*, 54, 1021-1032.
- Vercruyse L., Van Camp J., G. Smagghie G. (2005). ACE inhibitory peptides derived from enzymatic hydrolysates of animal muscle protein: A review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 8106-8115.
- Wei JT, Chiang BH. (2009). Bioactive peptide production by hydrolysis of porcine blood proteins in a continuous enzymatic membrane reactor. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89(3), 372-378.

8. Antioxidant properties of porcine collagen - an *in silico* approach

Paulina Kęska, Joanna Stadnik

Department of Animal Raw Materials Technology, Faculty of Food Science and Biotechnology,
University of Life Sciences in Lublin

Paulina Kęska: paulina.keska@up.lublin.pl

Key words - biological activity, food proteins, *in silico* hydrolysis, bioinformatic analysis

Abstract

The results of an *in silico* hydrolysis using commercial enzymes - as a single or a combination thereof were presented. Selected sequences of collagen (various types) from pork source came from a UniProt database, the peptide sequences - from BIOPEP-UWM database. Enzymes capable of hydrolysis: proteinase K (EC.3.4.21.14), papain (EC.3.4.22.2) bromelain (EC.3.4.22.4), thermolysin (EC.3.4.24.27) or their cooperation (one, two or three enzymes simultaneously) have been used and released peptides were evaluated for antioxidant properties. It has been shown that the porcine collagen sequences are a potential source of bioactive peptides with antioxidant properties (released a total of 14 different biologically active fragments). Collagen type I, alpha 2 chain and collagen type II, alpha 1 chain did not released any peptide fragments with antioxidant activity under the influence of hydrolysis. The highest number of biologically active peptides was obtained from collagen type IV, alpha 1 chain and collagen type V, alpha 3 chain, under the proteolytic enzymes, in particular as a combination of THE + PAP, THE + BRO and THE + PAP + BRO.

1. Introduction

The meat industry produces an enormous amount of by-products. Their management is necessary, mainly due to the potential negative impact on the environment; however, it is associated with high utilization costs. Animal by-products may be defined as whole bodies or parts of animals, products of animal origin or other products derived from animals (European Parliament and Council Regulation (EC) No 1069/2009 of 21 October 2009 defining sanitary rules for animal by-products) and some of them can be eaten by people or animals. As by-products, depending on the technology of production, there are usually waste blood, bones, meat trimmings, skin, fatty tissues, horns, hoofs, feet as well as skull and viscera (Toldra et al. 2016). Meat by-products are rich in lipids, carbohydrates and proteins that can be reused. There are many applications based on new or improved technologies for the processing of meat by-products, such as edible food ingredients for the food, feed and pet industries, as illustrated in Fig. 1.

Currently, the industry is looking for alternative methods of processing by-products to produce new edible products and functional ingredients with significant added value. In this context, one of the most promising solutions is the production of protein hydrolysates by-products (Lafarga and Hayes 2014; Mora et al. 2014).

Collagen have a potential application in the food industry. Their alternative sources and functional properties (such as emulsifiers, foaming agents, colloid stabilizers, hydrogels, clarifying agents, biodegradable packaging materials, microencapsulation agents) have been summarized by Gómez-Guillén et al. 2011.

Meat by-products, especially collagen, elastin, blood are a good source of protein, and therefore they are a good substrate for the action of proteolytic enzymes. In terms of nutritional value, collagen is very indigent because it does not contain all amino acids, but is a good source of bioactive peptide. According to the study of Fu et al. (2016b), gastrointestinal enzymes can not effectively hydrolyse bovine collagen to release numerous ACE-inhibitory peptide sequences. Therefore, the use of exogenous proteases with broad cleavage sites is more effective to release peptides with biological activity. The hydrolysis with commercial proteases such as proteinase K, papain, bromelain, thermolysin is effective (Verduyck et al. 2005, Udenigwe and Howard 2013). According to Saig et al. (2008), collagen extracted from chicken legs by treatment with *Aspergillus* species-enzyme were

a good source of peptides with inhibition activity of the angiotensin converting enzyme (ACE). When these peptides with ACE inhibitor activity were identified, next synthesized and administered to spontaneous hypertensive rats a fall in their blood pressure was observed after 6 hours. Collagen is also a good source of antioxidant peptides. Many reports describe the antioxidant properties of collagen from fish (Rajapakse et al. 2005; Gómez-Guillén et al. 2010; Wang et al. 2013; Chi et al. 2014; Choonpicharn et al. 2015), but also other, for example from bovine skin (Kim et al. 2001a). According to other studies (Kim et al. 2001b), gelatin peptides could effectively inhibit lipid peroxidation. The antioxidant activity of collagen and gelatin peptides is associated with a high content of hydrophobic amino acids, which may increase their lipid solubility, and therefore increase their antioxidant activity (Kim et al. 2001b). Rajapakse et al. (2005) found that gelatin peptides from fish skin showed antioxidant activity close to the very active synthetic antioxidant, butylated hydroxytoluene. They were characterized by a higher antioxidant activity than peptides from other fish proteins, probably due to the higher percentage of Gly and Pro. Apart of them, the underlying mechanism responsible for antioxidant activities of collagen peptides in cell models may be due to the ability to enhance the expression of antioxidant enzymes in cultured cells by treatment with collagen peptides, as summated Fu et al. (2018). Collagen peptides also have a positive effect on skeletal status, affecting the delivery and biological activity of bone morphogenic protein- 2 and ectopic bone formation, supporting bone healing (Bhakta et al. 2013). Consumption of collagen peptides from bovine bone prepared by Alcalase performed significantly improved flaccidity of the skin, repaired collagen fibers, increased the collagen content and normalized the collagen type I to type III ratio in chronologically aged skin after orals administration chronologically aged mice. In addition, their consumption also significantly improved the activity of antioxidant enzymes in the skin (Song et al. 2017). Therefore, collagen is one of the most useful proteins for use in pharmaceutical products offered for skin or bone disorders.

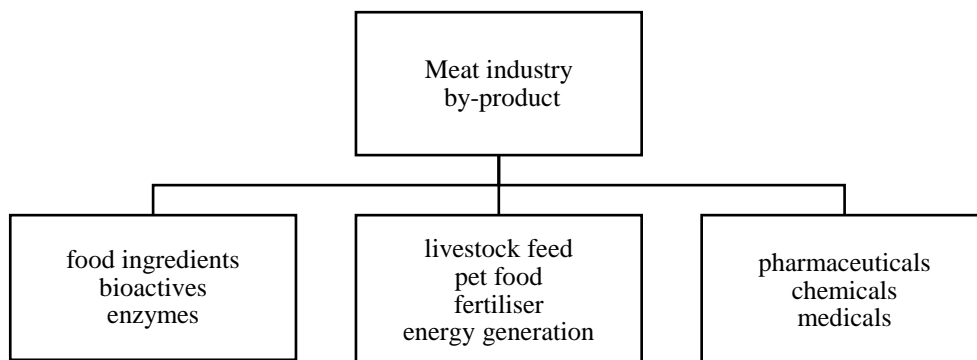


Fig. 1. General applications of meat by-products (based on Toldrá et al. 2016).

The study focused on the antioxidant properties of the peptides released from the different types of porcine collagen by enzymatic hydrolysis using various enzymes, or combinations thereof.

2. Materials and methods

The largest types of collagen in intramuscular connective tissue are types I, III, IV and V (Light and Champion 1984) and this fractions were investigate in this study. Selected porcine collagen sequences were analyzed (Tab. 1). All the sequences were derived from the UniProtKB database (Swiss-Prot, TrEMBL; access 12.2017) (<http://www.uniprot.org>). The potential of the selected types of collagen for releasing peptides with antioxidant properties were confirmed by determining the frequency of release of fragments with given activity by selected enzymes (A_E) using the equation:

$$A_E = d/N$$

where: d – the number of peptides with antioxidant activity released by given enzyme, N - the number of amino acid residues in protein.

Tab. 2. List of porcine collagen (various types) available in the Uniprot database and used in the *in silico* analysis

Protein	Amino acid chain length	Mass (kDa)	Entry name
Collagen type I, alpha 2 chain	132	12.341	Q1T7B0
Collagen type I, alpha1 chain	127	13.422	Q9TT86
Collagen type II, alpha1 chain	167	15.250	Q9TT85
Collagen type IV, alpha 1 chain	1669	160.328	M3V819
Collagen type IV; alpha 3 chain	203	22.327	Q29032
Collagen type V, alpha 1 chain	516	55.942	Q8HYS4
Collagen type V, alpha 3 chain	198	20.926	Q8HYS2

The *in silico* hydrolysis using commercial proteolytic enzymes (Tab. 2) was performed. The theoretical peptides were obtained using "enzyme (s) of action" option in the protein sequence database and bioactive peptides BIOPEP-UWM (www.uwm.edu.pl/biochemia/index.php/pl/biopep).

Tab. 2. List of enzymes used in the *in silico* hydrolysis.

Enzymes	Abbreviation	EC number	Cutting sequence
proteinase K	PRO	EC.3.4.21.14	F,V,I,L,Y,W,P,M
papain	PAP	EC.3.4.22.2	R,K,E,H,G,Y,A
bromelain	BRO	EC.3.4.22.4	K,A,Y,G
thermolysin	THE	EC.3.4.24.27	A,L,I, V,M,F

3. Results and discussion

The various types of collagen sequences of porcine source were analyzed in order to determine their potential to generate antioxidant peptides. The results of *in silico* analysis confirmed the potential of various type of collagen for generating bioactive peptides. Each of protease selected was capable of hydrolyzing collagen. According to the results of the analysis, Q1T7B0 and Q9TT85 did not generate peptides with antioxidant activity. On the other hand, the Q8HYS2, Q8HYS4 and M3V819 are a good potential source of biopeptides, as confirmed by the relatively high value of the parameter A_E (0.0174, 0.0113 and 0.0093; Tab. 3).

Analyzing individual enzymes, THE and PRO usually generate peptides with antioxidant properties. Moreover, using two enzymes generally released greater number of sequence having antioxidant properties, while using a combination of three enzymes to the hydrolysis of proteins reduces their potential as a source of antioxidant peptides due to excessive proteolysis and result in a large number of free amino acids. Due to the very advanced hydrolysis, the worst results were obtained for the PRO + PAP (see also PRO + PAP+ BRO and PRO + PAP + THE; Tab. 3) where released a large number of individual amino acids (Fig.2).

The use of a combination of THE + PAP, THE + BRO and their combination: THE + BRO + PAP was the most effective, released the largest amount of antioxidant peptides from porcine collagen sequences (Tab. 4).

The released antioxidant peptides were described using 14 different sequence from which to nearly 93% (13 sequences), are two amino acid sequences (Tab. 4). The peptides with oxygen scavenging activity – LK were the most frequent, which was due to the high number of repeating units of these amino acid residues in porcine collagen. Only one, three-amino acid sequence of the DHG peptide was longer. This observation was the same as the results of Fu et al. (2016a, 2016b) who received many dipeptides with biological activity (such as antioxidant, angiotensin-converting enzyme inhibitors or dipeptidyl peptidase IV inhibitors) due to collagen hydrolysis of collagen alpha-1 (I) and collagen alpha-2 (I) by various proteases.

Tab. 3. The effect of an in silico hydrolysis using various combinations of enzymes.

ENZYMES	COLLAGEN SEQUENCES						
	Q1T7B0	Q9TT86	Q9TT85	M3V819	Q29032	Q8HYS4	Q8HYS2
PRO	32/0 ¹ -	23/1 ¹ 0.0076 ²	34/0 -	415/0 -	47/0 -	117/1 0.0019	52/2 0.0098
PAP	37/0 -	27/0 -	45/0 -	475/7 0.0041	44/0 -	116/0 -	44/1 0.0049
BRO	40/0 -	22/0 -	53/0 -	478/6 0.0035	37/0 -	101/0 -	36/0 -
THE	17/0 -	20/0 -	28/0 -	266/6 0.0035	44/0 -	90/2 0.0038	46/1 0.0049
PRO+PAP	14/0 -	28/0 -	19/0 -	226/0 -	43/0 -	101/0 -	41/1 0.0049
PRO+BRO	21/0 -	31/0 -	31/0 -	308/3 0.0017	51/1 0.0048	119/0 -	49/2 0.0147
PRO+THE	30/0 -	23/1 0.0076	39/0 -	323/1 0.0012	41/0 -	105/2 0.0038	35/1 0.0049
THE+PAP	34/0 -	31/0 -	41/0 -	489/16 0.0093	54/1 0.0048	129/6 0.0113	54/3 0.0147
THE+BRO	36/0 -	30/0 -	47/0 -	479/15 0.0087	49/1 0.0048	125/6 0.0113	54/2 0.0098
BRO+PAP	37/0 -	27/0 -	45/0 -	476/7 0.0041	44/0 -	116/0 -	44/1 0.0049
PRO+THE+ PAP	12/0 -	22/0 -	17/0 -	194/0 -	34/0 -	77/0 -	24/1 0.0049
PRO+THE+ BRO	19/0 -	24/0 -	28/0 -	255/2 0.0012	39/0 -	93/0 -	33/2 0.0098
PRO+BRO+ PAP	14/0 -	28/0 -	19/0 -	221/0 -	43/0 -	102/0 -	41/1 0.0049
THE+BRO+ PAP	33/0 -	30/0 -	41/0 -	461/14 0.0093	53/1 0.0048	130/6 0.0113	54/3 0.0147

¹Total number of released peptide sequences / peptides with antioxidant activity; ²**bold**- the frequency of release of fragments with given activity by selected enzymes (A_E)

Tab. 4. Peptide sequences obtained after in silico hydrolysis.

ENZYMES	COLLAGEN SEQUENCES						
	Q1T7B0	Q9TT86	Q9TT85	M3V819	Q29032	Q8HYS4	Q8HYS2
PRO	n.d.	KP	n.d.	n.d.	n.d.	AY	EL, TW
PAP	n.d.	n.d.	n.d.	IY, LK(6) ¹	n.d.	n.d.	IR
BRO	n.d.	n.d.	n.d.	LK(5); DHG	n.d.	n.d.	n.d.
THE	n.d.	n.d.	n.d.	LY, IY,IR,LK, VW, LW	n.d.	LK, LW	LK
PRO+PAP	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	TW

COLLAGEN SEQUENCES							
ENZYMES	Q1T7B0	Q9TT86	Q9TT85	M3V819	Q29032	Q8HYS4	Q8HYS2
PRO+BRO	n.d.	n.d.	n.d.	EL; DHG(2)	EL	n.d.	RW, TW
PRO+THE	n.d.	KP	n.d.	DHG	n.d.	AY(2)	TW
THE+PAP	n.d.	n.d.	n.d.	LH, LY(2), IY, IR(2), LK(8), VW, LW	LY	LY(2), IY(2), LK, LW	IY, IR, LK
THE+BRO	n.d.	n.d.	n.d.	LY(2), IY,IR, LK(8) VW, LW, DHG	LY	LY(2), IY(2), LK, LW	IY, LK
BRO+PAP	n.d.	n.d.	n.d.	IY, LK(6)	n.d.	n.d.	IR
PRO+THE+ PAP	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	TW
PRO+THE+ BRO	n.d.	n.d.	n.d.	DHG (2)	n.d.	n.d.	RW, TW
PRO+BRO+ PAP	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.		n.d.	TW
THE+PAP+ BRO	n.d.	n.d.	n.d.	LH, LY(2), IY, IR(2), LK(8)	LY	LY(2), IY(2), LK, LW	IY, IR, LK

¹ The numbers in the parentheses indicate the total number of the sequences with the given activity; n.d. – not detected

>tr|M3V819|M3V819_PIG Collagen, type IV, alpha 1 OS=*Sus scrofa* GN=COL4A1 PE=2 SV=1



M - G - P - R - L - G - V - W - L - L - L - L - P - A - A - L - L - L - H - E - E - SSR - A - A -
A - K - G - G - CA - G - SG - CG - K - CDCH - G - V - K - G - QK - G - E - R - G - L - P - G
- L - QG - V - I - G - F - P - G - M - QG - P - E - G - P - QG - P - A - G - QK - G - DTG - E -
P - G - L - P - G - TK - G - TR - G - P - P - G - A - SG - Y - P - G - NP - G - L - P - G - I - P -
G - QDG - P - P - G - P - P - G - I - P - G - CNG - TK - G - E - R - G - P - V - G - P - P - G -
L - P - G - F - A - G - NP - G - P - P - G - L - P - G - M - K - G - DP - G - E - I - L - G - H - I
- P - G - TL - L - K - G - E - R - G - F - P - G - P - P - G - A - P - G - SP - G - L - P - G - L -
QG - P - V - G - P - P - G - F - TG - P - P - G - P - P - G - P - P - G - P - P - G - E - K - G -
QM - G - L - SF - QG - P - K - G - DK - G - DQG - V - SG - P - P - G - V - P - G - QA - QV
- K - E - K - G - DF - A - TK - G - E - K - G - QK - G - E - P - G - F - QG - M - P - G - I - G
- E - K - G - E - P - G - K - P - G - P - R - G - K - P - G - K - DG - E - K - G - E - K - G - SP
- G - F - P - G - DSG - Y - P - G - L - P - G - R - E - G - L - K - G - DK - G - E - A - G - P - P
- G - P - P - G - TV - I - G - P - G - L - L - G - E - K - G - E - R - G - Y - P - G - A - P - G - L
- R - G - E - P - G - P - K - G - F - P - G - L - QG - QP - G - P - P - G - L - P - I - P - G - QP -
G - A - P - G - Y - P - G - E - R - G - E - K - G - DQG - F - P - G - V - SL - P - G - P - SG - R
- DG - F - P - G - P - P - G - P - P - G - P - P - G - QP - G - H - TNG - I - V - E - CQP - G - P
- P - G - DQG - L - P - G - SP - G - QP - G - L - TG - E - V - G - E - K - G - QK - G - E - SCL
- I - CDSTG - L - R - G - P - P - G - P - QG - P - P - G - E - I - G - F - P - G - QPT

Fig. 2. Results of enzymes action using PRO+PAP in M3V819 (fragment).

4. Conclusion

The use of collagen peptides for functional foods faces a number of challenges, such as insufficient evidence of clinical efficacy, industrial scale production, as well as food processing and storage. Nevertheless, an innovative approach, such as *in silico* hydrolysis, can predict and optimize the production of bioactive peptides using a targeted type and combination of actions of various commercial enzymes.

Carried out research indicates that pork collagen may serve as a precursor for the release of bioactive peptides acting against oxidants. The performed analysis shows that while the use of two proteolytic enzymes, is the most efficient in the generation of peptides with antioxidant properties. Among the analyzed sequences, Q8HYS2 (collagen type V, alpha 3 chain) and M3V819 (collagen type IV, alpha 1 chain) was the most abundant in antioxidant peptides.

5. References

- Bhakta G, Lim ZX, Rai B, et al. (2013) The influence of collagen and hyaluronan matrices on the delivery and bioactivity of bone morphogenetic protein-2 and ectopic bone formation. *Acta Biomaterialia* 9(11): 9098-9106.
- Chi CF, Cao ZH, Wang B, et al. (2014) Antioxidant and functional properties of collagen hydrolysates from Spanish mackerel skin as influenced by average molecular weight. *Molecules* 19(8): 11211-11230.
- Choonpicharn S, Jaturasitha S, Rakariyatham N, et al. (2015) Antioxidant and antihypertensive activity of gelatin hydrolysate from Nile tilapia skin. *Journal of Food Science and Technology* 52(5): 3134-3139.
- Fu Y, Wu W, Zhu M, et al. (2016a) In silico assessment of the potential of patatin as a precursor of bioactive peptides. *Journal of Food Biochemistry* 40(3): 366-370.
- Fu Y, Young JF, Løkke MM, et al. (2016b) Revalorisation of bovine collagen as a potential precursor of angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides based on in silico and in vitro protein digestions. *Journal of Functional Foods* 24: 196-206.
- Fu, Y, Therkildsen, M, Aluko RE, et al. (2018) Exploration of collagen recovered from animal by-products as a precursor of bioactive peptides: Successes and challenges. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*: 1-17.
- Gómez-Guillén MC, Giménez B, López-Caballero MA, et al. (2011). Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review. *Food Hydrocolloids* 25(8): 1813-182.
- Gómez-Guillén G, López Caballero ME, Alemán A, et al. (2010) Antioxidant and antimicrobial peptide fractions from squid and tuna skin gelatin. Sea by-products as a raw material: New ways of application. Bihan, E. L. y Koueta, N. (ed.), pp. 89-115. Transworld Research Networ Signpost. Kerala, India.
- Kim SK, Kim YT, Byun HG, et al. (2001a) Purification and characterization of antioxidative peptides from bovine skin. *BMB Reports* 34(3): 219-224.
- Kim SK, Kim YT, Byun HG, et al. (2001b) Isolation and characterization of antioxidative peptides from gelatin hydrolysate of Alaska pollack skin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49(4): 1984-1989.
- Lafarga T, Hayes M (2014) Bioactive peptides from meat muscle and by-products: generation, functionality and application as functional ingredients. *Meat Science* 92: 227-239.
- Light N, Champion A (1984) Characterization of muscle epimysium, perimysium and endomysium collagens. *Biochemical Journal* 219(3): 1017-1026.
- Mora L, Reig M, Toldrá F (2014) Bioactive peptides generated from meat industry by-products. *Food Research International* 65: 344-349.
- Saiga AI, Iwai K, Hayakawa T, et al. (2008) Angiotensin I-converting enzyme-inhibitory peptides obtained from chicken collagen hydrolysate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56(20): 9586-9591.

- Song H, Zhang S, Zhang L, et al. (2017) Effect of Orally Administered Collagen Peptides from Bovine Bone on Skin Aging in Chronologically Aged Mice. *Nutrients* 9(11): 1209.
- Toldrá F, Mora L, Reig M (2016) New insights into meat by-product utilization. *Meat Science* 120: 54-59.
- Udenigwe C, Howard A (2013) Meat proteome as source of functional biopeptides. *Food Research International* 54: 1021-1032.
- Vercruyse L, Van Camp JG, Smagghie G (2005) ACE inhibitory peptides derived from enzymatic hydrolysates of animal muscle protein: A review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 8106-8115.
- Wang B, Wang YM, Chi CF, et. al. (2013). Isolation and characterization of collagen and antioxidant collagen peptides from scales of croceine croaker (*Pseudosciaena crocea*). *Marine Drugs* 11(11): 4641-4661.

9. Rizobiowe czynniki Nod – rola w symbiozie roślin bobowata – *Rhizobium* oraz zastosowanie w praktyce rolniczej

Mikołaj Krysa⁽¹⁾, Dominika Kidaj⁽¹⁾, Iwona Komaniecka⁽¹⁾, Katarzyna Suśniak⁽¹⁾, Anna Sroka-Bartnicka^(1,2)

⁽¹⁾Zakład Genetyki i Mikrobiologii, Wydział Biologii i Biotechnologii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

⁽²⁾Zakład Biofarmacji, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Analityki Medycznej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

Opiekun Naukowy: Dominika Kidaj

Mikołaj Krysa: karkstark@gmail.com

Słowa kluczowe: Rizobia, Lipochitooligosacharydy, flawonoidy

Streszczenie

Symbioza pomiędzy rizobiami i roślinami bobowatymi inicjowana jest w wyniku wymiany swoistych sygnałów molekularnych, zarówno pochodzenia roślinnego (flawonoidy), jak i bakteryjnego (lipochitooligosacharydy, tzw. czynniki Nod). Jest to zjawisko korzystne dla obu partnerów. Rizobia wiążą azot atmosferyczny i przekazują ten pierwiastek roślinnemu gospodarzowi w zamian za produkty fotosyntezy. Izolowane rizobiowe czynniki Nod mogą znaleźć zastosowanie w praktyce rolniczej jako czynnik przyspieszający inicjację symbiozy roślin bobowatych z obecnymi w glebie rizobiami lub dodatkowy składnik szczepionek zawierających efektywne wyselekcjonowane szczepy rizobiowe. Dodatkowo, czynniki Nod są skutecznym mitogenem, dzięki czemu przyspieszają kiełkowanie, wzrost i plonowanie również roślin niebobowatych niezdolnych do nawiązywania symbiozy z rizobiami.

1. Wstęp

Bakterie z rodzaju *Rhizobium* należą do grupy mikroorganizmów Gram-ujemnych. Powszechnie nazywane są bakteriami brodawkującymi, ponieważ nawiązują symbiozę z roślinami bobowatymi i zasiedlają brodawki korzeniowe tych roślin. Rizobia są zdolne do biologicznego wiązania azotu atmosferycznego i przekształcania go w formę przyswajalną dla roślin - amoniak. Dzięki symbiozie z rizobiami rośliny bobowate nie są uzależnione od zewnętrznych źródeł azotu, takich jak nawozy sztuczne, i rosną również na glebach ubogich w ten pierwiastek. W zamian za zredukowane związki azotu roślina-gospodarz dostarcza bakteriom produkty fotosyntezy, takie jak cukry i aminokwasy (Long 1989).

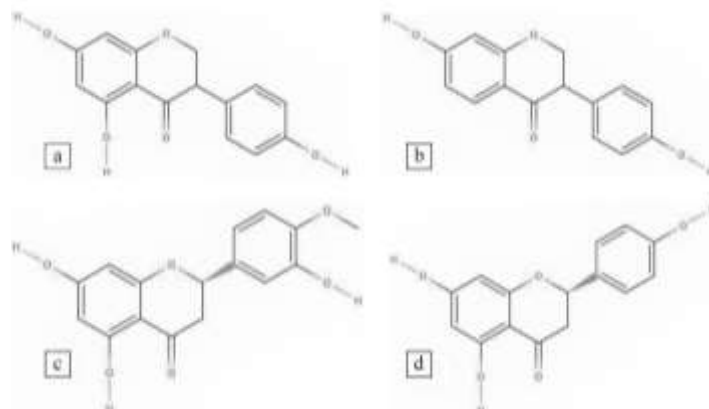
2. Inicjacja i przebieg symbiozy rizobia – roślina bobowata

Proces nawiązywania symbiozy jest wieloetapowy i wymaga udziału swoistych, zarówno roślinnych, jak i bakteryjnych, cząsteczek sygnałowych. Rośliny bobowate wydzielają do gleby flawonoidy, które są atraktantami dla specyficznych bakterii z rodzaju *Rhizobium* (Aguilar i in. 1988). Bakterie przemieszczają się wraz ze zwiększającym się stężeniem flawonoidu w kierunku korzeni rośliny. Specyficzne flawonoidy indukują u rizobiów ekspresję genów nodulacyjnych (geny *nod*), czyli syntezę tzw. czynników Nod (Peters i in. 1986). Bakterie ulegają adsorpcji do powierzchni włóśników korzeniowych roślinnego gospodarza (Dazzo i in. 1976). Czynniki Nod oddziałują z receptorami rośliny, w wyniku czego komórki włóśnikowe korzenia ulegają deformacji, a rizobia zostają otoczone ścianą zdeformowanego włóśnika, który przyjmuje kształt „laski pasterza”. Ostatecznie roślina wytwarza tubularną strukturę nazywaną „nicią infekcyjną” (Hirsch, 1992). Jednocześnie, wewnątrz kory korzenia następuje inicjacja podziałów komórkowych i tworzą się związki brodawek. Zamknięte wewnątrz nici infekcyjnej rizobia namnażają się i wnikają do komórek brodawki na zasadzie endocytozy. Wewnątrz brodawek bakterie przekształcają się do postaci bakteroidów wiążących azot atmosferyczny (Oke i Long 1999). Bakteroidy otacza błona

perybakteroidalna, która umożliwia bakteriom wymianę związków azotowych na produkty fotosyntezy, a roślinna leghemoglobina zapewnia beztlenowe środowisko niezbędne dla aktywności enzymów redukujących N₂ (Mellor 1989).

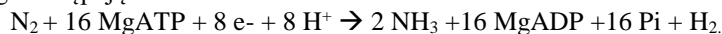
Symbioza roślinna bobowata-rizobia jest specyficzna, co oznacza, iż tylko konkretny gatunek (a czasem nawet biowar) bakterii nawiązuje symbiozę z konkretnym gatunkiem rośliny bobowatej. Na przykład *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaesoli* nawiązuje symbiozę z fasolą (*Phaseolus vulgaris*), ale nie wchodzi w symbiozę z soją (*Glycine max*). Specyficzność ta regulowana jest przynajmniej na dwóch poziomach. Pierwszy z nich warunkują roślinne flawonoidy wydzielane przez korzenie roślin. Określony flawonoid indukuje transkrypcję genów *nod* tylko u swoistych dla gatunku rośliny bobowatej bakterii. Flawonoidy sojowe, genisteina i daidzeina (Rys. 1. a i b), aktywują geny *nod* u *Bradyrhizobium* (Sugiyama i in. 2007). Flawonoidy produkowane przez groch – hespertyna i naringenina (Rys. 1. c i d), aktywują geny *nod* u *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* (Begum i in. 2001). Flawonoidy produkowane przez koniczynę, np. 7,4'-dihydroksyflawon, aktywują geny *nod* u *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* (Maj i in. 2010).

Flawonoidy łączą się z bakteryjnym białkiem regulatorowym NodD, dzięki czemu rizobia syntetyzują kolejną cząsteczkę sygnałową, tzw. czynniki Nod. Czynniki Nod posiadają podstawniki chemiczne determinujące zakres gospodarza roślinnego. Połączenie–specyficznego czynnika Nod z receptorem roślinnym aktywuje w roślinie syntezę białek z grupy tzw. nodulin, podziały mitotyczne kory korzenia, powstawanie zawiązków brodawek oraz nici infekcyjnych, dzięki którym bakterie mogą zasiedlić powstającą brodawkę (Long 1996).



Rys. 1. Przykładowe flawonoidy indukujące transkrypcję rizobiowych genów *nod*: genisteina (a), daidzeina (b), hespertyna (c) i naringenina (d) (za: Johnson i Loo 2000).

Bakteroidy wiążą i przekształcają azot atmosferyczny (N₂) do amoniaku. Reakcja ta przebiega następująco:



Jest ona katalizowana przez kompleks enzymatyczny dinitrogenazy (Igarashi i Seefeldt 2003). Białka tworzące ten kompleks kodowane są przez geny operonu *nifHDK* (Fischer 1994). Zredukowany azot przekazywany jest roślinie w formie aminokwasów – alaniny i kwasu asparaginowego (Rys. 2.)

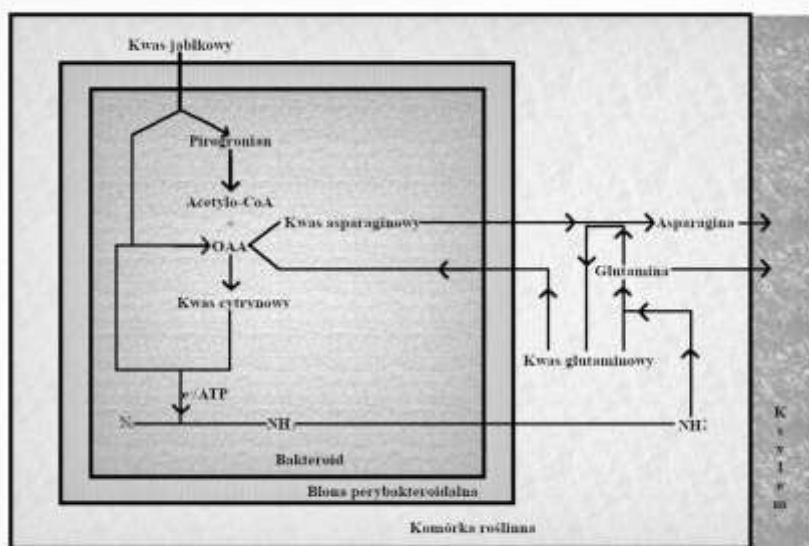
3. Synteza czynników Nod

Czynniki Nod kodowane są przez rizobiowe geny *nod* zorganizowane w operony. Zlokalizowane są one zwykle na plazmidzie symbiotycznym, np. u *Rhizobium leguminosarum* (Rys. 3.) (Djordjevic i in. 1987), ale czasem mogą występować na chromosomie bakteryjnym w obrębie tzw. „wyspy symbiotycznej”, np. u *Bradyrhizobium sp.* (Rys. 4.) (Kosslak i in. 1987).

Geny *nod* dzielimy na tzw. geny wspólne *nod* (ang. common nod genes), gen regulatorowy *nodD*, geny specyficzności gospodarza (ang. host-specific nodulation genes).

Do genów wspólnych *nod* zaliczamy geny *nodABC*, kodujące enzymy odpowiedzialne za syntezę części rdzeniowej czynników Nod. Są to geny wysoce konserwatywne, co oznacza, że ich

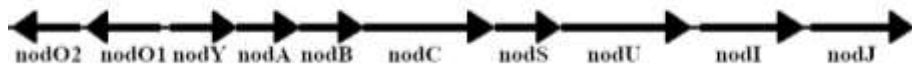
sekwencja nukleotydowa jest niemal identyczna u różnych gatunków rizobiów. Różnice dotyczą głównie genu *nodA*. Gen ten koduje acetylotransferazę, której funkcją jest podstawienie łańcucha N-acetylowego do rdzenia oligosacharydowego. Długość łańcucha N-acetylowego jest cechą charakteryzującą dany gatunek bakterii brodawkującej (Suominen i in. 2001). Gen *nodB* koduje z kolei białko NodB, którego zadaniem jest deacetylacja cząsteczki N-acetylglukozaminy na końcu nieredukującym, co umożliwi następnie przyłączenie kwasu tłuszczowego (John i in. 1993). Natomiast gen *nodC*, kodujący transferazę N-acetylo-D-glukozaminy, odpowiada za syntezę rdzenia cukrowego złożonego z cząsteczek N-acetylglukozaminy (Atkinson i Long 1992).



Rys. 2. Cykl aminokwasów związany z przekazywaniem roślinie zredukowanych form azotu atmosferycznego (za: Lodwig i in. 2003).



Rys. 3. Układ genów *nod* na plazmidzie *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* (za: Clark 2008).



Rys. 4. Układ genów *nod* na chromosomie *Bradyrhizobium japonicum* (za: Hirsch 1992).

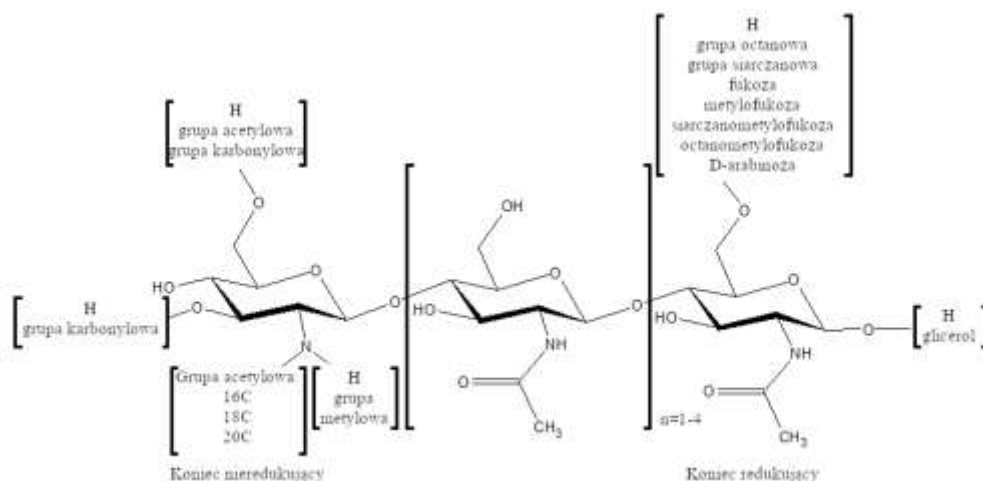
Gen regulatorowy *nodD* koduje białko Nod D. Białko to posiada funkcję autoregulacyjną – hamuje ekspresję własnego genu w przypadku braku flawonoidów specyficznych dla danego gatunku bakterii. W obecności określonych flawonoidów NodD indukuje ekspresję genów *nodABC* oraz genów specyficzności gospodarza (Clark 2008).

Geny specyficzności gospodarza stanowią niejednorodną, zróżnicowaną gatunkowo grupę genów. Ich główną funkcją jest przyłączanie do części rdzeniowej czynnika Nod specyficznych gatunkowo podstawników. Do genów specyficzności gospodarza należą na przykład geny *nodE* i *nodF* kodujące białka biorące udział w syntezie reszt acylowych (Long 1996). Produkt genu *nodG* wykazuje aktywność oksydoredukcyjną, a więc bierze udział w reakcjach utlenienia-redukcji podstawników czynnika Nod (Slabas i in. 1992). Gen *nodH* natomiast koduje białko wykazujące aktywność sulfotransferazy, co oznacza, iż bierze ono udział w tworzeniu reszt sulfonowych (Ehrhardt i in. 1995). Produkt genu *nodZ* wykazuje aktywność fukozylotransferazy, czyli przyłącza reszty fukozy do rdzenia czynnika Nod (Bras i in. 2000). Są to jedynie wybrane geny specyficzności

gospodarza. W rzeczywistości jest ich znacznie więcej. Zróżnicowanie podstawników umożliwia specyficzne łączenie się czynników Nod z receptorami na korzeniach roślinnych gospodarzy (Horvath i in. 1987; Long 1989).

4. Struktura chemiczna czynników Nod

Rizobiowe czynniki Nod to lipochitoooligosacharydy. Część oligosacharydowa tworzy rdzeń cząsteczki czynnika Nod. Składa się on z 3-5 cząsteczek N-acetylo-D-glukozaminy, które połączone są ze sobą wiązaniami β -1,4-glikozydowymi. Część lipidowa jest zwykle cząsteczką 18-20 węglowego kwasu tłuszczowego przyłączonego wiązaniem amidowym do nieredukującego końca oligosacharydowego rdzenia. Rdzeń cukrowy podstawiony jest cząsteczkami decydującymi o zakresie specyficzności gospodarza, takimi jak reszty karbonylowe, metylowe, siarczanowe, glicerolowe, acylowe, fukozowe, pochodne fukozowe czy acetylowe (Ryc. 5.) (Long 1996).



Rys. 5. Budowa chemiczna czynników Nod (za: Long, 1996).

5. Rizobia i czynniki Nod w praktyce rolniczej

Czynnikiem, który najbardziej ogranicza plonowanie roślin jest dostępność azotu. Azot atmosferyczny jest dla roślin niedostępny. Rolnicy radzą sobie z tym problemem nawożąc pola sztucznymi nawozami azotowymi. Praktyka ta nie jest jednak obojętna dla środowiska naturalnego. Nadmierne nawożenie azotowe sprawia, że związki azotu przedostają się z gleby do wód gruntowych oraz powierzchniowych zbiorników wodnych doprowadzając do ich eutrofizacji.

Tradycyjnym sposobem, zastępującym nawożenie sztucznymi nawozami azotowymi, jest wykorzystanie tzw. zielonego nawozu. Jest to praktyka rolnicza polegająca na uprawie roślin bobowatych rok przed danym sezonem wegetacyjnym lub jako poplon. Po rozłożeniu się roślin, azot związany przez rizobia w brodawkach korzeniowych dostaje się do gleby i może być wykorzystany przez rośliny następcze, np. zboża (Calandra i in. 2016).

Zwiększenie wydajności symbiozy, czyli ilości zredukowanego azotu atmosferycznego, jest możliwe po zastosowaniu szczepionek mikrobiologicznych z żywymi komórkami rizobii specyficznych dla uprawianej rośliny. Przykładem może być szczepionka bradyrizobiowa w uprawie łubinu (*Lupinus*) i soi (Martyniuk i in. 2013), preparat z *R. leguminosarum* bv. *viciae* w uprawie wyki kosmatej (Apow i in. 2011) czy zastosowanie *Rhizobium galegae* w hodowli rutwicy wschodniej (Symanowicz i Kalembasa 2010). Mimo, że szczepionki rizobiowe ogólnie zwiększają plonowanie roślin bobowatych, a sam proces szczepienia jest prosty i stosunkowo tani, to niestety praktyka ta ma również wady. Jedną z nich jest niska konkurencyjność bakterii szczepionkowych w stosunku do szczepów autochtonicznych. A zatem znaczący wzrost plonowania po zastosowaniu szczepionki obserwujemy tylko w przypadku nieobecności specyficznego mikrosymbionta w glebie, np. uprawy soi w Ameryce Północnej, oraz na glebach naturalnie ubogich w rizobia (Martyniuk i in. 2013).

Istnieje też wiele doniesień dotyczących zastosowania izolowanych rizobiowych czynników Nod. Aplikacja specyficznych czynników Nod na nasiona roślin bobowatych wpływa pozytywnie na poziom plonowania oraz wydajności fotosyntetycznej roślin. Preparaty zawierające izolowane rizobiowe czynniki Nod wyraźnie zwiększają liczbę brodawek na korzeniach roślin bobowatych, które stanowią siedlisko dla autochtonicznych rizobiów. Dzięki temu możliwe jest zwiększenie ilości związanego N₂, mimo że poszczególne szczepy rizobiów, naturalnie występujące w danej glebie, nie wykazują wysokiej wydajności symbiotycznej. Bionawozy z czynnikami Nod są również wolne od wad szczepionek mikrobiologicznych z żywymi komórkami rizobiów, czyli niskiej przeżywalności bakterii przy nieodpowiednich warunkach przechowywania i stosowania oraz konieczności konkurowania ze szczepami autochtonicznymi.

Eksperyment wykazujący zwiększoną fotosyntezę u roślin bobowatych po zastosowaniu czynników Nod przeprowadzono między innymi na soi z wykorzystaniem czynników Nod *Bradyrhizobium japonicum*. W podobnym doświadczeniu wykazano także wzrost fotosyntezy u kukurydzy (*Zea mays*), czyli u rośliny niebobowatej (Khan i in. 2008).

Inne badania z izolowanymi rizobiowymi czynnikami Nod wykazały zwiększone plonowanie soi zaindukowanej czynnikami Nod *Bradyrhizobium japonicum* (Souleimanov 2002), grochu i wyki po aplikacji na nasiona czynników Nod *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* (Kidaj i in. 2012); lucerny po zastosowaniu czynników Nod *Sinorhizobium meliloti* (Oláh i in. 2005).

Czynniki Nod, oprócz działania stymulującego symbiozę pomiędzy rośliną bobowatą a rizobiami, mają również aktywność mitogenną. Indukują podziały komórkowe nie tylko w korze korzenia roślin bobowatych, ale także we wszystkich innych merystemach u roślin niebobowatych (Tirichine i in. 2007). Podjęto pozytywne próby zwiększenia plonowania ryżu (*Oryza sativa*) i rzodkiewnika (*Arabidopsis thaliana*) po aplikacji czynników Nod *Bradyrhizobium japonicum* (Prithiviraj i in. 2003) oraz kukurydzy indukowanej preparatem czynników Nod *Bradyrhizobium japonicum* (Souleimanov 2002).

Rośliny niebobowate również mogą odnosić korzyści dzięki rizobiom. Powierzchnia korzeniowa tych roślin jest kolonizowana przez bakterie rizobiowe, a ich pozytywny wpływ na plonowanie może być spowodowany wieloma czynnikami, m. in. produkcją przez rizobia fitohormonów, sideroforów, cyjanowodoru oraz przeciwdziałaniem infekcjom patogennych grzybów (Antoun i in. 2016). Zwiększenie plonowania roślin niebobowatych dzięki szczepionkom rizobiowym zaobserwowano między innymi w przypadku rzodkiewki (*Raphanus sativus*) (Antoun i in. 2016), sorga (*Sorghum*), czy prosa (*Panicum miliaceum*) (Matiru i Dakora 2004).

Aby zwiększyć wydajność symbiozy podjęto próby modyfikacji genetycznych rizobiów. Uzyskano szczepy *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 1003, 1010, 1011, 1012 i 1013 odporne na związki rtęci, co zwiększyło przeżywalność tych bakterii w warunkach stresu, a tym samym wpłynęło pozytywnie na wydajność wiązania azotu atmosferycznego (Corich i in. 2007). Niestety po kilku latach od wprowadzenia genetycznie modyfikowanych rizobiów do gleby były one eliminowane przez dzikie szczepy autochtoniczne w wyniku naturalnej konkurencji (Corich i in. 2007; Da i Deng 2003).

6. Wnioski

Dzięki zastosowaniu bakterii rizobiowych oraz produkowanych przez nie czynników Nod rolnictwo może stać się tańsze, bardziej wydajne oraz ograniczymy zanieczyszczenie środowiska. Jednak wciąż niezbędne są dalsze badania między innymi nad strukturą chemiczną czynników Nod, metodami wydajnej izolacji tych związków, czy ich syntezy chemicznej. Równie istotne są dalsze próby modyfikacji genetycznej rizobiów, aby nie tylko zwiększyć wydajność wiązania azotu atmosferycznego, ale także uzyskać mikroorganizmy wystarczająco konkurencyjne w stosunku do dzikich szczepów zasiedlających gleby.

Badania finansowane przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju w ramach realizacji projektu Lider (nr projektu: LIDER/11/0070/L-8/16/NCBR/2017).

7. Literatura

- Aguilar MM, Ashby AM, Richards AJM i in. (1988) Chemotaxis of *Rhizobium leguminosarum* biovar *pheasoli* towards flavonoid inducers of the symbiotic nodulation genes. *Journal of General Microbiology* 134: 2741–2746.
- Antoun H, Beauchamp CJ, Goussard N i in. (2016) Potential of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species as plant growth promoting rhizobacteria on non-legumes: Effect on radishes (*Raphanus sativus* L.). *Plant and Soil* 204(1): 57–67.
- Apow MKŁ, Szewcow AW, Seriegin SW (2011) Podstawy selekcji i technologii uprawy wyki kosmatej (*Vicia villosa* Roth.) na ziarno w warunkach Rosji Centralnej. *Water-Environment-Rural Areas* 3(35): 293–301.
- Atkinson EM, Long SR (1992) Homology of *Rhizobium meliloti* NodC to polysaccharide polymerizing enzymes. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 5(5): 439–442.
- Begum AA, Leibovitch S, Migner P i in. (2001) Specific flavonoids induced nod gene expression and pre-activated nod genes of *Rhizobium leguminosarum* increased pea (*Pisum sativum* L.) and lentil (*Lens culinaris* L.) nodulation in controlled growth chamber environments. *Journal of Experimental Botany* 52(360): 1537–1543.
- Bras CP, Jordá MA, Wijnfjes AHM i in. (2000) A *Lotus japonicus* nodulation system based on heterologous expression of the fucosyl transferase NodZ and the acetyl transferase NodL in *Rhizobium leguminosarum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 13(4): 475–479.
- Calandra DM, Mauro D, Cutugno F i in. (2016) Navigating wall-sized displays with the gaze: A proposal for cultural heritage. *Plant and Soil* 1621: 36–43.
- Clark JM (2008) Evidence that DNA involved in the expression of nodulation (nod) genes in *Rhizobium* binds to the product of the regulatory gene *nodD*. *Nucleic Acids Research* 36(19): 9677–9690.
- Corich V, Giacomini A, Vendramin E i in. (2007) Long term evaluation of field-released genetically modified rhizobia. *Environmental Biosafety Research* 6(3): 167–181.
- Da HN, Deng SP (2003) Survival and persistence of genetically modified *Sinorhizobium meliloti* in soil. *Applied Soil Ecology* 22(1): 1–14.
- Dazzo FB, Napoli CA, Hubbell DH (1976) Adsorption of bacteria to roots as related to host specificity in the *Rhizobium*-clover symbiosis. *Applied and Environmental Microbiology* 32(1): 166–171.
- Djordjevic MA, Redmond JW, Batley M i in. (1987) Clovers secrete specific phenolic compounds which either stimulate or repress nod gene expression in *Rhizobium trifolii*. *The EMBO Journal* 6(5): 1173–9.
- Ehrhardt DW, Atkinson EM, Faull KF i in. (1995) In vitro sulfotransferase activity of NodH, a nodulation protein of *Rhizobium meliloti* required for host-specific nodulation. *Journal of Bacteriology* 177(21): 6237–6245.
- Fischer HM (1994) Genetic regulation of nitrogen fixation in rhizobia. *Microbiological reviews* 58(3): 352–386.
- Hirsch AM (1992) Developmental biology of legume nodulation. *New Phytologist* 122(40): 211–237.
- Horvath B, Bachem CW, Schell J i in. (1987) Host-specific regulation of nodulation genes in *Rhizobium* is mediated by a plant-signal, interacting with the *nodD* gene product. *The EMBO Journal* 6(4): 841–8.
- Igarashi RY, Seefeldt LC (2003) Nitrogen fixation: the mechanism of the Mo-dependent nitrogenase. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 38(4): 351–384.
- John M, Rohrig H, Schmidt J i in. (1993) *Rhizobium* NodB protein involved in nodulation signal synthesis is a chitooligosaccharide deacetylase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90(2): 625–629.
- Johnson MK, Loo G (2000) Effects of epigallocatechin gallate and quercetin on oxidative damage to cellular DNA. *Mutation Research* 459(3): 211–218.

- Khan W, Prithiviraj B, Smith DL (2008) Nod factor [Nod B_j V (C18:1, MeFuc)] and lumichrome enhance photosynthesis and growth of corn and soybean. *Journal of Plant Physiology* 165(13): 1342–1351.
- Kidaj D, Wielbo J, Skorupska A (2012) Nod factors stimulate seed germination and promote growth and nodulation of pea and vetch under competitive conditions. *Microbiological Research* 167(3): 144–150.
- Kosslak RM, Bookland R, Barkei J i in. (1987) Induction of *Bradyrhizobium japonicum* common nod genes by isoflavones isolated from *Glycine max*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84(21): 7428–7432.
- Lodwig EM, Hosie AHF, Bourdès A i in. (2003) Amino-acid cycling drives nitrogen fixation in the legume-Rhizobium symbiosis. *Nature* 422(6933): 722–726.
- Long SR (1989) Rhizobium-legume nodulation: Life together in the underground. *Cell* 56(2): 203–214.
- Long SR (1996) Rhizobium symbiosis: Nod factors in perspective. *The Plant Cell* 8: 1885–1898.
- 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(1): 50–60.
- Martyniuk S, Koziel M, Stalenga J (2013) Effect of various strains of symbiotic bacteria on yields and nodulation of lupine and soybean. *Journal of Research and Applications in Agricultural Engineering* 58(4): 67–70.
- Matiru VN, Dakora FD (2004) Potential use of rhizobial bacteria as promoters of plant growth for increased yield in landraces of African cereal crops. *African Journal of Biotechnology* 3: 1–7.
- Mellor RBF (1989) Bacteroids in the Rhizobium-legume symbiosis inhabit a plant internal lytic compartment: Implications for other microbial endosymbioses. *Journal of Experimental Botany* 40(217): 831–839.
- Oke V, Long, SR (1999) Bacteroid formation in the Rhizobium-legume symbiosis. *Current Opinion in Microbiology* 2(6): 641–646.
- Oláh B, Brière C, Bécard G i in. (2005) Nod factors and a diffusible factor from arbuscular mycorrhizal fungi stimulate lateral root formation in *Medicago truncatula* via the DMI1/DMI2 signalling pathway. *The Plant Journal* 44(2): 195–207.
- Peters NK, Frost JW, Long SR (1986) A plant flavone, luteolin, induces expression of *Rhizobium meliloti* nodulation genes. *Science* 233(4767): 977–980.
- Prithiviraj B, Zhou X, Souleimanov A i in. (2003) A host-specific bacteria-to-plant signal molecule (Nod factor) enhances germination and early growth of diverse crop plants. *Planta* 16(3): 437–445.
- Slabas AR, Chase D, Nishida I i in. (1992) Molecular cloning of higher-plant 3-oxoacyl-(acyl carrier protein) reductase. Sequence identities with the nodG-gene product of the nitrogen-fixing soil bacterium *Rhizobium meliloti*. *Biochemical Journal* 283: (Pt 2), 321–6.
- Souleimanov A (2002) The major Nod factor of *Bradyrhizobium japonicum* promotes early growth of soybean and corn. *Journal of Experimental Botany* 53(376): 1929–1934.
- Sugiyama A, Shitan N, Yazaki K (2007) Involvement of a soybean ATP-binding cassette-type transporter in the secretion of genistein, a signal flavonoid in legume-Rhizobium symbiosis. *Plant Physiology* 144(4): 2000–2008.
- Suominen L, Roos C, Lortet G i in. (2001) Identification and structure of the *Rhizobium galegae* common nodulation genes: Evidence for horizontal gene transfer. *Molecular Biology and Evolution* 18(6): 907–916.
- Symanowicz B, Kalembsa S (2010) Wpływ nawożenia fosforowo-potasowego na plon i zawartość makroelementów w biomacie rutwicy wschodniej (*Galega orientalis* Lam.). *Fragmenta Agronomica* 27(1): 177–185.
- Tirichine L, Sandal N, Madsen LH i in. (2007) A gain-of-function mutation in a root nodule organogenesis. *Science* 2680: 104–107.

10. Wpływ stężenia fruktozy i glukozy na namnażanie jeżówki purpurowej (*Echinacea purpurea* L.) w kulturach *in vitro*

Influence of the concentration of fructose and glucose on *in vitro* propagation of purging bulbs (*Echinacea purpurea* L.)

Kulik Cecylia, Krupa-Mańkiewicz Marcelina

Katedra Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin, Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie

Opiekun naukowy: Marcelina Krupa-Mańkiewicz

Kulik Cecylia: cyl.usia@gmail.com

Słowa kluczowe: cukry proste, mikrorozmnażanie, jeżówka

Streszczenie

Celem badań było określenie wpływu alternatywnych źródeł węgla takich, jak glukoza i fruktoza na wzrost i rozwój *Echinacea purpurea* L. w kulturach *in vitro*. Materiał badawczy stanowiły nasiona *Echinacea purpurea* L. otrzymane z firmy PNOS Ożarów Mazowiecki. Po sześciu tygodniach dokonano pomiarów cech morfologicznych tj.: wysokość roślin, liczbę wytworzonych pędów, długość korzeni, świeżą i suchą masę oraz procentową zawartość wody. Na podstawie otrzymanych wyników badań stwierdzono, iż rodzaj i stężenie cukrów w pożywkach MS nie miały statystycznie istotnego wpływu na badane cechy morfologiczne *Echinacea purpurea* namnażanej w warunkach *in vitro*. Za optymalną pożywkę do namnażania roślin jeżówki na podstawie cech fenotypowych była pożywka MS wzbogacona 30 g·dm⁻³ fruktozy.

1. Wstęp

Echinacea purpurea L. znana również jako jeżówka purpurowa to wieloletnia roślina zielna z rodziny *Asteraceae*. Preparaty z jeżówki purpurowej stosowane są w celach leczniczych, w leczeniu ostrych zakażeń górnych dróg oddechowych, infekcjach dróg moczowych, oparzeniach i zaburzeniach, takich jak infekcje wirusowe, zakażenia skórne i choroby przewlekłe spowodowane niedoborem odpowiedzi immunologicznej (Stanisavljević 2009). Korzenie, liście lub cała roślina mogą być również stosowane w przygotowaniu suplementów diety. Preparaty z jeżówki purpurowej stanowią grupę najlepiej sprzedających się zarówno w Stanach Zjednoczonych, jak i w Europie specyfików o działaniu immunostymulującym. Plantacje jeżówki powstają dla potrzeb rynku zielarskiego w różnych rejonach świata: w Europie, Stanach Zjednoczonych, Ameryce Południowej i w Afryce. W Tanzanii jeżówka purpurowa jest uprawiana również na kwiat cięty i eksportowana do Europy Zachodniej. W naturze jeżówka porasta ubogie w składniki mineralne skaliste ziemie prerii Wielkich Równin w Stanach Zjednoczonych oraz w Krainie Wielkich Jezior pomiędzy USA i Kanadą (Biesiada i in. 2006).

W kulturach *in vitro* węglowodany są niezbędne roślinom i służą jako źródło energii i węgla do biosyntezy. Komórki roślinne, tkanki i narządy *in vitro* nie są w pełni autotroficzne. Stąd, aby utrzymać potencjał osmotyczny niezbędne jest dostarczenie do pożywki źródła węgla. Węglowodany służą również jako źródło energii dla wysokoenergetycznych procesów rozwojowych, takich jak proliferacja pędów, proces ryzogenezy, embriogeneza i organogeneza (Chae 2013). Niezbędne jest ciągłe dostarczanie węglowodanów do roślin hodowanych w kulturach *in vitro*, ponieważ w wyniku niskiej intensywności światła, ograniczonej wymiany gazowej oraz relatywnie wysokiej wilgotności ich aktywność fotosyntetyczna jest zwykle niska. Węglowodany są również niezbędne, aby utrzymać prawidłowy potencjał osmotyczny. W związku z tym cukry mają potencjalny wpływ na fizjologię, wzrost i różnicowanie komórek w kulturach *in vitro* roślin. W przypadku licznych gatunków najlepszym źródłem węgla dla podtrzymania wzrostu *in vitro* i różnicowania się tkanek jest sacharoza. Cukier ten jest najczęściej stosowanym i najlepiej zbadanym pod tym względem węglowodanem. Niejednokrotnie wykazano, że inne cukry niż sacharoza mogą

z powodzeniem warunkować optymalny wzrost i rozwój w warunkach *in vitro* (Bogunia i Przywara 1999).

Celem niniejszej pracy było określenie wpływu alternatywnych źródeł węgla takich, jak glukoza i fruktoza na wzrost i rozwój *Echinacea purpurea* L. w kulturach *in vitro*.

2. Materiał i metody

Doświadczenie przeprowadzono w Laboratorium Kultur Tkankowych i Komórkowych Katedry Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie. Materiałem wyjściowym do założenia doświadczenia były nasiona *Echinacea purpurea* L. otrzymane z firmy PNOS Ożarów Mazowiecki. Nasiona dezynfekowano 70% roztworem alkoholu etylowego przez 10 sekund i dwukrotnie przepłukano dejonizowaną wodą sterylną. Następnie do dezynfekcji właściwej zastosowano 7% roztwór podchlorynu sodu (NaOCl) przez 15 minut. Po tym czasie dwukrotnie wypłukane dejonizowaną wodą sterylną nasiona, wykładano po jednym do probówek wypełnionych 20 ml pożywki inicjującej MS (Murashige i Skoog, 1962). Przygotowane pożywki poddano wcześniejszemu procesowi autoklawowania przez 19 minut w temperaturze 121°C i ciśnieniu 0.1 MPa. Kultury inkubowano w fitotronie o temperaturze 24°C i 16 godzinnym oświetleniu ($40 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$).



Rys. 1. Fitotron w Laboratorium Kultur Tkankowych i Komórkowych Katedry Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie (fot. C. Kulik).

Zainicjowane do wzrostu eksplantaty trzykrotnie pasażowano na nowe pożywki MS z dodatkiem $1 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ BAP (6-benzylaminopuryna) w celu uzyskania pożądanej liczby roślin niezbędnej do założenia doświadczenia. Kolejnym etapem badań było przygotowanie pożywek doświadczalnych MS zawierających, jako źródło węgla fruktozę i glukozę w stężeniach: $0 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$, $30 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$, $50 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$. Eksplantaty pędowe o długości 10 – 20 mm wykładano po trzy do słoików uzupełnionych 30 ml pożywki MS. Każdą kombinację doświadczenia przeprowadzono w trzech powtórzeniach. Po sześciu tygodniach dokonano pomiarów cech morfologicznych tj.: wysokość roślin, liczbę wytworzonych pędów, długość korzeni, świeżą i suchą masę oraz procentową zawartość wody.

Uzyskane wyniki badań opracowano statystycznie za pomocą programu Statistica 13.1 z wykorzystaniem testu Turkey'a. Istotność różnic oznaczono na poziomie istotności $\alpha=0.05$.



Rys. 2. Praca w warunkach sterylnych w Laboratorium Kultur Tkankowych i Komórkowych Katedry Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie (fot. C. Kulik).

3. Wyniki

Na podstawie przeprowadzonej dwuczynnikowej analizy wariancji wykazano, iż rośliny jeżówki purpurowej namnażane na podłożach o różnym stężeniu i rodzaju cukrów nie różniły się statystycznie istotnie pod względem badanych cech morfologicznych.

3.1 Wysokość roślin

Jak przedstawiono w tab. 1. rośliny rosnące na podłożu MS zawierającym dodatek fruktozy osiągały średnio najwyższą wysokość pędu na pożywce z dodatkiem $30 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ – 1.82 cm. Natomiast najkrótsze pędy na pożywce zawierającej fruktozę zaobserwowano przy stężeniu $50 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ – 0.96 cm. Na podłożu MS z dodatkiem glukozy odnotowano najwyższe rośliny – 0.91 cm przy stężeniu $30 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$, a najniższe – 0.82 cm przy $50 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$. Rośliny z pożywki MS nie zawierającej dodatku cukrów osiągały średnio wysokość 1.72 cm. Na podstawie przeprowadzonej dwuczynnikowej analizy wariancji stwierdzono, iż rodzaj i stężenie cukru nie miał istotnego wpływu na wysokość roślin *Echinacea purpurea*.

Tab. 1. Wpływ rodzaju i stężenia cukru na wysokość roślin [cm] *Echinacea purpurea* w kulturach *in vitro*.

Źródło cukru (I)	Stężenie cukru (II) [$\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$]			Średnia
	0	30	50	
Fruktoza	1.76 a	1.82 a	0.96 a	1.51 A
Glukoza	1.69 a	0.91 a	0.82 a	1.14 A
Średnia	1.72A	1.37AB	0.89 B	

$\text{NIR}_I=0,54 \text{ NIR}_{II}=0,73 \text{ NIR}_{II/I}=1,66$

$\text{NIR}_{\alpha,0,05}$ – Najmniejsza Istotna Różnica na poziomie istotności $\alpha_{0,05}$

3.2 Liczba pędów

W tab. 2. przedstawiano wyniki pomiarów liczby pędów na jednej roślinie. Średnio największą liczbą pędów na jeden roślinie (8) dla jeżówki purpurowej odnotowano na podłożu MS o stężeniu glukozy równym $30 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$. W przypadku glukozy najmniejsza liczba pędów (3) obserwowano przy stężeniu $50 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$. Rośliny z pożywki zawierającej fruktozę osiągały przy stężeniu $30 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ średnio 7 pędów na jednej roślinie, natomiast przy stężeniu $50 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ - 6 pędów. W przypadku braku cukru w pożywce liczba pędów wynosiła średnio 6. Na podstawie przeprowadzonej dwuczynnikowej analizy wariancji stwierdzono, iż rodzaj i stężenie cukru nie miał istotnego wpływu na liczbę pędów roślin *Echinacea purpurea*.

Tab. 2. Wpływ rodzaju i stężenia cukru na liczbę pędów na jednej roślinie *Echinacea purpurea* w kulturach *in vitro*.

Źródło cukru (I)	Stężenie cukru (II) [$\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$]			Średnia
	0	30	50	
Fruktoza	6.89 a	7.22 a	6.00 a	6.70 A
Glukoza	6.89 a	8.33 a	3.53 a	6.26 A
Średnia	6.89A	7.78A	4.78A	

$\text{NIR}_I=2,87 \text{ NIR}_{II}=3,74 \text{ NIR}_{II/I}=8,61$

$\text{NIR}_{\alpha_{0,05}}$ – Najmniejsza Istotna Różnica na poziomie istotności $\alpha_{0,05}$

3.3 Długość korzeni

Najdłuższą średnią długością korzeni – 0.47 cm cechowały się rośliny na podłożu MS z dodatkiem $30 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ fruktozy (Tab. 3.). Na tej pożywce najkrótsze korzenie obserwowano przy stężeniu $50 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ (0.29 cm). Natomiast najkrótszymi korzeniami (0.17 cm) charakteryzowały się rośliny z podłoża MS z dodatkiem $50 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ glukozy. W tym przypadku średnio najdłuższe korzenie obserwowano przy stężeniu $30 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ (0.23 cm). Na podstawie przeprowadzonej dwuczynnikowej analizy wariancji stwierdzono, iż rodzaj i stężenie cukru nie miał istotnego wpływu na długość korzeni roślin *Echinacea purpurea*.

Tab. 3. Wpływ rodzaju i stężenia cukru na długość korzeni roślin [cm] *Echinacea purpurea* w kulturach *in vitro*.

Źródło cukru (I)	Stężenie cukru (II) [$\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$]			Średnia
	0	30	50	
Fruktoza	0.33 a	0.47 a	0.29 a	0.36 A
Glukoza	0.26 a	0.23 a	0.17 a	0.22 A
Średnia	0.29A	0.35A	0.23A	

$\text{NIR}_I=0,20 \text{ NIR}_{II}=0,26 \text{ NIR}_{II/I}=0,59$

$\text{NIR}_{\alpha_{0,05}}$ – Najmniejsza Istotna Różnica na poziomie istotności $\alpha_{0,05}$

3.4 Świeża masa

Dla jeżówki purpurowej namnożonej na pożywce MS zawierającej jako źródło węgla fruktozę, średnio największą masę – 0.12 g odnotowano przy stężeniu cukru równym $30 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ (Tab. 4). Natomiast wśród roślin zawierających $30 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ glukozy zaobserwowano spadek zielonej masy w stosunku do pozostałych kombinacji pożywek i wynosiła ona średnio 0.06 g. Rośliny z pożywki MS nie zawierającej dodatku cukrów osiągały średnio 0.09 g. Na podstawie przeprowadzonej dwuczynnikowej analizy wariancji stwierdzono, iż rodzaj i stężenie cukru nie miał istotnego wpływu na świeżą masę roślin *Echinacea purpurea*.

Tab. 4. Wpływ rodzaju i stężenia cukru na świeżą masę roślin [g] *Echinacea purpurea* w kulturach *in vitro*.

Źródło cukru (I)	Stężenie cukru (II) [g·dm ⁻³]			NIR _{α_{0,05}}
	0	30	50	
Fruktoza	0.09 a	0.12 a	0.10 a	0.10 A
Glukoza	0.09 a	0.06 a	0.08 a	0.08 A
Średnia	0.09A	0.09A	0.09A	

NIR_I=0,05 NIR_{II}=0,07 NIR_{III}=0,13

Najmniejsza Istotna Różnica na poziomie istotności α_{0,05}

3.5 Sucha masa

Rośliny jeżówki purpurowej namnożone na podłożu MS zawierającym 30 g·dm⁻³ fruktozy oraz 50 g·dm⁻³ fruktozy i glukozy po wysuszeniu osiągały średnio najwyższą suchą masę – 0.02 g (Tab. 5). Zaś najniższą suchą masę – 0.01 g odnotowano dla roślin z pożywek MS bez dodatku cukru oraz roślin z pożywek MS z dodatkiem glukozy w stężeniu 30 g·dm⁻³. Na podstawie przeprowadzonej dwuczynnikowej analizy wariancji stwierdzono, iż rodzaj i stężenie cukru nie miał istotnego wpływu na suchą masę roślin *Echinacea purpurea*.

Tab. 5. Wpływ rodzaju i stężenia cukru na suchą masę roślin [g] *Echinacea purpurea* w kulturach *in vitro*.

Źródło cukru (I)	Stężenie cukru (II) [g·dm ⁻³]			Średnia
	0	30	50	
Fruktoza	0.01 a	0.02 a	0.02 a	0.02 A
Glukoza	0.01 a	0.01 a	0.02 a	0.01 A
Średnia	0.01A	0.02A	0.02A	

NIR_I=0,01 NIR_{II}=0,01 NIR_{III}=0,02

NIR_{α_{0,05}} – Najmniejsza Istotna Różnica na poziomie istotności α_{0,05}

3.6 Procentowa zawartość wody

Dla jeżówki purpurowej średnio największa procentowa zawartość wody – 91,60 % została odnotowana na pożywce MS nie zawierającej dodatku cukru (Tab. 6). Natomiast wśród roślin zawierających 50 g·dm⁻³ glukozy zaobserwowano spadek procentowej zawartości wody w stosunku do pozostałych kombinacji pożywek i wynosiła ona średnio 69,09 %. W przypadku pozostałych kombinacji pożywek z dodatkiem badanych w doświadczeniu cukrów, średnia procentowa zawartość wody oscylowała w granicach 80 %. Na podstawie przeprowadzonej dwuczynnikowej analizy wariancji stwierdzono, iż rodzaj i stężenie cukru nie miał istotnego wpływu na procentową zawartość wody w roślinach *Echinacea purpurea*.

Tab. 6. Wpływ rodzaju i stężenia cukru na procentową zawartość wody roślin [%] *Echinacea purpurea* w kulturach *in vitro*

Źródło cukru (I)	Stężenie cukru (II) [g·dm ⁻³]			Średnia
	0	30	50	
Fruktoza	91.60	82.73	83.29	85.88
Glukoza	90.09	80.30	69.09	79.8
Średnia	90.85	81.52	76.19	

NIR_I=3,02 NIR_{II}=3,94 NIR_{III}=7,41

NIR_{α_{0,05}} – Najmniejsza Istotna Różnica na poziomie istotności α_{0,05}

4. Dyskusja

Jednym z głównych czynników wpływających na namnażanie i ukorzenianie roślin w warunkach *in vitro* są cukry. Według Pantahula i in. (2014) źródła węgla służą jako energia do wzrostu tkanek roślinnych oraz jako czynnik osmoregulujący. Węglowodany dodawane do pożywek pełnią funkcję źródła energii niezbędnego do wzrostu i różnicowania się roślin, a także pełnią rolę cząsteczek sygnałowych biorących udział w wielu przemianach metabolicznych.

Na podstawie uzyskanych wyników badań własnych stwierdzono brak istotnego wpływu rodzaju i stężenia cukru na badane cechy morfologiczne (tj. wysokość roślin, liczbę pędów, długość korzeni, świeżą masę, suchą masę, procentową zawartość wody w roślinie). Według Pantahula i in. (2014) ograniczony wzrost roślin *Centella asiatica* (L.) na podłożu z dodatkiem glukozy może wynikać z tego, że nie jest ona skutecznie metabolizowana, a jedynie reguluje potencjał osmotyczny. Natomiast korzystne działanie cukru glukozy na bezpośrednie formowanie pędów *Prunus mume* zaobserwowali Hisashi i Yasuhiro (1996).

Według Bogunia i Przywara (1999) z dotychczasowych badań wynika, że znaczenie morfogenetyczne ma zarówno rodzaj, jak i stężenie cukru w pożywce, przy czym różnym cukrom przypisuje się różne wzory morfogenetyczne. I tak, uważa się, że glukoza jest wydajniejsza w regeneracji rozwoju pędów przybyszowych, podczas gdy sacharoza w indukcji rozwoju korzeni. Obecność glukozy w pożywce jest bardzo pożądana, ponieważ cukier ten jest prekursorem w biosyntezie mezo-inozyolu, ważnego składnika budulcowego błon komórkowych. W przeciwieństwie do wyników otrzymanych w doświadczeniu własnym Bogunia i Przywara (1999) opisują, że w optymalnym stężeniu glukoza była prawie trzykrotnie bardziej efektywna niż sacharoza w indukowaniu pośredniej kaulogenezy.

Jak podaje Kim i in. (2016) glukoza, fruktoza i maltoza wywołują bardzo niskie poziomy regeneracji pędów w porównaniu z sacharozą. Stosowanie glukozy, fruktozy i maltozy powoduje bardzo słabe różnicowanie pędów (Chae 2013). Scott i Lyne (1994) opisali, że w przypadku kultur androgenicznych w obecności sacharozy, glukozy i fruktozy mikrospory zamierały w ciągu trzech pierwszych dni inkubacji. Brak źródła węgla w pożywce powodował śmierć mikrospor dopiero po dłuższym okresie inkubacji. Sacharoza, glukoza i fruktoza mogą zatem w niektórych przypadkach działać toksycznie na hodowle komórkowe. Pożywka bez dodatku cukru powodowała brak wytworzenia nowych pędów znacznie hamując wzrost roślin dwóch odmian petunii. Podobne wyniki w swoich badaniach prezentują Dąbski i Parzymies (2007), którzy również odnotowali najniższy wzrost pędów *Clematis integrifolia* w przypadku braku źródła cukru w pożywce.

Również Owen i in. (1991) obserwowali zahamowanie wzrostu hodowli na autoklawowanych pożywkach zawierających fruktozę. Produkty degradacji fruktozy miały wyraźnie toksyczny charakter. Na pożywkach zawierających fruktozę eksplantaty dębu korkowego nie formowały pędów i rosły bardzo słabo (Bogunia i Przywara 1999). Saweye i Hsiao (1992) wykazali, że kultury zawieszinowe *Beta vulgaris* utrzymywane w autoklawowanej pożywce zawierającej glukozę, stopniowo tracą chlorofil i przestają rosnąć. Jednakże według Ilczuk i in. (2013) fruktoza jest najbardziej korzystnym cukrem do namnażania roślin pęcherznicy kalino-listnej.

W badaniach Yaseen i in. (2013) stwierdzono, że cukry stanowiące źródło energii podczas etapu ukorzeniania, są jednym z najbardziej znaczących czynników w rozwoju rośliny. Ich brak wpływa negatywnie na proces ryzogenezy, powodując najczęściej zahamowanie rozwoju strefy korzeniowej. Podobne obserwacje opisali Mihaljević i in. (2013), w których wykazano, że rodzaj i stężenie cukrów ma istotny wpływ na ukorzenianie pędów wiśni. Najlepszym cukrem pozwalającym uzyskać najwięcej korzeni wiśni okazała się sacharoza dodana do pożywki MS w stężeniu 40 g·dm⁻³. Natomiast najkorzystniej na długość korzeni wiśni oddziaływała fruktoza, którą zastosowano jako dodatek do pożywki w stężeniu 50 g·dm⁻³. Inne do opisanych powyżej wyników obserwowano w przeprowadzonych badaniach własnych. Wykazano w nich brak istotnego wpływu rodzaju i stężenia cukru na długość korzeni oraz na pozostałe badane cechy morfologiczne.

5. Wnioski

Na podstawie przeprowadzonych badań można stwierdzić, iż rodzaj i stężenie cukrów w pożywkach MS nie miały statystycznie istotnego wpływu na badane cechy morfologiczne *Echinacea purpura* namnażanej w warunkach *in vitro*.

Za optymalną pożywkę do namnażania roślin jeżówki na podstawie cech fenotypowych można uznać pożywkę MS wzbogaconą $30 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ fruktozy. Dodatek tego cukru do podłoża wykazał stymulujący wpływ na wysokość roślin, liczbę pędów, długość korzeni, świeżą oraz suchą masę.

Brak źródła cukru w pożywce nie miał statystycznie istotnego wpływu na kształtowanie cech morfologicznych *Echinacea purpurea* na etapie namnażania *in vitro*.

6. Literatura

- Biesiada A, Kucharska A, Sokół-Lętowska A (2006) Wpływ formy i dawki azotu na plonowanie oraz skład chemiczny jeżówki purpurowej (*Echinacea purpurea* Moench.) w pierwszym i drugim roku po posadzeniu. *Acta Agrophysica* 7(4): 829-838.
- Bogunia H, Przywara L (1999) Rola cukrowców w roślinnych kulturach *in vitro*. *Wiadomości Botaniczne* 43(1/2): 25:36.
- Burnie G i in. (2005) *Botanica. Rośliny ogrodowe*. Könemann, ISBN 3-8331-1916-0.
- Chae SCh (2013) Influence of carbon sources on shoot organogenesis in *Echinacea angustifolia* DC. *Life Science Journal*. 10(3).
- Dąbski M, Parzymies M (2007) The influence of type and concentration of carbohydrates on growth and branching of *Clematis integrifolia* *in vitro*. *Annales Universitatis Mariae Curie-Skłodowska Lublin-Polonia Sectio EEE*, 18(2): 49-55.
- Gauchan DP (2011) Effect of different sugars on shoot regeneration of maize (*Zea Mays* L.). *Kathmandu University Journal of Science, Engineering and Technology* 8: 119-124.
- Hisashi H, Yasuhiro M (1996) Micropropagation of *Prunus mume* koehne. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 40(2): 159-167.
- Hossain JMd, Bari AMd, Ara AN et. al. (2013) Impact of carbon sources on callus induction and regeneration ability in banana cv. Sabri. *International Journal of Biosciences* 3(1): 156-163.
- Ilczuk A, Jagiełło-Kubiec K, Jacygrad E (2013) The effect of carbon source in culture medium on micropropagation of common ninebark (*Physocarpus opulifolius* (L.) Maxim.) 'Diable D'or'. *Acta Scientiarum Polonorum, Hortorum Cultus* 12(3): 23-33.
- Kim JK, Baskar TB, Park SU (2016) Effect of carbon sources and sucrose concentrations on shoot organogenesis of *Aloe saponaria*. *Biosciences Biotechnology Research Asia* 13(2): 925-930.
- Mihaljević I, Dugalić K, Tomaš V et. al. (2013) Influence of different carbon sources on *in vitro* rooting of sour cherry cv. Oblačinska. *Pomologia Croatia* 19(1-4): 23-36.
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15:473-497.
- Owen HR, Wengerd D, Miller AR (1991) Culture medium pH is influenced by basal medium, carbohydrate source, gelling agent, activated charcoal and medium storage method. *Plant Cell Rep.* 10: 583-586.
- Panathula CS, Mahadev MD, Naidu CV (2014) Effect of different carbohydrates on *in vitro* plant regeneration of *Centella asiatica* (L.) – An important anti-jaundice medicinal plant. *International Journal of Medicinal Aromatic Plants* 4(1): 41-47.
- Pitekellabou R, Aidam AV, Kokou K (2015) Influence of various carbohydrates on the *in vitro* micropropagation of *Nauclea diderrichii* (De Wild & T. Durand), an endangered forest species in Togo. *African Journal of Biotechnology* 14(15): 1283-1289.
- Sawyer H, Hsiao KCh (1992) Effects of autoclave induced carbohydrate hydrolysis on the growth of *Beta vulgaris* cells in suspension. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 31: 81-86.
- Scott P, Lyne RL (1994) The effect of different carbohydrate sources upon the initiation of embryogenesis from barley microspores. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 36:129-133.
- Stanisavljević I, Stojičević S, Veličković D et. al. (2009) Antioxidant and antimicrobial activities of *echinacea* (*Echinacea purpurea* L.) extracts obtained by classical and ultrasound extraction. *Chinese Journal of Chemical Engineering* 17(3): 478-483.
- Swamy MK, Sudipta KM, Balasubramanya S et. al. (2010) Effect of different carbon sources on *in vitro* morphogenetic response on Patchouli. *Journal of Phytology* 2(8): 11-17.
- Yaseen M, Ahmad T, Sablok G et. al. (2013) Review: role of carbon sources for *in vitro* plant growth and development. *Molecular Biology Reports* 40: 2837-2849.

11. Wpływ zasolenia na rozwój petunii ogrodowej (*Petunia* × *atkinsiana* D. don), traktowanej mutagenem chemicznym w warunkach *in vivo*

Influence of salinity on the development of petunia (*Petunia* × *atkinsiana* D. don), treated with chemical mutagen in *in vivo* conditions

Cecylia Kulik, Marzena Dymitrienko, Marcelina Krupa-Mańkiewicz

Katedra Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin, Wydział Kształtowania Środowiska i Rolnictwa, Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie
Opiekun naukowy: Marcelina Krupa-Mańkiewicz

Cecylia Kulik: cyl.usia@gmail.com

Słowa kluczowe: *Petunia* × *atkinsiana* D. don, NaCl, mutageneza, EMS

Streszczenie

Celem badań było określenie wpływu mutagenu chemicznego EMS na namnażanie i podwyższenie tolerancji na stres solny petunii ogrodowej 'Prism Ruby' w warunkach *in vivo*. Materiał badawczy stanowiły eksplantaty pędowe petunii otrzymane na drodze indukowanej mutagenezy chemicznej w kulturach *in vitro*. Następnie otrzymane warianty poddano selekcji w kierunku podwyższenia tolerancji na stres solny kulturach *in vitro*. Selekcję prowadzono na pożywkach MS z dodatkiem soli NaCl w różnych stężeniach (25 – 200 mM NaCl). Otrzymane eksplantaty pędowe petunii adaptowano następnie do warunków polowych w celu określenia ich tolerancji na stres solny w warunkach *in vivo*.

Abstract

The aim of the study was to determine the effect of chemical mutagen EMS on the propagation and increase of tolerance to salt stress of the petunia 'Prism Ruby' *in vivo*. The research material were shoot explants of petunia obtained by induced chemical mutagenesis in *in vitro* cultures. Subsequently, the variants obtained were selected for increasing the tolerance to salt stress *in vitro* cultures. The selection was carried out on MS media with the addition of NaCl salts at various concentrations (25 - 200 mM NaCl). The resulting petunia explants were then adapted to field conditions to determine their tolerance to salt stress *in vivo*.

1. Wstęp

Petunia (z łac. *Petunia juss.*) należy do rodziny *Solenacea*, obejmuje blisko 2500 gatunków, wśród których wyróżniane są między innymi pomidor, ziemniak, papryka, czy mandragora. Mieszkańce gatunkowe, jak i dziko rosnące pochodzą z Ameryki Południowej. Duża grupa roślin należących do tej rodziny zawiera alkaloidy o silnych właściwościach toksycznych, ale również wykorzystywanych w przemyśle farmaceutycznym. Etymologia łacińskiego słowa, od którego pochodzi nazwa rodziny nie jest do końca poznana. Istnieje prawdopodobieństwo, że źródłem może być kształt większości kwiatów, które mają symetrię promienistą, przypominającą słońce i jego promienie. Nazwa petunii wywodzi się od słowa „petuj” oznaczającego w języku tupi-guarani tytoń. Polska nazwa petunii, rzadko stosowana, to zawieratka (Narkiewicz 2007). *Petunia* × *atkinsiana* D. Don 'Prism Prism' określana jest jako jedna z wartościowszych odmian petunii ogrodowej. Roślina ta wyróżnia się pięknymi, okazałymi kwiatami, szeroką gamą kolorystyczną, a także dużą łatwością w uprawie. Petunię uprawia się powszechnie i wykorzystuje do dekoracji balkonów, pergoli czy werand (Gerats i Vandebussche 2005; Eich 2008).

Uzyskiwanie nowych odmian petunii możliwe jest między innymi dzięki zastosowaniu hodowli mutacyjnej. Pozwala ona otrzymywać kwiaty o różnych barwach, kształtach, pokrojach czy sile wzrostu. W hodowli roślin do indukowania mutacji wykorzystuje się czynniki chemiczne oraz fizyczne. W badaniach nad indukowaną mutagenezą najczęściej stosuje się siarczan etylowo-metylowy (EMS). Jest to mutagen, charakteryzujący się wysoką efektywnością wywoływania mutacji

genowych poprzez substancję nukleotydów, przy czym nie powodujący aberracji chromosomowych (Latado 2004).

Jednym z głównych czynników abiotycznych poważnie ograniczających produkcję roślinną na Świecie jest stres solny (Flowers 2004). Spowodowane jest to nasilającym się niedoborem wody słodkiej, stosowaniem słonej wody do zabiegów irygacyjnych, a także działalnością człowieka (Zhu 2001). Dlatego też, na szeroką skalę prowadzi się badania, mające na celu analizę odpowiedzi roślin na stres środowiskowy. Wygenerowanie tolerancji na zasolenie jest fundamentalną i kluczową kwestią pod kątem produktywności rolnictwa oraz zachowania równowagi w prawidłowym funkcjonowaniu ekosystemów. Wrażliwość na zasolenie jest silnie zróżnicowana i zależna głównie od gatunku oraz miejsca bytowania roślin (Munns 2002). Prawdziwe wyzwanie dla nauki stanowi zatem uzyskanie odmian odpornych na zasolenie dzięki transformacji na poziomie inżynierii genetycznej.

Celem badań było określenie wpływu indukowanej w kulturach *in vitro* zmienności mutacyjnej na tolerancję roślin petunii na stres solnych w warunkach *in vivo*.

2. Materiał i metody

Materiałem badawczym były eksplantaty pędowe petunii ogrodowej (*Petunia × atkinsina* D. Don.) 'Prism Ruby' wyselekcjonowane w kulturach *in vitro*.

Wyselekcjonowane eksplantaty pędowe petunii adaptowano do warunków polowych w celu określenia ich tolerancji na stres solny.

Eksplantaty petunii wysadzano do doniczek o średnicy 6 cm, uzupełnionych podłożem torfowym wapnowanym 8 g kredy i 5 g dolomitu na dm^3 torfu o pH 5.

Po 2 tygodniach zaadaptowane rośliny przeniesiono z pokoju wzrostowego do szklarni w hali wegetacyjnej Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie.

Przez cały okres wegetacji prowadzono obserwacje dotyczące wzrostu roślin oraz zapewniono im odpowiednią wilgotność podłoża. Ponadto 2 razy w tygodniu rośliny podlewano 100 ml roztworu NaCl w ilości 6 g dm^{-3} . Kontrolę w doświadczeniu stanowiły petunie podlewane wodą. Po zakończeniu okresu wegetacji dokonano pomiarów określając: wysokość roślin, długość korzeni, liczbę korzeni, liczbę zawiązanych pąków kwiatowych i kwiatów oraz liści.

W trakcie trwania doświadczenia prowadzono również obserwacje cech fenotypowych, dokumentując je fotograficznie. W liściach badanych roślin zmierzono zawartość chlorofilu za pomocą miernika chlorofilu SPAD-502 (Minolta), badając tym samym stan żywotności roślin i mierząc całkowitą zawartość chlorofilu na podstawie indeksu zieloności liścia.

Uzyskane wyniki badań opracowano statystycznie z wykorzystaniem analizy wariancji jednoczynnikowej. Istotność różnic oznaczono na poziomie $\alpha=0.05$.

3. Wyniki

Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono istotny wpływ soli NaCl na cechy morfologiczne wariantów petunii odmiany Prism Ruby.

Średnio najwyższą wysokością pędu (23 cm) charakteryzowały się petunie traktowane 0.5 mM roztworem EMS nie poddane działaniu soli NaCl (tab. 1). Natomiast warianty otrzymane na drodze indukowane mutagenyzy 0.5 mM EMS i podlewane roztworem soli nie podjęły wzrostu. Rośliny, które nie poddano mutacji chemicznej i nie podlewano roztworem soli (kontrola) wykształciły pędy o długości 6 cm.

Średnio najdłuższe korzenie (8.3 cm) obserwowano u wariantów petunii otrzymanych po mutacji 5.0 mM roztworem EMS rosnących na podłożu bez dodatku soli NaCl. Natomiast pozostałe warianty oraz rośliny kontrole wykształciły korzenie o podobnej długości (tab. 1).

Podlewanie roślin petunii 6 g dm^{-3} roztworem soli NaCl wpłynęło znacząco na wzrost liczby zawiązanych korzeni, które były na poziomie kontroli (8) i stanowiły jedną grupę jednorodną.

Na podstawie dokonanych pomiarów liczby międzywęźli nie stwierdzono wpływu zastosowanej soli na wartość tej cechy. Otrzymane wyniki badań były na poziomie kontroli. Wyjątek

stanowiły warianty otrzymane po traktowaniu 0.5 mM EMS, które nie podjęły wzrostu na podłożu selekcyjnym.

Tab. 1. Średnia wysokość pędów (cm), długość korzeni (cm), liczba korzeni, liczba międzywęźli i liczba liści u petunii 'Prism Ruby'.

CECHA	WARIANT				
	Stężenie EMS [mM]				KONTROLA
	0.5 K*	0.5 Z	5.0 K	5.0 Z	
Wysokość pędu [cm]	7.0c	0d	23.0a	13.1b	6.0c
Długość korzeni [cm]	5.65a	0b	8,3a	7.25a	7.6a
Liczba korzeni	3b	0b	5ab	9a	8a
Liczba międzywęźli	2a	0a	3a	4a	2a
Liczba liści	6b	0c	3b	23a	0c
Liczba pąków	0a	0a	0a	0a	0a

K* - kontrola

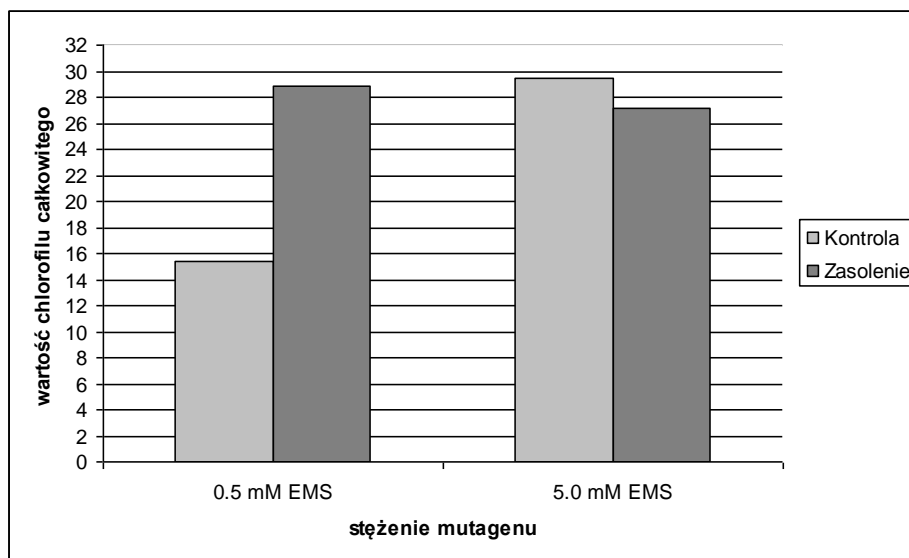
Z - zasolenie

W przypadku liczby liści, najwięcej (23) obserwowano ich u wariantów traktowanych 5.0 mM EMS, które rosły na podłożu z dodatkiem soli NaCl (tab.1., rys. 1.). Natomiast średnia liczba liści dla wariantów petunii mutowanych 0.5 mM roztworem EMS rosnących na podłożu kontrolnym wynosiła 6 na jednym eksplantacie.

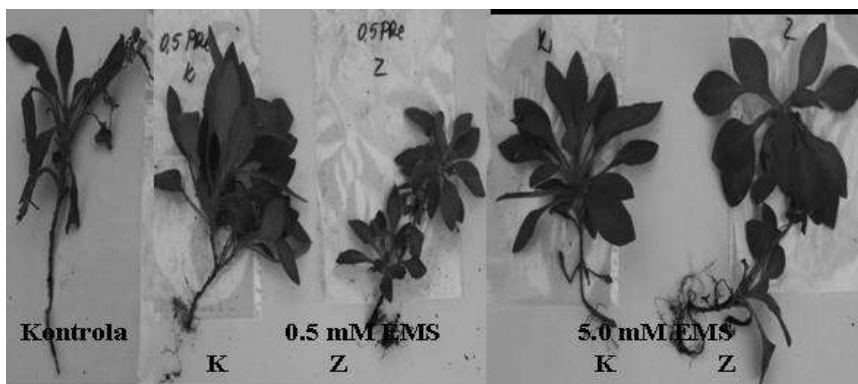
U wszystkich badanych wariantów oraz kontroli nie obserwowano zawiązanych pąków kwiatowych.

Po zakończeniu doświadczenia polowego (6 tygodni) wykonano pomiary zawartości chlorofilu a+b (indeks zazielenienia) w liściach badanych wariantów i kontroli petunii 'Prism Ruby'. Wyniki zostały przedstawione na wykresie 1 z podziałem na warianty rosnące na podłożu zasolonym (Z) i kontrolnym (K).

Warianty petunii Prism Ruby traktowanej 0.5 mM roztworem EMS rosnącej na podłożu zasolonym 6 g dm⁻³ NaCl zawartość chlorofilu a+b wynosiła 28.8 i była wyższa od niż dla wariantów rosnących na podłożu kontrolnym (Rys. 1).



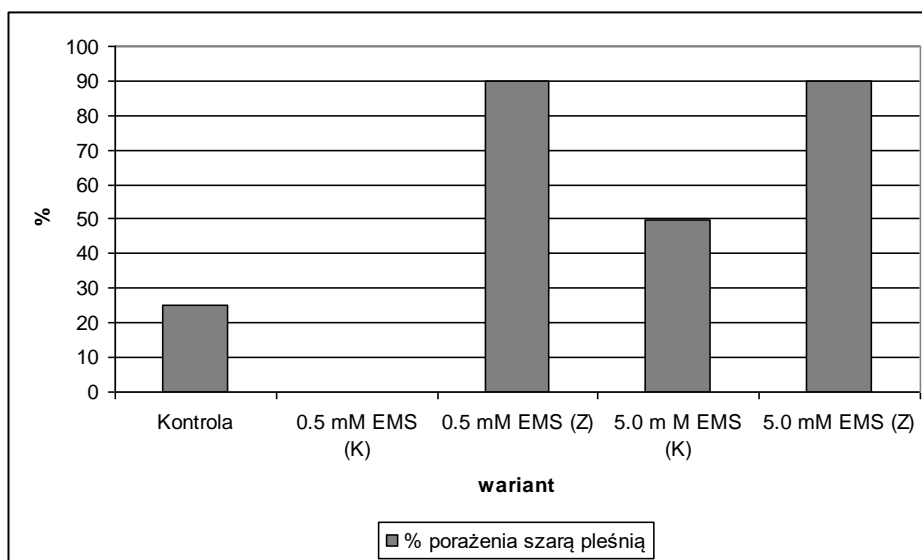
Rys. 1. Pomiar zawartości całkowitego chlorofilu wariantów rosnących na podłożu kontrolnym (K) i zasolonym (Z).



Rys. 2 Warianty petunii testowane na zasolenie w warunkach szklarniowych.

Warianty petunii traktowane 5.0 mM EMS rosnące na podłożu zasolonym $6 \text{ g}^{-3} \text{ NaCl}$ cechowała się niższym poziomem chlorofilu a+b równym 27.1. Poziom ten był niższy od zawartości chlorofilu dla wariantów rosnących na podłożu bez dodatku soli (wyk. 1).

W trakcie trwania doświadczenia, po adaptacji do warunków szklarniowych doszło do porażenia badanych wariantów przez szarą pleśń. Skala tego porażenia dochodziła do 90% (rys. 3.).



Rys. 3. Procent porażenia roślin petunii szarą pleśnią (K* - kontrola; Z- zasolenie).

Przy czym, zaobserwowano, że rośliny petunii rosnące na podłożu zasolonym wykazywały słabszy wzrost i większe porażenie szarą pleśnią (90%) w stosunku do pozostałych. Brak porażenia szarą pleśnią obserwowano jedynie u wariantów petunii otrzymanych w wyniku indukowania mutacji 0.5 mM EMS i rosnących na podłożu bez dodatku soli (rys. 3.).

4. Dyskusja

Petunia uznawana jest za modelowy materiał do badań, mających na celu poszerzenie zakresu jej zmienności genetycznej (Gerats i Vindenbussche 2005). Jest rośliną uprawianą, wyróżniająca się znacznymi walorami dekoracyjnymi oraz łatwością w hodowli. Prace badawcze z zakresu transformacji DNA (Hess 1969), rozwoju kwiatów (Levan 1937), a także regeneracji tkanek przeprowadzone na petunii, mają na celu poszerzenie zmienności i poszukiwanie coraz to nowszych,

interesujących form. Pierwsze genetyczne i biochemiczne doświadczenia, których obiektem była petunia przeprowadzono w 1950 roku.

Jedną z dróg pozwalających poszerzyć zakres zmienności jest indukowana mutageneza. Technika ta pozwala w krótkim czasie uzyskać zmienność genetyczną, wprowadzoną następnie do nowych wariantów roślin uprawnych i ozdobnych. W literaturze przedmiotu można spotkać wiele prac dotyczących regulowania częstotliwości i intensyfikacji mutacji poprzez optymalizację dawki mutagenu (Jander i in. 2003; Menda i in. 2004).

W pracy Jain i Spencer (2006) stosowanie chemicznych mutagenów do generowania zmienności genetycznej, realizowane jest najczęściej, gdy przedmiot badań stanowią rośliny ozdobne. W badaniach własnych warianty otrzymano poprzez indukowanie mutacji roztworem EMS w stężeniach 0.5 mM i 5.0 mM. Mutagen ten jest bardzo popularnie wykorzystywany w badaniach naukowych (Latado i in. 2004; Berenschot i in. 2008; Wetanabe i in. 2007).

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono ujemny wpływ zastosowanego mutagenu chemicznego na wysokość pędów petunii odmiany Prism Ruby. (Berenschot i in. 2008) stosując roztwór EMS również otrzymali rośliny petunii o krótszych pędach.

Podobne do badań własnych dawki mutagenu EMS zastosowano u petunii (Krupa-Mańkiewicz 2009). Z przeprowadzonych obserwacji wynikało, że częstotliwość zmian zależała od użytego mutagenu, jak i jego stężenia. W pokoleniu M1 największą częstotliwość zmian otrzymano stosując do indukowania mutacji EMS i MMS (siarczan metyloowo-metylowy) w stężeniach 1.5 mM i 2.0 mM, w pokoleniu M2-MMS o stężeniu 2.0 mM.

W badaniach (Krupa-Mańkiewicz 2007) inaczej, niż w badaniach własnych, użyty w doświadczeniu mutagen chemiczny, niezależnie od zastosowanej dawki wpłynął stymulująco na rozwój pędów, korzeni i liczby zawiązanych pąków. Natomiast w przypadku zawiązanych kwiatów, wyniki badań własnych potwierdzają opisany przez Krupę-Mańkiewicz (2007), hamujący wpływ EMS na rozwój tej cechy morfologicznej.

Analizując wyniki przeprowadzonych badań własnych, dotyczących liczby pąków kwiatowych zawiązanych przez rośliny petunii, na które działano EMS w dwóch stężeniach stwierdzono, że mutagen ten może działać hamująco na rozwój pąków kwiatowych. Ponadto, biorąc pod uwagę zastosowany czynnik zasolenia, przeprowadzono analizę odpowiedzi roślin petunii na stres, w celu określenia wpływu indukowanej zmienności mutacyjnej.

Van Zandt i Mopper (2002) w pracy opisującej opóźnienia kwitnienia *Iris hexagona* na skutek efektu zasolenia, stwierdzili silnie opóźniony rozwój pąków kwiatowych. Wysokie dawki soli NaCl jakimi były traktowane rośliny, spowolniły także szybkość otwierania się pąków kwiatowych.

Luan i in. (2006) badali wpływ mutacji indukowanej przez EMS na słodkie ziemniaki *Ipomea batatas* L. na podłożu wzbogaconym o różne stężenia soli NaCl. Określili przy tym, że stężenie soli NaCl równe 200 mM jest górną granicą selekcji, dawką letalną. Wyniki badań własnych wskazują na zamieranie roślin petunii przy stężeniu soli 200 mM, co zgodne jest z rezultatem doświadczeń (Luana i in. 2006).

Stres solny do badań nad nasionami pomidora *Solanum lycopersicum* wykorzystano w badaniach (Smolik i in. 2011), stosując stężenia 50, 75, 100 i 125 mM NaCl. Stwierdzono istotny wpływ stosowanego roztworu chlorku sodu na długość korzeni, przy czym stres solny wpłynął negatywnie na rozwój tej cechy. W przeprowadzonych badaniach własnych uzyskano podobne wyniki.

5. Wnioski

W warunkach polowych u wariantów petunii 'Prism Ruby' traktowanej EMS zastosowana dawka roztworu soli NaCl działała inhibująco na wysokość pędu, długość korzeni, liczbę korzeni i liczbę pąków. Przy czym sól NaCl miała pozytywny wpływ na liczbę liści petunii 'Prism Ruby' u wariantów traktowanych 5.0 mM roztworem mutagenu chemicznego EMS.

Rośliny traktowane mutagenem chemicznym rosnące na podłożu zasolonym charakteryzowały się niższą zawartością chlorofilu całkowitego, w porównaniu do roślin wzrastających na podłożu bez dodatku soli .

W doświadczeniu polowym zaobserwowano duży procent roślin petunii porażonych szarą pleśnią (90%). Zastosowanie roztworu soli w doświadczeniu polowym istotnie obniżyło odporność na stres biotyczny wywołany szarą pleśnią.

6. Literatura

- Berenschot AS, Zucchi MI, Tulmann-Netto A et. al. (2008) Mutagenesis in *Petunia hybrida* Vilm and isolation of novel morphological mutant. *Braz J Plant Physiol* 20:95-103.
- Eich E (2008) Solanaceae and convolvulaceae: Secondary metabolites: Biosynthesis, chemotaxonomy, biological and economic significance. Springer Journal.
- Flowers T (2004) Improving crop salt tolerance. *Jexp. Botan.* 55(396): 307-319.
- Gerats ., Vandenbussche M (2005) A model system for comparative research: *Petunia*. *Trends in plant science* 10. Elsevier 251-255.
- Jain S, Spencer MM (2006) Biotechnology and mutagenesis in improving ornamental plants. In: Teixeira da Silva, JA, Floriculture and Ornamental Viotechnology: Advances and Tropical Issues, Global Science Books 1749-2036.
- Jander G, Baerson SR, Hudak JA et. al. (2003) Ethyl methane sulfonate saturation mutagenesis in *Arabidopsis* to determine frequency of herbicide resistance. *Plant Physiol* 131: 138-146.
- Hess D (1969) Versuche zur Transformation an hohen Pflanzen. *Z. Pflanzenphysiol* 60: 348-358.
- Krupa-Małkiewicz M (2007) Zmiany fenotypowe i genotypowe u kalanchoe (*Kalanchoe hybrida*) i petunii (*Petunia × atkinsiana*) wywołane mutagenami chemicznymi. Praca doktorska. Akademia Rolnicza w Szczecinie.
- Latado RR, Adames AH, Nato AT (2004) *In vitro* mutation of chrysanthemum (*Dendranthem grandiflora* Tzvelv) with ethylmethanesulphonate (EMS) in immature floral pedicles. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 77: 103-106.
- Levan A (1937) Eine erbliche Anomalie der Samenanlage bei *Petunia* *Botaniska Notiser* 1: 35-55.
- Luan YS, Zhang J, An LJ (2006) Mutation induced by ethylmethanesulphonate (EMS), *in vitro* screening for salt tolerance and plant regeneration of sweet potato (*Ipomea batatas* L). *Plant Cell Tiss Organ Cult* 88:77-81.
- Menda N, Semel Y, Peled D, Eshed Y et. al. (2004) *In silico* screening of a saturated mutation library of tomato. *Plant J* 38:861-872.
- Munns R (2002) Comparative physiology of salt and water stress. *Plant Cell. Environ.* 25:239-250.
- Narkiewicz M (2007). Wszystko o petuniach. *kwietnik* 04.
- Smolik M, Kram P, Krupa-Małkiewicz M, Smolik B, Malinowska K (2011) Response of tomato genotypes to salinity stress as assessed at the seedlings stage. *EJPAU*. 14(4).
- Van Zadt P, Mopper S (2002) Delayed and carry effects of salinity on flowering in *Iris hexagona* (*Iridaceae*). *American Journal of Botany* 89:364-383.
- Watanabe S, Mizoguchi T, Aoki K et. al. (2007) Ethyl methane sulfonate (EMS) mutagenesis of *Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom for large-scale mutant screens. *Plant Biotech.* 24:33-38.
- Zhu JK (2001) Regulation of ion homeostasis under salt stress. *Current Opinion in Plant Biol.* 6:441-445.

12. Czynniki ograniczające plonowanie pszenicy ozimej

Factors limiting the yield of winter wheat

Monika Ogórkiewicz

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

Ogórkiewicz Monika: mogorkiewicz@iung.pulawy.pl

Słowa kluczowe: zachwaszczanie, choroby grzybowe, nawożenie, składniki pokarmowe gleby, termin siewu

Streszczenie

Pszenica ozima uważana jest za najważniejsze pod względem gospodarczym zboże w Polsce. Ma ona największe wymagania glebowe i płodozmienne. Na jej plonowanie wpływają czynniki siedliskowe i agrotechniczne. Czynniki decydującymi o małej wydajności pszenicy ozimej jest nieodpowiedni termin siewu, zachwaszczenie, choroby korzeni, podstawy źdźbła i liści oraz zmiany w zasobności gleby w składniki pokarmowe.

1. Wstęp

Pszenica (*Triticum aestivum*) jest jednym z najpopularniejszych zbóż uprawianym nie tylko w Polsce, ale również na całym świecie. Jest ona jedną z najstarszych roślin zbożowych uprawianych przez ludzi od 6 tysięcy lat (Ginter i Szarek 2010). Zboże to ma ogromne znaczenie dla gospodarki światowej jak i dla naszej krajowej, ponieważ jej najważniejszymi konsumentami są ludzie i zwierzęta. Głównym produktem powstającym z ziarna pszenicy jest mąka, która jest wykorzystywana do produkcji ciast, makaronów oraz pieczywa chlebowego. Ponadto ziarno pszenicy wykorzystywane jest na cele paszowe oraz na cele energetyczne (Krawczyk i Kowalski 2015).

Plonowanie pszenicy ozimej zależy przede wszystkim od genotypu czyli jej uwarunkowań genetycznych, warunków siedliskowych oraz zastosowanych zabiegów agrotechnicznych.

Niniejsza praca ma na celu przedstawienie wybranych czynników agrotechnicznych ograniczających plonowanie pszenicy ozimej. Do opracowania tego tematu została wykorzystana dostępna literatura naukowa.

2. Opis zagadnienia

W roku 2017 powierzchnia zasiewów pszenicy wynosiła 2,4 mln ha, a średnie plony z produkcji kształtowały się na poziomie $51,3 \text{ dt} \cdot \text{ha}^{-1}$ (GUS 2017). Poziom plonowania pszenicy ozimej jest wynikiem współdziałania ładu roślin ze środowiskowymi warunkami ich wzrostu oraz przebiegiem pogody. Każda odmiana charakteryzuje się genetycznie uwarunkowaną plennością oraz specyficznymi wymaganiami środowiskowymi. Wyniki doświadczeń, w których wyeliminowano konkurencję chwastów i wylegania oraz kontrolowano porażenie przez choroby i szkodniki wskazują na możliwość uzyskania plonu ziarna w granicach 13-15 t/ha. Również plon ziarna uzyskany z doświadczeń odmianowych COBORU przekracza często 10 t/ha. Dowodzi to, że genetyczne możliwości odmian uprawianych w kraju nie limitują poziomu plonów uzyskanych w Polsce (Podolska 2004).

Czynniki ograniczającymi plonowanie więc są niekorzystne warunki wzrostu i rozwoju roślin, w dużej mierze wywołane błędami agrotechnicznymi i niekorzystnym przebiegiem pogody oraz oddziaływaniem patogenów (Ruszkowski 1988). Nieprawidłowe plonowanie pszenicy przynosi niekorzystny efekt w postaci strat ekonomicznych dla rolnictwa krajowego (Ginter i Szarek 2010).

3. Przegląd literatury

3.1 Termin siewu

Jednym z najważniejszych czynników agrotechnicznych mającym bardzo ważny wpływ na plonowanie pszenicy ozimej jest termin siewu (Podolska 1997; Podolska i Wyzińska 2011; Dubis i

Budzyński 2006, Weber i Podolska 2008; Jończyk 1997; Podolska i Wyzińska 2011; Ruszkowski i in. 1991). Termin siewu to czynnik wpływający bezpośrednio na wzrost i rozwój rośliny, a zatem warunkuje budowę i płodność rośliny i łanu. Wraz z opóźnieniem terminu siewu zmniejsza się średnia wysokość roślin oraz udział w łanie roślin wysokich, które charakteryzują się większą produktywnością. Maleje również udział roślin rozkrzewionych na korzyść jednopędowych. Zmiany te prowadzą do uzyskania mniejszego plonu ziarna z jednostki powierzchni (Podolska 2004). Najwyższe plony ziarna pszenica uzyskuje wysiana w optymalnym terminie siewu (Tab.1). Jak podaje Podolska i Wyzińska (2011) redukcja plonu ziarna w wyniku dwutygodniowego opóźnienia siewu wynosiła 16 %, natomiast siew opóźniony o 4 tygodnie powodował obniżkę plonu o 30%. Wielkość tej obniżki zależała od warunków pogody w okresie wegetacji i związana była głównie z redukcją kłosów z jednostki powierzchni, plonu ziarna z rośliny i kłosa.

Tab. 1. Plon ziarna i cechy struktury plonu pszenicy ozimej w zależności od terminu siewu (Podolska 2004).

Plon i cechy struktury plonu	Termin siewu			
	optymalny	opóźniony	późny	NIR
Plon w kg/m ²	0,81	0,74	0,65	0,028
Liczba kłosów na m ²	552	508	478	14,8
Liczba ziaren z kłosa	30,6	30,06	29,2	1,10
Plon ziarna z kłosa (g)	1,47	1,44	1,35	0,051
MTZ (g)	48,0	47,2	45,6	0,60

3.2 Zachwaszczenie

Pszenica ozima jest gatunkiem wrażliwym na zachodzący proces zachwaszczenia, ponieważ wykazuje dużą podatność na rosnące chwasty jednoliścienne i dwuliścienne. Najbardziej szkodliwym chwastem jednoliściennym dla pszenicy ozimej jest *Apera spica venti*- miotła zbożowa, natomiast chwastem dwuliściennym *Galium aparine* – przytulia czepna, *Cenataurea cyanus* – chaber bławatek oraz *Crisum arvense* – ostrożeń polny (Stępień 2004).

Chwasty są silnymi konkurentami roślin o wodę, światło i składniki pokarmowe. Finalnym skutkiem konkurencji są straty w plonach roślin uprawnych. Wielkość tych strat zależy od stopnia zachwaszczenia łanu.

Na poziom zachwaszczenia łąnów pszenicy duży wpływ ma przedplon, sposób uprawy roli, system produkcji, uprawa międzyplonów ścierniskowych oraz nawożenie azotem (Faltyn i Kordas 2009).

Udział zbóż w strukturze zasiewów w Polsce jest wysoki, co sprzyja ich zachwaszczeniu i kompensacji chwastów. Spośród zbóż pszenica ozima, a szczególnie jej krótkosłome odmiany, należą do roślin najpodatniejszych na zachwaszczenie (Boróweczak i in. 2012). Poprawnie ułożony płodozmian, który umożliwia następującym po sobie roślinom uprawnym prawidłowy wzrost i rozwój, może ograniczyć występowanie różnych grup biologicznych chwastów (Sekutowski i Smagacz 2011).

Jednym z najważniejszych czynników agrotechnicznych wpływających na zachwaszczenie pszenicy jest sposób uprawy roli. Uprawa płużna nadal jest jeszcze ciągle najczęściej stosowanym sposobem uprawy roli, której ważnym zadaniem jest ograniczenie chwastów. Natomiast w systemach bezorkowych jest ono utrudnione. Wielu autorów prezentuje pogląd, że uproszczenia w uprawie roli prowadzą do wzrostu zachwaszczenia, zwłaszcza w pierwszych latach ich stosowania (Blecharczyk i in. 2007, Weber i Hryńczuk 2005). W uproszczonym systemie roli odmiany pszenicy powinny być dostosowane konkurencyjnie w stosunku do chwastów. Odmiany te powinny się charakteryzować przyspieszonymi wschodami oraz dużą zdolnością kiełkowania (Weber 2009). Małecka-Jankowiak

i in. (2015) stwierdzili, że uproszczenia w uprawie roli połączone z upraw w monokulturze powodują wzrost zachwaszczenia pszenicy (Tab. 2).

Tab. 2. Wpływ następstwa i uprawy roli na liczbę chwastów w łanie pszenicy ozimej (szt. · m⁻¹) (Małecka – Jankowiak i in. 2015).

Następstwo (A)	Uprawa roli (B)	Lata			Średnio
		2005	2006	2007	
Monokultura	SB*	443	163	210	272
	TR	143	39	73	85
Średnio		293	101	141	178
Pszenica po jęczmieniu jarym	SB*	57	55	103	71
	TR	56	65	15	45
Średnio		56	60	59	58
Pszenica po grochu	SB*	191	88	190	156
	TR	68	69	58	65
Średnio		129	79	124	111
Średnio uprawa roli	SB*	231	102	167	167
	TR	89	58	49	65
NIR _{0,05}					
A		58	17	29	16
B		34	14	24	13
AxB		59	25	r.n.	23

* SB – siew bezpośredni, TR – tradycyjna uprawa roli
r.n. – różnica nieistotna

3.3 Choroby powodujące porażenie podstawy źdźbła, liści i kłosa

Choroby grzybowe atakujące pszenicę ozimą są jednymi z najistotniejszych czynników ograniczających jej plonowanie (Kurowski i in. 2009). Pszenica podobnie jak inne rośliny zbożowe jest podatna na wiele chorób, które skutecznie przyczyniają się do zminimalizowania jej plonowania jak i do pogorszenia jakości. Straty powodowane przez patogeny są znaczne i mogą wynosić od 10 do 50%, a w latach epidemii nawet więcej (Jaczevska-Kalicka 2000, 2002). Największe straty w plonie powodują choroby występujące na liściach. Straty są tym większe, im wcześniej dochodzi do porażenia i większy jest procent objawów chorobowych na blaszkach liściowych. Dlatego tak ważne jest utrzymanie zielonej powierzchni górnych liści pszenicy ozimej, co jest ważnym elementem plonotwórczym. Skuteczna ochrona liścia flagowego przynosi wzrost plonowania pszenicy ozimej (Wyczling i in. 2005).

Główną przyczyną porażenia pszenicy przez choroby grzybowe jest duża koncentracja zbóż w strukturze zasiewów. Często pszenica uprawiana jest po sobie lub innych roślinach kłosowych. Skutkiem tego typu uprawy pszenicy jest zły stan fitosanitarny roślin, pogorszenie się jakości samej gleby co w konsekwencji wpływa na pojawienie się niepożądanych mikroorganizmów chorobotwórczych (Sekutowski i Domaradzki 2009). Duży udział zbóż w płodozmianie przyczynia się do większego porażenia roślin pszenicy przez grzyby wywołujące choroby podsuszkowe (fuzaryjna zgorzel podstawy źdźbła i korzeni zbóż – *Pseudocerosporella herpotrichoides* *Fusarium spp.*, łamliwość źdźbła zbóż i traw – *Oculimacula spp.*, zgorzel podstawy źdźbła – *Gaeumannomyces graminis*) (Horoszkiewicz-Janka i in., 2012; Smagacz 2011; Smagacz i Pecio 2010; Kuś i in. 2007, Weber i in. 2005, 2003). Badania Sułek i in. (2016) wskazują, że uprawa pszenicy w monokulturze zbożowej wpłynęła na większe porażenie dolnych międzywęzli pszenicy przez zespół grzybów atakujących podstawę źdźbła. W mniejszym nasileniu zespół chorób podstawy źdźbła występował w uprawie pszenicy ozimej po bobiku i rzepaku (Tab. 4).

Na porażenie roślin pszenicy ozimej duży wpływ wywiera sposób uprawy roli. W uproszczonej uprawie roli, zwłaszcza w siewach bezpośrednich, pozostające na powierzchni pola

resztki roślinne oraz większa wilgotność gleby, przy jednocześnie niższej temperaturze sprzyjają występowaniu chorób podstawy źdźbła i korzeni (Sułek i in. 2016). Małecka i in. (2014) stwierdzili, że pszenica ozima w uproszczonej uprawie roli i siewie bezpośrednim narażona jest w większym stopniu na choroby podsuszkowe niż w tradycyjnej (płużnej) uprawie roli. Odmienne wyniki uzyskał Smagacz (2008) stwierdzając, że porażenie roślin przez patogeny podstawy źdźbła było mniejsze w obiektach z uproszczeniami w uprawie roli w porównaniu z obiektem kontrolnym – pszenica uprawiana systemem płużnym. Krupinsky in. (2002) tłumaczy to tym, że system siewu bezpośredniego sprzyja akumulacji substancji organicznej w wierzchniej warstwie gleby, zwiększając aktywność biologiczną gleby, co może ograniczyć populacje patogenów w glebie.

Tab. 3. Plon pszenicy ozimej w latach 2002-2004 [dt•ha⁻¹] (Wyczling i in. 2005).

Wyszczególnienie	Lata			
	2002	2003	2004	2002-2004
Kontrola – bez stosowania fungicydów	79,4	88,8	91,0	86,4
I*	90,0	107,1	111,0	
II**	97,0	111,0	118,0	108,9
NIR _{0,05}	3,34	4,26	3,79	1,76

*I - 1x krezoksym metylowy+ epoksykonazol and 1x tridemorf+epoksykonazol

**II - 1x krezoksym metylowy+ epoksykonazol and 1x dimoksytrobina+epoksykonazol

Tab. 4. Indeks porażenia [%] dolnych międzywęźli pszenicy ozimej przez kompleks chorób podstawy źdźbła (Sułek i in. 2016).

Udział zbóż w plodozmianie	2013/2014		
	Triticum aestivum ssp.vulgare	Triticum ssp.spelta	średnio
50	12,5	10,7	11,6
75	19,3	12,9	16,1
100	22,8	16,0	19,4
średnio	18,2	13,2	15,7
NIR _{0,005} ; HSD _{0,05} dla:	I-6,21; II- 1,83;		

I-udział zbóż w plodozmianie; II-podgatunek pszenicy; r.n.-różnice nieistotne

3.4 Zmiany zasobności gleby w składniki pokarmowe

Obecnie rośliny zbożowe posiadają o wiele większy potencjał plonotwórczy niż kiedyś. Wynika to z faktu, że w ostatnich latach nastąpił przełom technologiczny w agrotechnice. Coraz lepsze rezultaty przynosi zrównoważona metoda nawożenia, która daje wysokie plony dobrej jakości. Według dzisiejszych standardów nawożenie makroelementami i mikroelementami powinno być zrównoważone oraz zbilansowane zgodnie z potrzebami pokarmowymi rośliny zbożowej (Kocoń 2009).

Uboższe zapotrzebowanie pokarmowe zbóż prowadzi do zaburzenia podstawowych procesów fizjologicznych zachodzących w roślinie. Upośledzony proces fotosyntezy powoduje zahamowanie wzrostu i rozwoju pszenicy, co potem objawia się spadkiem ilości uzyskanych plonów. Jednym z czynników ograniczających plonowanie pszenicy ozimej jest odczyn gleby. Dolne optimum pH dla pszenicy ozimej powinno wynosić 6,0 na glebie lekkiej i 6,5 na glebie ciężkiej. Pszenica ma silny próg wrażliwości i dlatego przy niskim pH wskazującym na zakwaszenie gleby przestaje plonować. W przypadku niskiego odczynu glebowego przeprowadza się zabieg wapnowania (Kocoń 2005).

Zakwaszenie gleby na wskutek kwaśnego pH powoduje, że składniki pokarmowe tj.: azot czy fosfor, są gorzej przyswajalne i jest utrudnione ich pobieranie. Taki stan rzeczy skutkuje spadkiem plonowania. Pszenica jest średnio wrażliwa na niedobory potasu czy fosforu. Makroelementy te są istotne dla rośliny we wczesnym etapie rozwoju, ponieważ ich niedobory przy zbyt intensywnym

nawożeniu azotem mogą powodować spadek plonów. Innymi niezbędnymi makroelementami jest siarka i magnez, które biorą udział m.in. w fotosyntezie czy przemianie lipidów, białek i cukrów. Niedobór magnezu przy nadmiernym pobieraniu potasu może powodować zaburzenia w równowadze jonowej, co potem skutkuje zmiany w składzie chemicznym samych ziaren i wielkości plonów. Natomiast siarka należy do pierwiastków, na który pszenica nie wykazuje dużego zapotrzebowania, niemniej jednak, jej niedobór przy wysokim poziomie azotu w roślinie zbożowej, prowadzi do nierównomiernej destabilizacji poziomu tych jonów. Takie zakłócenie jonowe przyczynia się do słabszego wykorzystania azotu przez rośliny pszenicy, spadku plonu czy obniżenia zawartości białka (Kocoń 2005).

Nawozy mineralne są szeroko stosowane w uprawie roślin zbożowych. Bardzo ważnym pierwiastkiem, który w największym stopniu decyduje o plonowaniu zbóż jest azot. W uprawie pszenicy dobieranie odpowiednich dawek azotu i sposoby ich stosowania, są jest bardzo istotne, gdyż mają zapewnić optymalnie najwyższe plony (Buczek i in. 2008). Nawożenie azotem powinna być dostosowana do zapotrzebowania rośliny zbożowej w poszczególnych jej fazach wzrostu i rozwoju (Zagórda 2007). Prowadzone badania nad plonowaniem pszenicy w różnych warunkach siedliskowych wykazały, że optymalna dawka nawożenia azotem powinna wynosić od 50 do 160 kg N· ha⁻¹ (Kołodziejczyk i Szmigiel 2014). Niedobór azotu powoduje zahamowanie wzrostu i rozwoju, a w konsekwencji obniża właściwości plonotwórcze tego zboża. Nadmiar dawek azotu przyczynia się do zbyt intensywnego wzrostu pszenicy, zwiększa wyleganie oraz może wpłynąć na porażenie przez niektóre choroby (Kołodziejczyk i Szmigiel 2014).

4. Podsumowanie

Pszenica jest cennym surowcem dla gospodarki rolniczej zarówno krajowej jak i światowej. Spadek plonowania pszenicy poprzez czynniki ograniczające plon, jest bardzo niekorzystny, ponieważ przynosi duże straty finansowe dla rolnictwa. Czynnikiem ograniczającym plonowanie pszenicy ozimej jest uprawa jej po roślinach kłosowych co związane jest dużą presją chorób i chwastów. Do spadku plonowania pszenicy w dużej mierze przyczyniają się patogeny grzybowe wywołujące choroby podstawy źdźbła, liści i kłosa. Ważnym czynnikiem, który ogranicza plonowanie pszenicy ozimej jest kwaśny odczyn gleby, który ogranicza przyswajalność składników pokarmowych..

5. Literatura

- Buczek J, Kryńska B, Tobiasz-Salach R (2008) Reakcja pszenicy ozimej na doglebowe i dolistne stosowanie azotu. VOL.LXIII (4): 48-57.
- Borówczak F, Rębacz K, Grześ S (2012) Zachwaszczenie pszenicy ozimej w zależności od deszczowania, technologii uprawy i nawożenia azotem w czwartej rotacji czteropolowego płodozmianu. Journal of Research and Applications in Agricultural Engineering, Vol 57(3): 22-25.
- Czaban J, Wróblewska B, Sułek A, Podolska G (2011) Wpływ intensywności technologii produkcji pszenicy ozimej na zasiedlenie jej ziarna przez grzyby z rodzaju Fusarium. Polish Journal of Agronomy, 5: 11-20.
- Dubis B, Budzyński W (2006) Reakcja pszenicy ozimej na termin i gęstość siewu. Acta Sci. Pol. Agricultura 5(2): 15-24.
- Faltyn U, Kordas L (2009) Wpływ uprawy roli i czynników regenerujących stanowisko na zachwaszczenie pszenicy jarej. Fragn. Agron., 26(1): 19-24.
- Frać M, Lipiec J, Rutkowska A, Oszust K, Półtorak M (2011) Właściwości mikrobiologiczne gleby pod uprawą pszenicy ozimej w systemach ekologicznym i konwencjonalnym. Acta Agrophysica, 18(2): 245-254.
- Grabiński J, Jaśkiewicz B, Podolska G, Sułek A (2007) Terminy siewu w uprawie zbóż. Studia i raporty IUNG-PIB, Wybrane elementy technologii produkcji roślinnej, Zeszyt 9: 37-45.
- Jaczevska-Kalicka A (2000) Zmienność strat plonu pszenicy ozimej powodowanych przez choroby grzybowe w latach 1996-1999. Prog. Plant Prot., 40: 623-625.

- Jaczevska-Kalicka A (2002) Grzyby patogeniczne dominujące w uprawie pszenicy ozimej w latach 1991-2001. *Acta Agrobot.*, 55 (1): 89-96.
- Jończyk K (1997) Plonowanie pszenicy ozimej w zależności od wybranych elementów agrotechniki. *Biuletyn Hodowli i Aklimatyzacji Roślin*, Nr 204: 173-180.
- Kiecana I, Mielniczuk E, Cegiełko M (2006) Badania podatności kłosów pszenicy ozimej (*Triticum aestivum* L.) na porażenie przez *Fusarium avenaceum* (FR.) Sacc., *Acta Agrophysica* 8(3): 629-636.
- Kocoń A (2009) Efektywność dolistnego dokarmiania pszenicy i rzepaku ozimego wybranymi nawozami w warunkach optymalnego nawożenia i wilgotności gleby. *VOL.LXIV(2)*: 23-28.
- Kocoń A (2005) Nawożenie jakościowe pszenicy jarej i ozimej a plon i jakość ziarna. *Pamiętnik Puławski, Zeszyt 139*: 55-64.
- Kołodziejczyk M, Szmigiel A (2014) Wpływ intensywności technologii uprawy na plonowanie wybranych odmian pszenicy jarej. *Fragm. Agron.*, 31(3): 75-84.
- Krawczyk A, Kowalski Ł (2015) Prawidłowa agrotechnika pszenicy ozimej. *Opolski Ośrodek Doradztwa Rolniczego w Łosiuwie* : 1-31.
- Krupinsky J M , Bailey K L, McMullen M P, Gossen B D, Turkington T.K. (2002) Managing plant disease risk in diversified cropping systems. *Agron. J.* 94: 198-209.
- Kurowski T, Marks M, Makowski P, Jaźwińska E (2009) Zdrowotność pszenicy ozimej w stanowiskach po różnych sposobach dwuletniego ugorowania. *Fragm. Agron.*, 26(3): 12-108.
- Kuś J, Jończyk K, Kawalec A (2007) Czynniki ograniczające plonowanie pszenicy ozimej w różnych systemach gospodarowania. *Acta Agrophysica*, 10(2): 407-417.
- Lenc L, Kuś J, Sadowski Cz (2011) Fuzarioza kłosów i ziarna pszenicy ozimej (*Fusarium* spp.) w różnych systemach uprawy. *Journal of Research Applications in Agricultural Engineering*, 56(4): 32-36.
- Małecka I, Blecharczyk A, Sawinska Z, Piechota T, Waniorek B (2012) Plonowanie zbóż w zależności od sposobów uprawy roli. *Fragm. Agron.*, 29(1): 114-123.
- Małecka-Jankowiak I, Blecharczyk A, Sawinska Z, Piechota T, Waniorek B. (2015) Wpływ następstwa roślin i systemu uprawy roli na zachwaszczenie pszenicy ozimej. *Fragm. Agron.*, 32(3): 54-53.
- Martyniuk S, Księżniak A, Jończyk K, Kuś J (2007) Microbiological characteristic of soil under winter wheat cultivated in ecological and conventional systems. *Journal of Research Applications in Agricultural Engineering*, Vol. 52(3): 113-116.
- Matuszak R, Włodarczyk M, Brzóstowicz A, Wybieralski J. (2007) Wpływ NaCl na zawartość mikroelementów w liściach i korzeniach pszenicy ozimej odmiany Almari, *Acta Agrophysica*. 10(2): 419-424.
- Mazurkiewicz J, Solarska E, Kuzdrałiński A, Muszyńska M (2008) The occurrence of fusarium toxins in winter wheat depending on fertilization. *Journal of Research and Applications in Agricultural Engineering*, Vol 53(4): 15-17.
- Podolska G (2004) Efektywność agrotechnicznych oddziaływań w wykorzystaniu potencjału plonowania pszenicy ozimej. *Biuletyn Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin*, Nr 231: 55-64.
- Podolska G, Wyzińska M (2011) Reakcja nowych odmian pszenicy ozimej na gęstość i termin siewu. *Polish Journal of Agronomy*, No.6: 44-51.
- Ruszkowski M, Jaworska K, Podolska G (1991) Struktura plonu rodów pszenicy ozimej w zależności od terminu siewu. *Biuletyn Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin*, Nr 177: 109-114.
- Ruszkowski M (1988) Obsada a produktywność roślin zbożowych. *Konferencja Naukowa IUNG–PAN, Puławy*: 7-25.
- Smagacz J (2008) Wpływ uproszczeń w uprawie roli na występowanie chorób podstawy źdźbła, zachwaszczenie ładu i plonowanie pszenicy ozimej. *Progress in plant protection*, 48(4): 1475-1478..
- Sadowski Cz, Lenc L, Kuś J (2010) Fuzarioza kłosów i grzyby z rodzaju *Fusarium* zasiedlające ziarno pszenicy ozimej, mieszaniny odmian i pszenicy orkisz uprawianych w systemie ekologicznym. *Journal of Research and Applications in Agricultural Engineering*, 55(4): 79-83.

- Sekutowski T, Domaradzki K (2009) Bioróżnorodność gatunkowa chwastów w monokulturze pszenicy ozimej w warunkach stosowania uproszczeń w uprawie roli. *Fragm. Agron.*, 26(4): 160-169.
- Sekutowski T, Smagacz J (2011) Similarity between soil seed bank and current weed infestation in winter wheat cultivation. *Journal of Research and Applications in Agricultural Engineering*, Vol 56(4): 93-98.
- Stępień A (2004) Wpływ sposobów nawożenia na zachwaszczenie i plonowanie pszenicy jarej. *Acta. Sci. Pol., Agricultura* 3(1): 45-54.
- Sulek A, Podolska G, Jaśkiewicz B (2016) Plonowanie i zdrowotność dwóch podgatunków pszenicy w zależności od udziału zbóż w strukturze zasiewów w warunkach integrowanej produkcji. *pol. J. Agron.*, 27: 118-125.
- Weber R (2009) Wpływ systemów uprawy roli, gęstości i terminu siewu na zmienność plonowania odmian pszenicy ozimej. *Agric. Aliment.*, 269 (9): 79-88.
- Weber R, Podolska G (2008) Wpływ sposobu uprawy roli, terminu i gęstości siewu na plonowanie odmian pszenicy ozimej. *Inżynieria Rolnicza* 1(99): 395-400.
- Wesołowski M, Cierpiała R (2010) Plonowanie i zachwaszczenie pszenicy ozimej w zależności dawek herbicydu Huzar 05 WG. *Acta Agrophysica*, 15(2): 429-439.
- Woźniak A (2006) Wpływ przedplonów na plon i jakość ziarna pszenicy ozimej. *Acta Sci. Pol., Agricultura* 5(2): 99-106.
- Zagórda M, Walczyk M, Kulig B (2007) Precyzyjne nawożenie azotem pszenicy ozimej na podstawie pomiarów Spad. *Inżynieria Rolnicza*, 7(95): 249-256.
- Zboroszczyk U, Kordas L (2012) The influence of Effective Microorganisms EM application on health statuses of spring wheat growing in short-term monoculture. *Progress in plant protection*, 52(2): 327-331.

13. Optymalizacja warunków oznaczania stężenia trichotecenów grupy A i B w ziarnie pszenicy

Optimization of the conditions for determining trichothecenes concentration of groups A and B in wheat grain

Anna Przybylska-Balcerek, Kinga Stuper-Szablewska

Katedra Chemii, Wydział Technologii Drewna, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Opiekun naukowy: Kinga Stuper-Szablewska

Przybylska-Balcerek Anna: ania_przybylska18@wp.pl

Słowa kluczowe: mikotoksyny, trichoteceny, ziarno pszenicy

Streszczenie

Pośród zbóż drobnozarnistych uprawianych w Polsce ziarno pszenicy narażone jest na zanieczyszczenia mikrobiologiczne. Najczęściej do porażenia przez grzyby mikroskopowe z rodziny *Fusarium* spp. dochodzi na polu podczas wegetacji. Z obecnością patogenicznych szczepów grzybów mikroskopowych, wiąże się obecność mikotoksyn (trichoteceny grupy: A (T-2 toksyna, HT-2 toksyna, STO, DAS, NEO) i B (DON, 3-AcDON, 15-AcDON, Fus-X, NIV)). Wykazują one toksyczne działanie w stosunku do ludzi i zwierząt.

Celem badań było zoptymalizowanie warunków identyfikacji trichotecenów z grupy A i B z naturalnie porażonego ziarna pszenicy uprawianej w Wielkopolsce.

Materiał badany stanowiło ziarno pszenicy pochodzące z 31 powiatów zlokalizowanych w Wielkopolsce.

Po przygotowaniu rozdrobnionych naważek ziarna, zalano je mieszaniną ekstrakcyjną acetonitryl – woda (82:18 (v/v)) i pozostawiono w ciemni na 24h. Następnie próby sączone pod próżnią. Uzyskany supernant z pierwszych 31 prób odparowywano na wyparce, a następnie w strumieniu azotu. Kolejnych 31 przesączonych ekstraktów dodatkowo poddano oczyszczaniu metodą ekstrakcji do fazy stałej przy użyciu kolumnienek. Rozdział chromatograficzny oraz analizę trichotecenów grup A i B prowadzono za pomocą UPLC-PDA.

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że metoda oczyszczania ekstraktów za pomocą ekstrakcji do fazy stałej jest wydajniejsza i dokładniejsza, a chromatogram przedstawiał tylko badane mikotoksyny, co ułatwiło identyfikację.

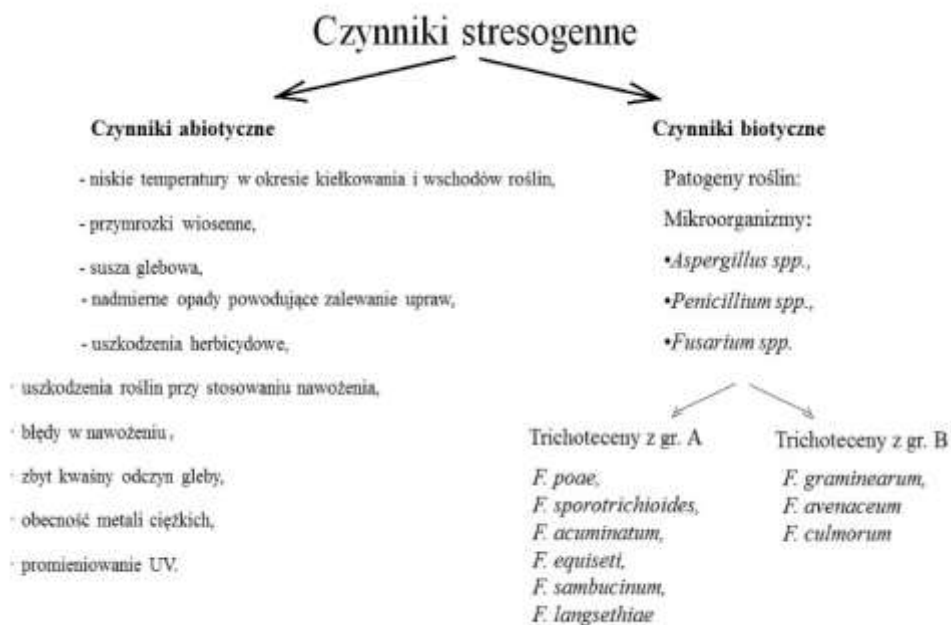
1. Wstęp

Pszenica jest jednym z najczęściej uprawianych zbóż w Polsce. Obszar uprawy pszenicy szacuje się na około 2,4 mln ha. Podczas wegetacji pszenica narażona jest na działanie abiotycznych i biotycznych czynników stresogennych. Wśród których istotną rolę w patogenezie pszenicy w klimacie umiarkowanym odgrywają grzyby mikroskopowe z rodzaju *Fusarium* spp, *Aspergillus* spp. i *Penicillium* spp. (Rys.1).

Ziarno pochodzące z porażonych patogenem kłosów jest mniejsze, pomarszczone i zabarwione na różowo. Efektem zanieczyszczenia ziarna grzybami mikroskopowymi i ich metabolizmu jest obniżenie zarówno jakości jak i ilości plonu oraz materiału siewnego, w efekcie czego następują straty ekonomiczne. Porażające kłos grzyby mikroskopowe produkują do podłoża toksyczne drugorzędowe metabolity nazywane mikotoksynami. Dzieje się to przede wszystkim w warunkach zaburzenia prawidłowej mikroflory oraz stresu środowiskowego, kiedy następują zmiany temperatury, wilgotności, dostępności tlenu lub w przypadku działania substancji agresywnych w stosunku do grzybów - fungicydów.

Pośród szerokiej gamy mikotoksyn występujących w ziarnie pszenicy i produktach pszennych często wykrywane są trichoteceny z grupy A i B (Przybylska i in. 2018 a; Przybylska i in. 2018 b). W celu ograniczenia wytwarzania mikotoksyn w kłosie pszenicy bardzo ważne są odpowiednie praktyki agrotechniczne. Polegają one przede wszystkim na zapobieganiu rozwoju

grzybów mikroskopowych i tym samym ograniczeniu stresu biotycznego na jaki są narażone rośliny podczas wzrostu.



Rys.1. Czynniki stresogenne (Marasas i in. 1984; Perkowski 1993; Chełkowski 2013; Przybylska 2018).

Pomimo zastosowania na każdym etapie przerobu ziarna działań prewencyjnych mających ograniczyć stężenie mikotoksyn w produkcie finalnym nie zawsze udaje się w pełni usunąć związki toksyczne z surowca co przyczynia się do zanieczyszczenia produktu. Trichoteceny dostarczone są do organizmu głównie drogą pokarmową i kumulowane są w tkankach. Są one przyczyną zatruc objawiających się m.in.: uszkodzeniem skóry i błon śluzowych, zaburzeniami płodności, zakłóceniem prawidłowego działania układu immunologicznego, w wyniku czego dochodzi do szybszego rozwoju zakażeń oraz cięższych zatruc pokarmowych.

W celu ochrony zdrowia konsumentów należy ograniczyć spożywanie produktów zawierających zanieczyszczenia w ilościach przekraczających najwyższe dopuszczalne poziomy. Komisja Europejska wydała rozporządzenie Komisji (UE) nr 2013/165/UE z 27 marca 2013 roku w sprawie obecności toksyn T-2 i HT-2 w zbożach i produktach zbożowych mówiące, że nie należy spożywać produktów zawierających trichoteceny A. A także Komisja Wspólnot Europejskich (WE) wydała rozporządzenie Komisji nr 1881/2006 z dnia 19 grudnia 2006 roku ustalające najwyższe dopuszczalne poziomy wybranych mikotoksyn w surowcach i produktach spożywczych (Tab.1).

Mikotoksyny z rodzaju trichotecenów są to wtórne produkty przemiany materii grzybów z rodzaju *Fusarium spp.*. Z chemicznego punktu widzenia toksyny te mają charakter epoksydu seskwiterpenowego przybierającego postać szkieletu 12, 13-epoksy- Δ^9 -trichotecenowego z podwójnym wiązaniem między 9 i 10 węglem. Z uwagi na różne rodzaje podstawników łańcucha podstawowego trichoteceny dzieli się na cztery grupy: A, B, C i D. Spośród których najbardziej toksyczne są metabolity grupy A (T-2 toksyna, HT-2 toksyna, DAS, NEO i inne pochodne) zawierające łańcuch boczny przy węglu C5 (Przybylska i in 2018 a). Mniej toksyczne trichoteceny z grupy B w miejscu podstawnika 5 mają tlen. Należą tu związki o charakterze polarnym (NIV, FUS-X, DON) (Przybylska i in. 2018 b). Rzadziej identyfikowane w ziarnie pszenicy są trichoteceny grupy C (związki zawierające oprócz szkieletu trichotecenowego dodatkowo pierścień aromatyczny) oraz D (trichoteceny dwuepoksydowe) (Tab.2) (Carveo i in. 2007).

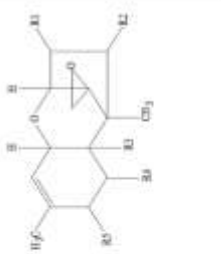
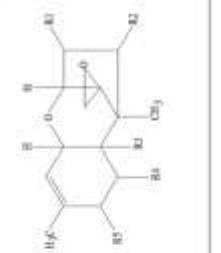
Oznaczanie poziomu zanieczyszczenia mikotoksynami ziarna pszenicy jest bardzo ważne w kontekście zapewnienia bezpieczeństwa produktów zbożowych. Analiza ta jest bardzo czasochłonna

i kosztochłonna. Czynnikiem determinującym głównie kosztochłonność tych badań jest zastosowanie kolumnienek powinowactwa.

Tab.1. Najwyższe dopuszczalne poziomy DON w produktach przeznaczonych do bezpośredniej konsumpcji .

Środek spożywczy	DON [$\mu\text{g kg}^{-1}$]
Nieprzetworzone zboża, inne niż pszenica durum, owies i kukurydza	1250
Zboża przeznaczone do bezpośredniego spożycia przez ludzi, mąka zbożowa, otręby	750
Chleb, ciasta, herbatniki, przekąski zbożowe i zboża śniadaniowe	500
Przetworzona żywność na bazie zbóż oraz żywność dla niemowląt i małych dzieci	200
Produkty i mieszanki paszowe	8000

Tab.2. Wzór strukturalny wybranych trichotecenów z grupy A i B (Carveo i in 2007).

Trichoteceny	Podstawniki					Wzór strukturalny	
	R1	R2	R3	R4	R5		
Trichoteceny z gr. A	T-2 Tetraol	OH	OOCCH ₃	OOCCH ₃	H	OOCCH ₂ CH(CH ₃) ₂	
	T-2 Triol	OH	OH	OH	H	OOCCH ₂ CH(CH ₃) ₂	
	DAS	OH	OOCCH ₃	OOCCH ₃	H	H	
	HT-2	OH	OH	OOCCH ₃	H	OOCCH ₂ CH(CH ₃) ₂	
	NEO	OH	OOCCH ₃	OOCCH ₃	H	OH	
	STO	OH	OH	OH	H	H	
Trichoteceny z gr. B	NIV	OH	OH	OH	OH	O	
	DON	OH	H	OH	OH	O	
	FUS-X	OH	OOCCH ₃	OH	OH	O	
	15-ADON	OH	H	OOCCH ₃	OH	O	
	3-ADON	OOCCH ₃	H	OH	OH	O	

W ramach niniejszej pracy podjęto próbę ominięcia tego etapu podczas procesu przygotowania próbek. Z uwagi na istotne zagrożenie jakie stanowią trichoteceny w ramach niniejszej pracy podjęto badania mające na celu opracowanie warunków identyfikacji trichotecenów z grupy A i B z naturalnie porażonego ziarna pszenicy uprawianej w Wielkopolsce, gdyż ziarno pszenicy i ekstrakt z niego otrzymany jest złożoną matrycą analityczną. Analizy ilościowa i jakościowa oparte są przede wszystkim na właściwościach fizykochemicznych tych związków. W pierwszym etapie należy przeprowadzić ekstrakcję odpowiednim ekstrahentem (chloroform lub acetonitryl), a następnie poddać analizie chromatograficznej (HPLC, GC). Obecność różnych związków organicznych rozpuszczalnych w ekstrahencie, może niekorzystnie wpływać na interpretację otrzymanych chromatogramów gdyż mogą one wzajemnie się maskować i identyfikacja wybranych związków jest trudna. Wobec powyższego ważny jest dobór odpowiednich parametrów ekstrakcji oraz przygotowania ekstraktu do analiz. Może to się wiązać z mniej lub bardziej czaso- i pracochłonną praktyką laboratoryjną.

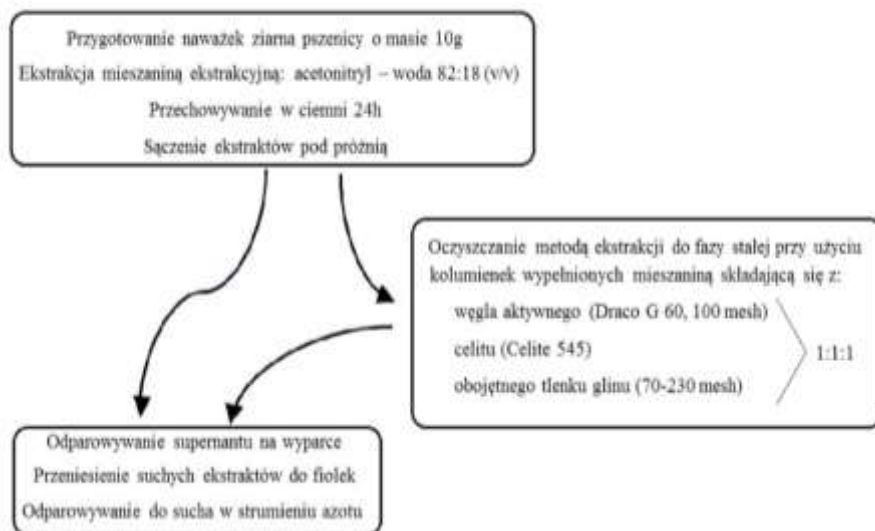
2. Materiał badany

Materiał badany stanowiło ziarno pszenicy pozyskane z 31 powiatów znajdujących się w województwie Wielkopolskim. Z każdego powiatu pobrano 1 kg ziarna. Próby ziarna analizowano w 3 powtórzeniach.

3. Analiza stężenia trichotecenów i wyniki

Próby ziarna pszenicy zmielono za pomocą młynka laboratoryjnego WŻ-1, a następnie poddano ekstrakcji mieszaniną ekstrakcyjną. Po 24h ekstrakty sączone pod zmniejszonym ciśnieniem. Pierwszą część (n=31) supernantów odparowywano do sucha, a pozostałość przenoszono ilościowo za pomocą mieszaniny ekstrakcyjnej do fiolek. Natomiast drugą część (n=31) ekstraktów poddano dodatkowemu etapowi oczyszczania metodą ekstrakcji do fazy stałej przy użyciu kolumnienek. Następnie ekstrakty odparowywano do sucha, a pozostałość przenoszono ilościowo za pomocą mieszaniny ekstrakcyjnej do fiolek (Rys.2.).

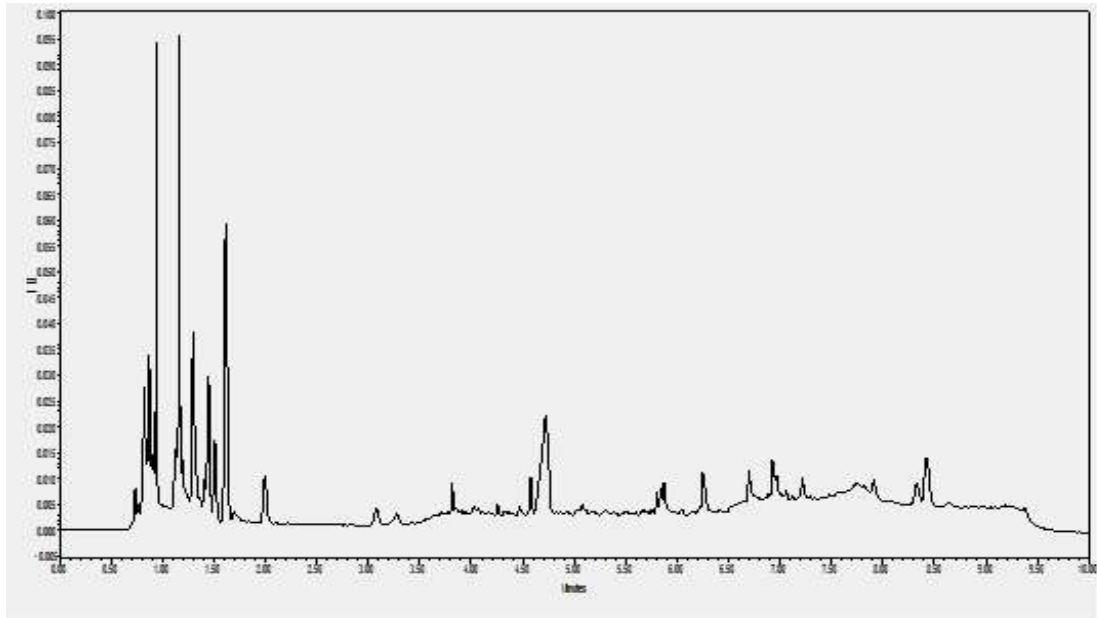
Schemat oznaczania trichotecenów z grupy A i B



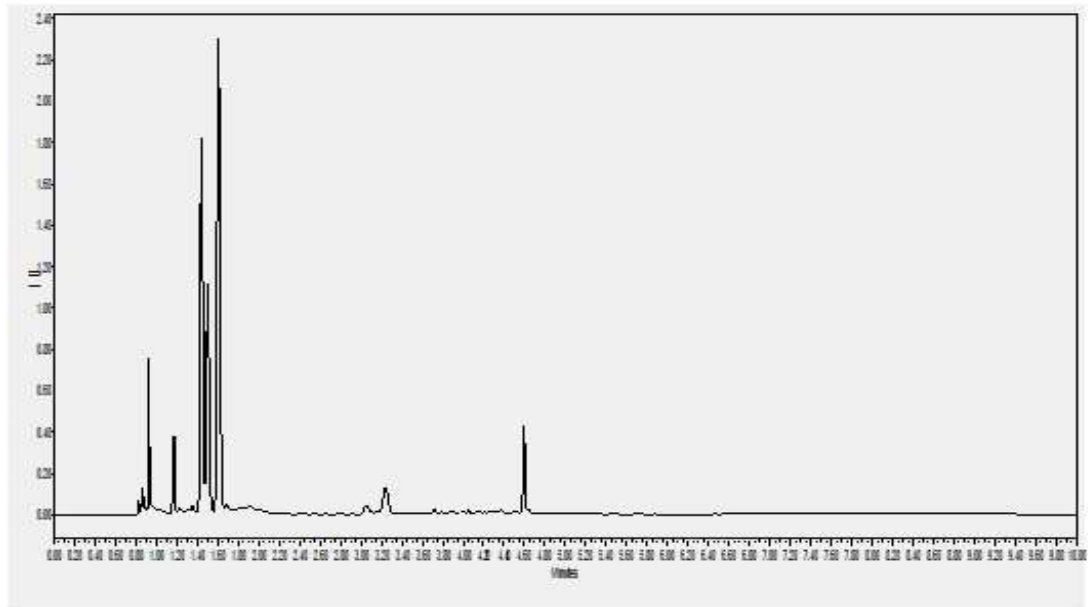
Rys.2.Schemat oznaczania trichotecenów z grupy A i B.

Rozdział chromatograficzny oraz analiza trichotecenów grup A i B prowadzona była oddzielnie za pomocą ultrasprawnego chromatografu cieczowego z detektorem PDA (UPLC-PDA) (Przybylska i in. 2018 a; Przybylska i in. 2018 b).

Podczas niniejszych badań podjęto próbę identyfikacji trichotecenów z grupy A i B dwoma metodami (Rys.3.).



A) Metoda oznaczania trichotecenów bez etapu oczyszczania supernantów



B) Metoda oznaczania trichotecenów z etapem oczyszczania supernantów za pomocą ekstrakcji do fazy stałej

Rys.3. Chromatogramy przedstawiające dwie metody identyfikacji trichotecenów A i B w ekstraktach z ziarna pszenicy.

Pierwsza metoda polegała na analizie trichotecenów bez dodatkowego etapu oczyszczania supernantów. W wyniku czego po analizie chromatograficznej otrzymany chromatogram nie był czytelny, gdyż identyfikowane toksyny były zamaskowane innymi związkami organicznymi, co znacznie utrudniało odczyt. Podjęto wówczas drugą metodę mającą na celu oznaczenie

trichotecenów, podczas której wykorzystano dodatkowy etap oczyszczania supernantów za pomocą ekstrakcji do fazy stałej. Wynikiem tego po analizie chromatograficznej był klarowny chromatogram, a na nim wyróżniono tylko oczekiwane trichoteceny z grupy A i B.

4. Podsumowanie

Podczas niniejszych badań stwierdzono, że metoda oczyszczania supernantów za pomocą ekstrakcji do fazy stałej jest bardziej wydajna i dokładna. Efektem wykorzystania metody ekstrakcji do fazy stałej jest otrzymanie klarownego chromatogramu na podstawie którego łatwo jest zidentyfikować mikotoksyny.

5. Literatura

- Cervero MC, Castillo MA, Montes R (2007) Determination of trichothecenes, zearalenone and zearalenols in commercially available corn – based foods in Spain: *Rev Iberoam Micol.* 24: 52-55.
- Chełkowski J (2013) Mikotoksyny, grzyby toksynotwórcze i mikotoksykozy: wersja on-line: www.cropnet.pl/mycotoxin (06.12.2018), 6-83.
- <http://stat.gov.pl/obszary-tematyczne/rolnictwo-lesnictwo/uprawy-rolne-i-ogrodnicze/wstepny-szacunek-glownych-ziemioplodow-rolnych-i-ogrodniczych-w-2018-roku,3,12.html>
- <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PL/TXT/PDF/?uri=CELEX:02006R1881-20100701&from=NL>
- <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2005:143:0003:0008:PL:PDF>
- <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2013:091:0012:0015:PL:PDF>
- Marasas WFO, Nelson PE, Tousson TA (1984) *Toxigenic Fusarium species: Identity and mycotoxicology*: Penn. State Univ. Press.: ISBN : 0271003480.
- Perkowski J (1993) Tworzenie mikotoksyn w zbożach przez grzyby rodzaju *Fusarium*: *Postępy Nauk Rolniczych* 242: 67-82.
- Przybylska A (2018) Profil związków biologicznie czynnych w różnych genotypach ziarna zbóż uprawianych w Polsce, Olsztyn : Wydawnictwo ABADA, 299-317.
- Przybylska A, Stuper-Szablewska K, Sawińska Z i in. (2018 a) Porównanie stężenia trichotecenów grupy A w naturalnie porażonym ziarnie pszenicy uprawianej w różnych częściach Wielkopolski w latach 2014-2016, Poznań : *Młodzi Naukowcy*, 107-113.
- Przybylska A, Stuper-Szablewska K, Sawińska Z i in. (2018 b) Porównanie stężenia trichotecenów grupy B i zearalenonu obecnych w naturalnie porażonym ziarnie pszenicy uprawianej w różnych częściach Wielkopolski w latach 2014-2016, Poznań : *Młodzi Naukowcy*, 114-121.

14. Zanieczyszczenie ziarna kolorowych form użytkowych kukurydzy mikotoksynami i metalami ciężkimi

Contamination of the grain of coloured maize usable forms with mycotoxins and heavy metals

Anna Przybylska-Balcerek*, Kinga Stuper-Szablewska

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, Wydział Technologii Drewna, Katedra Chemii

Anna Przybylska-Balcerek: ania_przybylska18@wp.pl

Słowa kluczowe: ziarno kukurydzy, ochratoksyna A, deoksyniwalenol, zearalenon

Streszczenie

Kukurydza (*Zea mays* L.) jest jedną z najpowszechniej uprawianych roślin zbożowych na świecie. Zróżnicowanie kukurydzy w obrębie gatunku jest wielokierunkowe i oparte m.in. na: taksonomii, genetyce, morfologii oraz formie użytkowej rośliny, co wiąże się m.in. z różnym zabarwieniem ziarna. Najpowszechniej występuje żółta kukurydza, ale znana jest także kukurydza biała, czerwona i niebieska.

Ziarno kukurydzy ze względu na budowę kolby oraz strukturę jest narażone na zanieczyszczenia miko toksynami. Dodatkowo zabiegi agrotechniczne oraz klimat w jakim rośnie kukurydza predysponują do kumulacji metali ciężkich. Te ostatnie jak i mikotoksyny należą do zagrożeń chemicznych w surowcach i żywności pochodzenia roślinnego. W związku z powyższym podjęto badania, których celem była ocena poziomu zanieczyszczenia wybranymi mikotoksynami oraz metalami ciężkimi ziarna kolorowych form użytkowych kukurydzy.

Materiał badany stanowiło łącznie 18 prób ziarna kukurydzy niebieskiej (n=3), niebieskiej typu pop-corn (n=2), różowej (n=3), żółtej (odmiany: Zorin (n=3), Constellation (n=2), Metronom(n=2)) oraz białej (n=3), pochodzące z USA ze stanu Nowy Meksyk zebrane w 2017 r.

Metodyka badań opierała się o analizę zawartości metali ciężkich (As, Cr, Zn, Cu, Pb, Cd) metodą AAS oraz oznaczenie zawartości mikotoksyn tj.: DON, ZEA oraz OTA metodami chromatograficznymi.

Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono obecność metali ciężkich i mikotoksyn w ziarnie różnych form użytkowych ziarna kukurydzy. Stwierdzono, że ziarno niebieskiej kukurydzy zawierało wszystkie zidentyfikowane metale ciężkie w najwyższym stężeniu. Z kolei w ziarnie żółtej kukurydzy stwierdzono wielokrotnie niższe stężenie wszystkich metali w porównaniu z pozostałymi badanymi ziarnami. Podobne tendencje stwierdzono podczas analizy mikotoksyn.

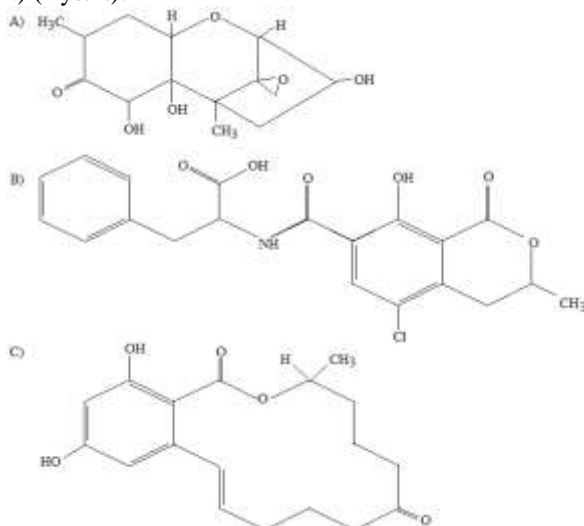
1. Wstęp

Kukurydza (*Zea mays* L.) jest jednym z najbardziej zróżnicowanych gatunków zbóż występujących w przyrodzie i stanowi najpowszechniej uprawianą roślinę zbożową na świecie (Żilić i in. 2012; Przybylska i in. 2017). Jej globalna produkcja sięga do miliarda ton rocznie przewyższając tym samym światową produkcję pszenicy i ryżu. Ziarno kukurydzy nie jest cenionym składnikiem wykorzystywany w produkcji żywności bezglutenowej, której spożycie systematycznie rośnie. Jest także bogatym źródłem związków przeciwutleniających, takich jak związki fenolowe oraz karotenoidów, głównie luteiny i zeaksantyny (Giordano i in. 2018).

Zróżnicowanie kukurydzy w obrębie gatunku można opisać na różnych poziomach wliczając w to taksonomię, genetykę, morfologię, cechy agronomiczne oraz użytkowe rośliny (Orozco-Ramírez i in. 2017). Spośród cech użytkowych wyróżnia się m.in. formy o różnych kolorach ziarna w kolbie. Najpowszechniej w uprawie występuje kukurydza o żółtym kolorze ziarna, ale znana jest także kukurydza biała, czerwona i niebieska. Wzrost zainteresowania kolorowymi formami kukurydzy obserwuje się ze względu na poszukiwanie źródeł przeciwutleniaczy oraz nowych surowców roślinnych, które mogą znaleźć zastosowanie jako żywność funkcjonalna (Nankar i in. 2016; Przybylska i in. 2017). Kukurydza pochodzi z Ameryki Południowej i to właśnie na tych

terenach w głównej mierze uprawia się jej różne formy użytkowe. Wynika to przede wszystkim z tradycji kulturowych ludności latynoamerykańskiej. Niebieska kukurydza wykorzystywana jest do wypiekania tortilli w niektórych regionach Meksyku, a fioletowa lub czarna, zwana "maiz morado" jest składnikiem popularnego w Peru napoju "chicha morada" (Meng i in. 2015).

Wraz ze wzrostem powierzchni zasiewów i uprzemysłowieniem produkcji rolniczej wzrosło także porażenie plantacji patogenami grzybowymi. Na szczególną uwagę zasługują choroby wywołane przez grzyby z rodzaju *Fusarium*. Grzyby te produkują bowiem toksyczne metabolity, nazywane mikotoksynami. Są to drugorzędowe metabolity o niskiej masie cząsteczkowej, a ich obecność w produktach spożywczych może niekorzystnie wpływać na zdrowie konsumenta a w skrajnych przypadkach mogą wykazywać działanie kancerogenne, teratogenne i osłabiające pracę układu odpornościowego w wyniku przewlekłej toksyczności, nawet przy niskich poziomach (Wang i in. 2018). Z punktu widzenia toksykologicznego do grupy najważniejszych mikotoksyn występujących w ziarnie kukurydzy zalicza się: ochratoksynę A (OTA), zearalenon (ZEA) oraz deoksyniwalenol (DON) (Rys.1.).



Rys.1. Wzory strukturalne wybranych mikotoksyn: A) deoksyniwalenol, B) ochratoksyna A, C) zearalenon.

Rozwój przemysłowy świata, w tym produkcja towarowa w rolnictwie, spowodował znaczący wzrost niebezpieczeństwa skażenia środowiska metalami ciężkimi. Są to pierwiastki o masie właściwej powyżej $4,5 \text{ g cm}^{-3}$ wykazujące w reakcjach chemicznych tendencję do oddawania elektronów i tworzenia prostych kationów. Ich zagrożenie wynika z możliwości kumulacji w organizmie człowieka. Są to bowiem pierwiastki mobilne i przemieszczają się w łańcuchu troficznym na szlaku gleba - rośliny - zwierzęta - człowiek. Do pierwotnych źródeł metali ciężkich w glebie zalicza się skałę glebotwórczą, odpady przemysłowe i komunalne, emisje komunikacyjne, nawozy mineralne i środki ochrony roślin stosowane w rolnictwie (Ociepa-Kubicka i Ociepa 2012).

Tab.1. Podział metali ciężkich ze względu na stopień potencjalnego zagrożenia (Ociepa-Kubacka i Ociepa 2012).

Metale ciężkie	Stopień potencjalnego zagrożenia
Cd, Hg, Pb, Cu, Zn	bardzo wysoki stopień potencjalnego zagrożenia
Mo, Mn, Fe	wysoki stopień potencjalnego zagrożenia
Ni, Co	średni stopień potencjalnego zagrożenia
Sr, Zr	niski stopień potencjalnego zagrożenia

Zarówno mikro toksyny, jak i metale ciężkie zostały klasyfikowane do grupy zanieczyszczeń chemicznych surowców i żywności pochodzenia roślinnego. W związku z powyższym monitorowanie ich stężenia w surowcach i produktach roślinnych jest bardzo ważne

W celu prowadzenia skutecznej ochrony zdrowia publicznego, a także ochrony interesów konsumenta i uczciwej konkurencji Komisja Europejska wprowadziła w życie rozporządzenie (WE NR 1881/2006) regulujące najwyższe dopuszczalne stężenie niektórych zanieczyszczeń w środkach spożywczych, w tym mikotoksyn i metali ciężkich (Tab.2.).

Tab.2. Limity wprowadzone przez KE dotyczące stężenia wybranych mikotoksyn w nieprzetworzonej kukurydzy oraz tolerowane dawki dla człowieka..

Mikotoksyny	Najwyższy dopuszczalny poziom [$\mu\text{g kg}^{-1}$]
Ochratoksyna A	5,0
Deoksyniwalenol	1750,0
Zearalenon	200,0

Najwyższe dopuszczalne poziomy metali ciężkich dla zbóż zostały określone dla ołowiu: 0,20 mg kg^{-1} świeżej masy oraz kadmu: 0,10 mg kg^{-1} świeżej masy (z wyłączeniem otrębów, zarodków, pszenicy i ryżu).

Celem niniejszych badań była ocena poziomu zanieczyszczenia wybranymi mikotoksynami oraz metalami ciężkimi ziarna kolorowych form użytkowych kukurydzy.

2. Materiał i metody badań

Materiał badany stanowiło ziarno kukurydzy różnych form użytkowych i odmian (Tab.3.) pochodzące z USA ze stanu Nowy Meksyk zebrane w 2017 r. Ziarno pozyskano od komercyjnego hodowcy zajmującego się produkcją i dystrybucją kukurydzy. Do analizy chemicznej pobrano próby o masie 100 g w trzech powtórzeniach. Ziarno kukurydzy zostało rozdrobione za pomocą młynka laboratoryjnego WZ-40.

Tab.3. Pozyskane do badań formy użytkowe ziarna kukurydzy.

Formy użytkowe		Ilość prób
Ziarno kukurydzy	Niebieska	3
	Niebieska pop-corn	2
	Różowa	3
	Żółta METRONOM	3
	Żółta CONSTELLATION	2
	Żółta ZORIN	2
	Biała	3
SUMA		18

2.1 Oznaczanie zawartości metali ciężkich

Materiał badany został zmineralizowany za pomocą mineralizatora mikrofalowego CEM Mars 5 Xpress (CEM, Matthews, NC, USA) za pomocą HNO_3 (65%) i H_2O_2 . Materiał po mineralizacji został przesączony przez filtr bibułowy 45 mm (Qualitative Filter Papers Whatman, Grade 595: 4 – 7 μm ; GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). Przesącz został rozcieńczony wodą dejonizowaną pochodząca z systemu Milli-Q Academic System (non-TOC (Total Organic Carbon); Millipores. A.S., Molsheim, France). Stężenie poszczególnych metali zostało oznaczone za pomocą płomieniowej atomowej spektrometrii adsorpcyjnej (As, Cr, Zn, Cu, Pb, Cd), przy użyciu AA Duo – AA280FS/AA280Z spektrometru (Agilent Technologies, Mulgrave, Victoria, Australia), wyposażonego w lampę Varian hollow-cathode (HCL; Varian, Mulgrave, Victoria, Australia). Krzywe kalibracji zostały przygotowane w czterech wariantach dla każdego stężenia metali (Ostrowska- Kołodziejczak et al. 2016).

2.2 Oznaczanie zawartości deoksyniwalenolu (DON)

Analiza stężenia DON została przeprowadzona po wcześniejszej ekstrakcji za pomocą mieszaniny acetonitryl – woda 82 : 18 (v/v) oraz oczyszczaniu metodą ekstrakcji do fazy stałej. DON analizowany był jako pochodna trimetylosililowa. Rozdział chromatograficzny oraz analiza

prowadzona była za pomocą chromatografu cieczowego Aquity H class UPLC wyposażonego w detektor Waters Acquity PDA (Waters, USA). Rozdziału chromatograficznego dokonano na kolumnie Acquity UPLC BEH C18 (100mmx2.1mm, particle size 1.7µm) (Waters, Ireland). Analiza wykonywana została w trybie szukania wybranych jonów (SIM): dla DON 103 i 512. Szybkość przepływu helu wynosiła 0,7 cm³/min. Celem potwierdzenia obecności w próbce oznaczanej toksyny wykonano analizę w pełnym zakresie mas (od 100 – 700 amu). Otrzymane wyniki poddano obróbce w programie Chem Station. Odzysk dla DON 84±3,8%. Natomiast limit detekcji dla analizowanych toksyn wynosi 0,001 mg/kg.

2.3 Oznaczanie zawartości zearalenonu (ZEA)

Analiza stężenia ZEA została przeprowadzona po ekstrakcji mykotoksyny za pomocą mieszaniny acetonitryl – woda 82 : 18 (v/v) i po przesączeniu poddane procesowi oczyszczania na kolumnkach powinowactwa immunochemicznego firmy Vicam®. Odparowana do sucha pozostałość rozpuszczona została w mieszaninie acetonitryl : metanol : woda (70:20:10, v/v/v), a następnie homogenizowana w łaźni ultradźwiękowej i dozowana na kolumnę. Rozdział chromatograficzny oraz analizę przeprowadzono za pomocą chromatografu cieczowego Aquity H class UPLC wyposażonego w detektor Waters Acquity PDA (Waters, USA). Rozdziału chromatograficznego dokonano na kolumnie Acquity UPLC BEH C18 (100mmx2.1mm, particle size 1.7µm) (Waters, Ireland). Celem potwierdzenia obecności w próbce oznaczanych toksyn wykonana została analiza w pełnym zakresie mas (od 100 – 700 amu). Otrzymane wyniki poddane zostały obróbce w programie Chem Station.

2.4 Oznaczanie zawartości ochratoksyny (OTA)

Oznaczanie stężenia OTA w materiale badanym wykonano przy użyciu wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detektorem fluorescencyjnym (HPLC Waters). Zastosowano kolumnę Waters Spherisorb ODS2 5 µm/25 cm/5 nm. Do wyekstrahowania OTA z próbek kawy użyto kolumn powinowactwa immunologicznego Ochraprep (R-Biopharm Rhone Ltd, UK). Detekcji dokonywano przy długości fali emisji wynoszącej 443 nm i fali ekstynkcji 333 nm. Stężenie OTA w badanej próbce odczytywano w odniesieniu do standardu OTA (Sigma-Aldrich).

3. Omówienie wyników

W ramach niniejszej pracy pobrano łącznie 18 prób ziarna kukurydzy pochodzącego z 4 różnych rodzajów (niebieska, różowa, żółta, biała). Na podstawie uzyskanych wyników przedstawionych w tabeli 3, stwierdzono istotną różnicę w obecności badanych metali ciężkich w badanym ziarnie kukurydzy. Spośród analizowanych prób najbardziej zanieczyszczone metalami ciężkimi było ziarno kukurydzy niebieskiej typu pop-corn, ziarno kukurydzy różowej oraz żółtej odmiany Zorin. Natomiast sumarycznie najniższą zawartość metali ciężkich oznaczono w ziarnie kukurydzy żółtej odmiany Constellation oraz Metronom.

Metale te wykazują potencjalnie najwyższe zagrożenie zarówno dla samej rośliny podczas wzrostu jak i dla konsumenta. Analizowano: As, Cr, Zn, Cu, Pb i Cd. Na podstawie danych stwierdzono, że we wszystkich próbach ziarna kukurydzy dominując pod względem stężenia był cynk (Tab.4). W ziarnie kukurydzy niebieskiej typu pop-corn, różowej oraz żółtej odmiany Zorin stwierdzono najwyższe stężenie tego pierwiastka, a najniższe w ziarnie kukurydzy niebieskiej i żółtej odmiany Constellation oraz Metronom.

Następnym metalem ciężkim pod względem oznaczonego stężenia w badanym ziarnie kukurydzy jest miedź. Najwięcej Cu stwierdzono w ziarnie kukurydzy niebieskiej i białej, podczas gdy najniższą zawartością charakteryzowała się próba ziarna kukurydzy żółtej odmiany Metronom.

Wśród omawianych metali ciężkich zidentyfikowano również ołów, kadm i chrom. Spośród analizowanych odmian kukurydzy, najwyższe stężenie zarówno Pb, Cd jak i Cr stwierdzono w obydwu odmianach ziarna kukurydzy niebieskiej. Natomiast najniższe stężenie odnotowano w przypadku ziarna kukurydzy żółtej odmiany Zorin i Metronom.

Istotne różnice zauważono również w przypadku arsenu. Jego stężenie w ziarnie niebieskiej kukurydzy było niemalże dwukrotnie wyższe w porównaniu z ziarnem kukurydzy niebieskiej typu

pop-corn i różowej oraz co najmniej 10-krotnie wyższe w porównaniu z pozostałymi badanymi odmianami kukurydzy.

Tab.4. Zawartość wybranych metali ciężkich w ziarnie różnych rodzajów kukurydzy [mg kg⁻¹].

Formy użytkowe		Metale ciężkie [mg kg ⁻¹]					
		Cynk	Miedź	Ołów	Kadm	Arsen	Chrom
Ziarno kukurydzy	Niebieska	20,6a	2,9a	0,89a	0,26b	0,216a	0,084b
	Niebieska pop-corn	28,5a	2,7a	0,93a	0,39b	0,145b	0,096b
	Różowa	27,3b	2,6a	0,72a	0,13a	0,106b	0,075a
	Żółta METRONOM	20,4a	2,1a	0,69a	0,12a	0,019a	0,072a
	Żółta CONSTELLATION	19,5a	2,3a	0,77a	0,16a	0,026a	0,069a
	Żółta ZORIN	27,3b	2,2a	0,62a	0,11a	0,034a	0,061a
	Biała	22,6a	2,8a	0,73a	0,14a	0,012a	0,075a

a,b – takie same litery w kolumnie oznaczają brak istotnych różnic na poziomie ufności 0,05

Drugą grupą zanieczyszczeń chemicznych jaką analizowano były wybrane mikotoksyny. Analizowano deoksyniwalenol (DON), zearalenon (ZEA) oraz ochratoksynę A (OTA). Podczas niniejszych badań stwierdzono obecność wszystkich mikotoksyn w analizowanych próbach ziarna kukurydzy. Na podstawie przeprowadzonych badań i zebranych w tabeli 5 wyników, zauważono najwyższą sumaryczną zawartość mikotoksyn w obydwu odmianach ziarna kukurydzy niebieskiej. Natomiast, aż dwukrotnie niższą sumaryczną zawartość mikotoksyn stwierdzono w ziarnie kukurydzy żółtej z odmiany Constellation oraz Zorin. Natomiast nie stwierdzono różnic w stężeniu OTA w różnych odmianach ziarna kukurydzy. Na podstawie przeprowadzonych badań zauważono jednak najwyższe stężenie OTA w ziarnie kukurydzy różowej, niebieskiej typu pop-corn oraz białej, podczas gdy co najmniej dwukrotnie niższą zawartość oznaczono we wszystkich odmianach ziarna kukurydzy żółtej.

Tab.5. Zawartość wybranych mikotoksyn w ziarnie różnych rodzajów kukurydzy [µg kg⁻¹].

Formy użytkowe		Mikotoksyny [µg kg ⁻¹]		
		DON	ZEA	OTA
Ziarno kukurydzy	Niebieska	186,0b	106,0c	4,0a
	Niebieska pop-corn	145,0b	82,0b	4,8a
	Różowa	102,0a	79,0b	5,1a
	Żółta METRONOM	116,0a	46,0a	2,0a
	Żółta CONSTELLATION	103,0a	40,0a	2,9a
	Żółta ZORIN	98,0a	49,0a	2,4a
	Biała	104,0a	75,0b	4,3a

a, b, c - takie same litery w kolumnie oznaczają brak istotnych różnic na poziomie ufności 0,05

4. Dyskusja

Kukurydza należy do zbóż cechujących się wysokim ryzykiem zanieczyszczenia mikotoksynami i metalami ciężkimi. Warunki klimatyczne sprzyjające dobremu plonowaniu

kukurydzy sprzyjają również rozwojowi patogenicznych szczepów grzybów mikroskopowych produkujących mikotoksyny. Uzyskane w ramach niniejszej pracy wyniki nie przekraczają dopuszczalnych maksymalnych stężeń mikotoksyn i metali ciężkich w ziarnie kukurydzy przeznaczonej do konsumpcji, czy na cele paszowe (Rozporządzenie UE). Stężenie DON, ZEA i OTA w analizowanych próbach ziarna jest podobna jak w próbach analizowanych przez innych autorów (Czembor i Matusiak 2014, Chełkowski 2010, Wróbel 2014, Ochodzki 2015). Istotnie wyższe wartości badanych mikotoksyn stwierdzono dla ziarna niebieskiej kukurydzy co mogło być związane z drobniejszym ziarnem tego zboża umożliwiającym łatwiejszą penetrację grzybni do wnętrza kolby. W przypadku metali ciężkich, analiza również wykazała wartości stężeń które były podobne do wartości przedstawionych przez innych autorów. Ziarno kukurydzy badane w ramach niniejszej pracy pochodziło z Meksyku, w którym panujący klimat sprzyja występowaniu zagrożeń mikrobiologicznych, a co za tym idzie również chemicznych. Uprawiana w warunkach polskich kukurydza cechuje się niższym poziomem zanieczyszczenia mikotoksynami i metalami ciężkimi (Chełkowski 2010).

5. Podsumowanie

Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono obecność metali ciężkich i mikotoksyn w ziarnie różnych form użytkowych ziarna kukurydzy. W grupie metali ciężkich występują zarówno pierwiastki niezbędne dla organizmów żywych, jak i pierwiastki wykazujące tylko działanie toksyczne wywołując liczne schorzenia, zalicza się kadm i ołów - metale zbędne dla organizmów żywych.

Bogate w antyoksydanty, potencjalnie najzdrowsze ziarno niebieskiej kukurydzy zawierało wszystkie zidentyfikowane metale ciężkie w najwyższym stężeniu. Z kolei w ziarnie żółtej kukurydzy uprawianym w klimacie umiarkowanym i najczęściej konsumowanym stwierdzono wielokrotnie niższe stężenie wszystkich metali. Podobne obserwacje stwierdzono podczas analizy mikotoksyn.

6. Literatura

- Chełkowski J (2010) Mikotoksyny, grzyby toksynotwórcze i mikotoksykozy [online]. [Dostęp 28.12.2018]. Dostępny w Internecie: <http://www.cropnet.pl/dbases/mycotoxins.pdf>
- Czembor E, Matusiak M (2014) Dynamika rozwoju fuzariozy kolb kukurydzy powodowanej przez *Fusarium graminearum* oraz akumulacji deoksynivalenolu w ziarnie. *Biul. IHAR*, 274:27-39.
- Giordano D, Beta T, Gagliardi F i in. (2018) Influence of agricultural management on phytochemicals of colored corn genotypes (*Zea mays* L.) – Part II: Sowing time. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 66(17): 4309-4318.
- Meng Q, Murray SC, Mahan A i in. (2015) Rapid estimation of phenolic content in colored maize by near-infrared reflectance spectroscopy and its use in breeding. *Crop Science* 55: 2234-2243.
- Nankar AN, Dungan B, Paz N i in. (2016) Quantitative and qualitative evaluation of kernel anthocyanins from southwestern United States blue corn, *J Sci Food Agric*,
- Ochodzki P (2015) Mikotoksyny w ziarnie kukurydzy. Redakcja Agronews, [online]. [Dostęp 28.12.2018]. Dostępny w Internecie: <https://agronews.com.pl/artukul/mikotoksyny-w-ziarnie-kukurydzy/>
- Ociepa-Kubicka A, Ociepa E. (2012) Toksyczne oddziaływanie metali ciężkich na rośliny, zwierzęta i ludzi. *Inżynieria i ochrona środowiska* 15(2): 169-180.
- Orozco-Ramírez Q, Perales H, Hijmans RJ. (2017) Geographical distribution and diversity of maize (*Zea mays* L. subsp. *mays*) races in Mexico. *Genetic Resources and Crop Evolution* 64(5): 855-865.
- Ostrowska-Kołodziejczak A, Stuper-Szablewska K, Kulik T i in. (2016) Concentration of fungal metabolites, phenolic acids and metals in mixtures of cereals grown in organic and conventional farms, *Journal of Animal and Feed Sciences*, 25: 74–81.
- Przybylska A, Stuper-Szablewska K, Kurasiak-Popowska D i in. (2017) Zawartość związków fenolowych w niebieskiej kukurydzy. *Wydawnictwo Fundacji Promovendi*, 143-152.

- Wang M, Xu S, Wang T i in. (2018) Effect of inoculants and storage temperature on the microbial, chemical and mycotoxin composition of corn silage. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 31(12): 1903-1912.
- Wróbel B (2014) Zagrożenia zwierząt i ludzi toksynami grzybów pleśniowych zawartych w paszach i żywności. *ITP, Woda – Środowisko - Obszary Wiejskie*, 14(47): 157-176.
- Žilić S, Serpen A, Akıllıoğlu G i in. (2012) Phenolic compounds, carotenoids, anthocyanins, and antioxidant capacity of colored maize (*Zea mays* L.) Kernels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60: 1224-1231.

15. Problematyka skażenia dioksynami produktów zbożowych w kontekście zdrowia ludzi i zwierząt

Problems of dioxin contamination of cereal products in the context of human and animal health

Marcin Różewicz

Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – Państwowy Instytut Badawczy, Zakład Uprawy Roślin Zbożowych, Puławy
Opiekun naukowy: Jerzy Grabiński

Marcin Różewicz: mrozewicz@iung.pulawy.pl

Słowa kluczowe: ziarno, zboża, toksyczność, dioksyny

Streszczenie

W niniejszej pracy przedstawiona została problematyka skażenia toksycznymi związkami chemicznymi, jakimi są dioksyny oraz ich zawartość w zbożach, jako ważnym substracie wykorzystywanym w przetwórstwie spożywczym i paszowym. Dioksyny to grupa związków chemicznych, które w ostatnim czasie skupiała na sobie uwagę opinii publicznej. Wynika to z faktu licznych skażeń produktów spożywczych tymi substancjami oraz konsekwencjami zdrowotnymi, jakie wywołało ich spożywanie. Coraz baczniejszą uwagę zwraca się, więc na bezpieczeństwo żywnościowe w kontekście możliwości skażenia produktów spożywczych. Konieczne stało się, więc wprowadzenie wielu uregulowań prawnych, zarówno w prawodawstwie krajowym jak i Unii Europejskiej, które określają maksymalne poziomy zawartości substancji. Ziarna zbóż, które stanowią ważny surowiec spożywczy jak również paszowy są ważnym elementem w ogniwie łańcucha żywnościowego. Istotnym czynnikiem prewencji przed narażeniem na dioksyny jest, więc stały monitoring ich zawartości w ziarnie zbóż.

1. Wstęp

Do dioksyn przynależy liczna grupa związków, które cechuje podobieństwo w budowie chemicznej. Zawierają one w cząsteczce dwa pierścienie benzenowe połączone przez jeden (dibenzofurany) lub dwa atomy tlenu (dibenzodioksyny). Do najbardziej rozpowszechnionych i toksycznych zaliczane są: tetra-chloro-dibenzo-p-dioksyna (TCDD), tetra-chloro-dibenzo-furan (TCDF), polichloro-dibenzo-p-dioksyna (PCDD), polichloro-dibenzofuran (PCDF) i ich pochodne. Do skażenia środowiska tymi substancjami dochodzi poprzez działalność różnych gałęzi przemysłu, m.in.: chemicznego, elektrotechnicznego, celulozowo-papierniczego, hutniczego i metalurgicznego, szklarskiego, ceramicznego, jak również niekontrolowane spalanie odpadów, węgla, oleju, spopielania opon w gospodarstwach domowych. Obecność dioksyn w środowisku i ich kumulacja w łańcuchu troficznym sprawia, że ich ilość w środowisku systematycznie się zwiększa. Zanieczyszczenie dioksynami roślin, głównie gatunków, których plony szeroko są wykorzystywane w produkcji żywności i pasz (zboża) stanowią szczególnie duże niebezpieczeństwo dla człowieka. Dioksyny nie były nigdy produktem docelowym w żadnej gałęzi przemysłu. Powstawały, jako produkty uboczne i nie zwracano uwagi na ich szkodliwość. Pobierane z pożywieniem nawet w małej ilości są odkładane i kumulują się w tkance tłuszczowej. Zatruwają organizm powoli i bez natychmiastowych objawów. Skutki ich działania na organizm pojawiają się bardzo późno nawet po kilku lub kilkunastu latach przyswajania dioksyn (Sokołowski 1994). Mimo, że w ostatnich latach zaobserwowano zmniejszenie emisji z zakładów przemysłowych dioksyn oraz dioksynopodobnych polichlorowanych bifenyli (dl-PCB), z powodu wprowadzenia wysokich sankcji oraz kar finansowych, to jednak ich nagromadzenie w środowisku z powodu wysokiej trwałości sprawiło, że nastąpiła kumulacja ich stężenia. W świetle tych faktów ochrona zdrowia społeczeństwa przed toksycznym działaniem dioksyn jest celem wielu rządów, jak również jednym z priorytetowych kierunków prac badawczych (Struciński i in., 2011). Celem podejmowanych badań jest określenie

realnego zagrożenia spowodowanego obecnością dioksyn w produktach zbożowych dla zdrowia ludzi i zwierząt.

2. Charakterystyka dioksyn jako związków toksycznych

Grupa substancji o podobnych właściwościach toksycznych, fizycznych i chemicznych zaliczona została do jednej grupy związków nazywanych potocznie dioksynami. Ludzkości zaczęły być znane od niedawna, ponieważ wykryte zostały pod koniec lat 50. XX wieku, co wiąże się z wynalezieniem pierwszych metod ich oznaczania (Piskorska-Pliszczyńska 1999). Z racji występowania przypadków skażenia produktów żywnościowych tymi związkami rosła uzasadniona obawa społeczeństwa w zakresie bezpieczeństwa żywności (Tlustos 2008; Piskorska-Pliszczyńska i Warenik-Bany 2013). Zainteresowanie badaczy w kontekście możliwości skażenia produktów żywnościowych wynika również z powszechności występowania dioksyn w środowisku oraz ich dużej trwałości w organizmie ludzi do 30 lat, w kwasach humusowych nawet do 100 lat oraz wysokiej toksyczności dla ludzi i zwierząt (Calborn i in., 1993; Birnbaum 1994; Struciński i in., 2000; Makles i in., 2001; Van der Bergh i in., 2006; Piskorska-Pliszczyńska 2011; Biernacki i in., 2015). Pod nazwą dioksyny określa się grupę aromatycznych związków chloroorganicznych, wykazującą wyjątkowo dużą stabilność termiczną i odporność chemiczną na utlenianie oraz procesy degradacji biologicznej w skład których wchodzi polichloro- i polibromopochodne diobezno-p-dioksyny i diobeznofurany. Mimo pewnych różnic posiadają one wspólna cechy:

- wspólne źródła i procesy powstawania,
- podobne właściwości fizykochemiczne i toksyczne,
- wzajemne współwystępowanie,
- podobne metody oznaczania.

Podstawowym substratem jednak do powstawania wymienionych związków jest diobezno-p-dioksyna. W wyniku spalania produktów i odpadów ją zawierających powstają inne jej pochodne o równie toksycznym działaniu na organizmy ludzi i zwierząt. Jest ona ciałem stałym tworzącym bezbarwne kryształy o temperaturze topnienia w zakresie od 88°C do 332°C. Dioksyny są substancjami hydrofobowymi, co utrudnia ich wymywanie z powierzchni gleby w jej głębsze warstwy a to sprzyja ich kumulacji w środowisku. Natomiast ich budowa sprawia, że są substancjami lipofilnymi, dlatego dobrze rozpuszczają się w rozpuszczalnikach niepolarnych, takich jak tłuszcze czy oleje. Łatwo, więc po dostaniu się do organizmu kumulują się w tkance tłuszczowej, a to z kolei utrudnia pozbywanie się ich. Łatwo zwiększają przez to swoje stężenie w organizmie nie wykazując początkowo toksycznego działania. Charakteryzują się również wysoką odpornością na działanie utleniaczy i kwasów, a także wysokich temperatur. Ich zniszczenie powoduje dopiero promieniowanie nadfioletowe, jak również bardzo wysoka temperatura powyżej 1200°C (Piskorska-Pliszczyńska 1999; Dudzińska i in., 2001). Z racji swoich właściwości wykazują bardzo wysoką toksyczność. Jej stopień w tak dużej grupie związków, jaką stanowią dioksyny jest jednak zróżnicowany. Wpływ na to ma sama budowa konkretnego związku w tym liczba posiadanych atomów chloru bądź bromu oraz pozycji podstawienia w pierścieniu aromatycznym. Za najbardziej toksyczną dla organizmów żywych uznaje się 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioksynę (2,3,7,8-Tetra-Chloro-Dibenzo-p--Dioxin - TCDD) (Dudzińska i in., 2001; Schechter i in., 2006; Biernacki i in., 2015). Z racji dużej liczebności i zróżnicowanego stopnia toksyczności związków zaliczanych do dioksyn zaistniała konieczność określenia skali ich toksyczności. Wyznacznikiem takim jest współczynnik równoważny toksyczności (toxicity equivalent factor - TEF), który wyraża toksyczność danego związku z grupy dioksyn w stosunku do związku odnośnikowego o najwyższej toksyczności, którym jest TCDD. Sama wartość TEF dla konkretnego związku określana jest również na podstawie efektów biologicznych uzyskanych w badaniach *in vivo* i *in vitro*. Brane pod uwagę są: dawka śmiertelna (LD50 - lethal dose), spadek masy ciała, zanik grasicy, indukcja wątrobowej hydroksylazy węglowodorów aromatycznych, zahamowanie aktywności glukoneogenezy i wzrost stężenia tryptofanu we krwi (Makles i in., 2001; Struciński i in., 2011). Ponieważ dioksyny powszechnie występują w środowisku jednak nie w czystej postaci a zawsze w mieszaninie różnych substancji, stąd też współczynnik TEF wykorzystywany jest do wyznaczenia równoważników toksyczności

(toxic equivalent - TEQ), które stanowią sumę iloczynów stężenia poszczególnych kongenerów (substancje chemiczne spokrewnione ze względu na budowę, strukturę lub funkcje) i ich współczynników TEF. Metoda ta jest wykorzystywana do określenia całkowitej toksyczności mieszaniny dioksyn i furanów w badanej próbce (Ahlborg i in., 1992; Sokołowski i in., 1994; Weisglas-Kuperus 1998; Beard i in., 1999; Rozporządzenie Komisji UE nr 1259/2011). Struciński i in. (2011) wskazują również na zróżnicowane oddziaływanie dioksyn na różne gatunki zwierząt nawet te należące do jednej rodziny. Autorzy, jako przykład podają dwa gatunki popularnych zwierząt towarzyszących i laboratoryjnych wskazując, że dawka śmiertelna najbardziej toksycznego związku TCDD dla świnki morskiej to 0,6 µg/kg, a do uśmiercenia chomika potrzeba aż 5000 razy większej dawki. Nie ma możliwości testowania na ludziach dioksyn. Jednak znany przypadek zatrucia Prezydenta Ukrainy Juszczenki tym związkiem wskazuje, że teoretyczna norma toksyczności określona dla ludzi na poziomie do 1-4 pg/kg masy ciała, w tym przypadku została przekroczona 20 tys. razy. Nie może to świadczyć jednoznacznie o tym, iż można ją uznać za graniczną, gdyż był to jednostkowy przypadek i mogą istnieć również osobnicze predyspozycje organizmu do radzenia sobie z tak dużymi stężeniami TCDD.

3. Toksyczność dla ludzi i zwierząt

Z powodów bioetycznych nie ma możliwości bezpośredniego i celowego badania wpływu dioksyn oraz testowania toksycznych dawek na organizm człowieka, z tych powodów prowadzi się badania nad ich wpływem na organizmy innych gatunków wykorzystując zwierzęta modelowe. Z racji zróżnicowanych reakcji gatunkowych trudno jednak bezpośrednio przełożyć skutki działania, jak i same toksyczne stężenia dla zwierząt i na organizm ludzki. Z bezpośrednim działaniem toksycznym u ludzi mamy jedynie do czynienia przy incydentach przypadkowego zatrucia ludzi. Duże jednorazowe dawki mogą działać jednak bardziej toksycznie niż długotrwałe pobieranie małych dawek. Jak podają Słowińska i in. (2011) Międzynarodowa Agencja Badań nad Rakiem (IARC) w roku 1997 uznała za najbardziej toksyczną z grupy dioksyn substancję o skrótowej nazwie TCDD i zaliczyła ją do grupy I tzn. do związków o udowodnionym działaniu kancerogennym dla człowieka. W roku 2009 do grupy tej zaliczono kolejne związki przynależące do dioksyn - 2, 3, 4, 7, 8 - pentachlorodibenzofuran oraz przedstawiciela dioksynopochodnych dl-PCB, tj. 3, 3', 4, 4', 5 - pentachlorobifenyl (PCB-126) (Mocarelli i in., 2011). Jednak według Tsai'a i in. (2007) związki te działają bezpośrednio toksycznie na geny tylko po przekroczeniu pewnego progu ich stężenia w organizmie. Poniżej tego progu nie wykazują one swojego negatywnego wpływu. Istnieją przypuszczenia, że związki te wpływają negatywnie na układ rozrodczy ludzi przede wszystkim naśladując działanie hormonów płciowych, zakłócając ich homeostazę, regulację oraz sekrecję na zasadzie ujemnego sprzężenia w osi podwzgórze – przysadka – gruczoł obwodowy powodują upośledzenie funkcji szczególnie jajników i jąder (Beard i in., 1999). Z racji budowy dioksyn, podobnej do cząsteczek hormonów steroidowych, docelowym miejscem ich szczególnego działania są takie organy jak: tarczyca, gonady żeńskie i męskie, endometrium macicy oraz inne organy, w których są wytwarzane hormony steroidowe. Sprawia to, że skutkiem ich obecności w organizmie ludzi i zwierząt jest oddziaływanie na syntezę, sekrecję, transport oraz eliminację hormonów z ustroju. Ich negatywne działanie polega również na upośledzeniu wiązania produkowanych i uwolnionych do krwioobiegu hormonów z odpowiednim receptorem. Toksyczne działanie dioksyn może być znacznie groźniejsze dla rozwijających się płodów. Organiczne związki chloru są przenoszone z organizmu matki do płodu poprzez łożysko, a niemowlę otrzymuje je z mlekiem matki.

W badaniach na szczurach Całkosiński i in. (2003, 2004) wykazali, że podawane ciężarnym samicom dioksyny oddziałują również toksycznie na ich płody, w tym prowadzą do zaburzeń rozwoju gonad. Wpływ dioksyn na zaburzenie czynności rozrodczych według wspomnianych autorów był związany ze zmianami poziomu estrogenów we krwi samic szczurów. Jednym z symptomów występującym u ludzi, świadczącym o narażeniu na dłuższe działanie dioksyn np. w środowisku pracy lub też pobrania z żywnością jest tzw. chloracne, czyli trądzik chlorowy, po raz pierwszy opisany w 1899 roku. Choroba ta objawia się znacznym pogrubieniem warstwy rogowej naskórka oraz jego hiperplazją. Powstaje on na skutek dysfunkcji gruczołów łojowych, które są poszerzone, a ich ujścia zaczopowane przez masy rogowo-łojowe. Objaw ten występuje jednak z opóźnieniem po

dłuższym czasie ekspozycji na działanie dioksyn ujawnia się po około kilku miesiącach (Słowińska i in., 2011). Ze względu na krótki okres życia większości zwierząt gospodarskich objawy zatrucia dioksynami są trudno lub w ogóle niezauważalne. Najczęściej obecność dioksyn w tkankach jest stwierdzana w wyniku poddania ich dodatkowej analizie na przykład po uboju zwierząt bądź też po incydentalnych przypadkach zatrucia ludzi.

4. Zawartość dioksyn w produktach zbożowych i paszach

Polska jest europejskim potentatem w produkcji wielu artykułów żywnościowych w tym zbóż oraz produktów zwierzęcych. Wyprodukowana w naszym kraju żywność jest w dużym stopniu eksportowana zarówno na rynek wewnętrzny Unii Europejskiej jak i też zewnętrzne rynki światowe. Istotnym elementem jest, więc zapewnienie bezpieczeństwa poprzez przestrzeganie procedur i wymogów prawnych, aby ustrzec się przed możliwymi niekorzystnymi konsekwencjami gospodarczymi, jak i wizerunkowymi, mogącymi negatywnie wpłynąć na postrzeganie i sprzedaż polskich produktów.

W ostatnich latach daje się zauważyć znaczące zainteresowanie badaczy biologicznym działaniem dioksyn, jak również ich obecnością w łańcuchach pokarmowych. Wprowadzane do środowiska naturalnego dioksyny podlegają ogólnym prawom rozprzestrzeniania się substancji w biosferze. Emitowane w trakcie spalania odpadów wydostają się wraz z pyłami i dymem, a przy wietrznej i suchej pogodzie rozprzestrzeniają się na duże odległości. Opadając następnie na glebę skażają ją, a wchłaniające je rośliny pastewne są jednym z początkowych ogniw łańcucha pokarmowego.

Dotyczy to również zbóż, które stanowią surowiec do przetwórstwa spożywczego, jak też wykorzystywane są, jako komponenty do produkcji paszy dla zwierząt. Pobieranie wraz z pożywieniem przez ludzi dioksyny kumulują się w tkance tłuszczowej lub przenikają do tkanek zwierząt i produktów spożywczych od nich pozyskiwanych, jak jaja, mleko, mięso i jego przetwory. Będąc ostatnim ogniwem łańcucha pokarmowego człowiek pobiera z pożywieniem roślinnym bądź zwierzęcym znaczne ilości dioksyn. Bezpośrednia ostateczna zawartość dioksyn zależy od dziennej dawki pobranej przez zwierzę oraz czasu ich akumulacji w jego organizmie. Monitoring skażenia dioksynami prowadzi się różnymi metodami jak: monitoring chemiczny, biologiczny i toksykologiczny. Biologiczny monitoring polega na obserwacji przemian dioksyn w żywych organizmach, w tym w organizmie człowieka. Organiczne związki chloru są przenoszone z organizmu matki do płodu poprzez łożysko, a niemowlę otrzymuje je z mlekiem matki. Chemiczny obejmuje metody laboratoryjne oznaczania zawartości i identyfikacji konkretnych związków należących do dioksyn w środowisku naturalnym, jak i produktach żywnościowych oraz surowcach paszowych. Toksykologiczny natomiast obejmuje diagnozowanie i ocenę stopnia zatrucia dioksynami wśród grup zawodowych osób narażonych na kontakt z tymi związkami (Makles i in., 2001) . Pod pojęciem monitoring rozumie się działania mające na celu kontrolę, identyfikację oraz określenie stopnia zagrożenia możliwością skażenia dioksynami.

Powszechnie spożywane produkty spożywcze na bazie ziarna zbóż sprawiają, że również one muszą być poddawane kontroli zawartości dioksyn i polichlorowanych bifenyli. Takie badania przeprowadzone zostały przez Brandt i in. (2012), którzy określali poziom tych związków w ziarnie różnych odmian pszenicy, a także w różnych frakcjach pszenicy i pieczywie. Średnia zawartość PCBs w ziarnach badanych odmian wynosiła 0,0221 mg/kg tłuszczu. Przy czym należy zaznaczyć, iż porównując poszczególne zawartości PCBs w poszczególnych frakcjach ziaren, wraz ze zmniejszaniem się wielkości ziarna obniżał się w nich poziom tych związków. Cytowani autorzy porównywali także poziom PCBs w dwóch rodzajach pieczywa, stwierdzając znacznie wyższą zawartość w pieczywie pszennym razowym. Roszko i Szymczyk (2010) oceniali zawartości polichlorowanych bifenyli (PCB) w ziarnie pszenicy i jęczmienia oraz w otrębach pszennych dostępnych na rynku krajowym. W wyniku przeprowadzonych badań autorzy stwierdzili stosunkowo niskie stężenie PCB, w kontrolowanych próbkach nieprzekraczające wartości 0,4 pg TEQ g⁻¹.

Badania Roszko i in. (2014) wykazały, że poziom zanieczyszczenia PCB, PBDE i pestycydami chloroorganicznymi w produktach zbożowych dostępnych na polskim rynku jest na ogół niski. Jednak w kilku przypadkach stwierdzono podwyższony poziom poszczególnych

zanieczyszczeń. Produkty spożywcze zawierające więcej warstw okrywy owocowo-nasiennej (np. otręby) były statystycznie bardziej zanieczyszczone, co może wskazywać na dominację ścieżki powietrznej zanieczyszczenia zbóż trwałymi zanieczyszczeniami organicznymi. W świetle przytoczonych wyników badań, ziarno i produkty zbożowe zawierają mniej dioksyn w porównaniu do zawartości w produktach spożywczych z roślin oleistych. Jest to związane z lipofilnymi właściwościami dioksyn i PCB oraz stosunkowo niskim udziałem tłuszczu w ziarnach zbóż (Wyżykowska i in., 2006).

Badania surowców paszowych na zawartość dioksyn są dość kosztowne jednak konieczne. Przestrzeganie wymogów pod tym względem jest jednym z gwarantów uzyskiwania produktów żywnościowych o jak najniższej zawartości dioksyn. Według Rozporządzenia Komisji (WE) NR 277/2012 z dnia 28 marca 2012 r. maksymalna zawartość dioksyn liczona, jako suma PCDD i PCDF wyrażona w ng WHO PCDD/F - TEQ/kg w materiałach paszowych pochodzenia roślinnego i mineralnego, w dodatkach paszowych, takich jak glina kaolinowa, wermikulit oraz mieszankach paszowych może wynosić 0,75 ng/kg, z wyjątkiem mieszanek paszowych dla zwierząt domowych i ryb, w których maksymalna zawartość nie powinna przekraczać 1,75 ng/kg, w materiałach paszowych pochodzenia zwierzęcego, w tym w tłuszczu zwierzęcym, włącznie z tłuszczem mlecznym i tłuszczem jaj 1,5 ng/kg, oleju z ryb 5 ng/kg, rybacz i innych zwierzętach wodnych i produktach z nich otrzymywanych 1,25 ng/kg, białku rybnym hydrolizowanym 1,75 ng/kg, a w premiksach 1 ng/kg. Suma dioksyn i dioksynopodobnych dl-PCB w materiałach paszowych pochodzenia roślinnego nie może przekroczyć 1,25 ng/kg, a w dodatkach paszowych, prefiksach i mieszankach paszowych 1,5 ng/kg. Maksymalna zawartość dioksyn w materiałach paszowych m. in. w produktach pozyskanych od zwierząt lądowych, włącznie z mlekiem i przetworami mlecznymi oraz jajami i produktami jajecznymi wynosi 1,25 ng/kg, natomiast w tłuszczu zwierzęcym, włącznie z tłuszczem mlecznym i tłuszczem jaj nie może przekraczać 2 ng/kg.

Zdecydowana większość z badanych surowców paszowych jest dobrej jakości i nie przekracza stężenia dozwolonych prawnie norm. Na około 1400 przebadanych próbek paszy komercyjnych przeznaczonych dla zwierząt gospodarskich zaledwie w 27 przypadkach stwierdzono przekroczone normy, co stanowiło 1,9% ogółu badanych próbek. Stały monitoring pozwala również ustalić tendencje, co, do których surowców możliwe jest przekroczenie norm zawartości dioksyn, a są to głównie oleje roślinne, olej rybi oraz dodatki mineralne (Piskorska-Pliszczyńska i Małagocki., 2013). Również badania Cybulskiej i in. (2012) potwierdzają dobrą jakość polskich surowców paszowych pod względem nie przekraczania norm sumarycznego stężenia związków zaliczanych do grupy dioksyn, a ich średnie stężenie w badanych surowcach paszowych nie przekraczało połowy wymaganych norm prawnych. Również zdaniem Korola i Matyki (2000) wyniki prowadzonych kontroli zawartości dioksyn w paszach świadczą o niskim poziomie zagrożenia, jednak autorzy wskazują również na konieczność stałego monitoringu ich zawartości przy uwzględnieniu norm i rozwiązań prawnych wprowadzonych przez Unię Europejską.

W badaniach Cebulskiej i in., (2012) metodą biologiczną oznaczano zawartość dioksyn i furanów w mleku i produktach mlecznych, mleko w proszku pełne i odtłuszczone, sery oraz masło. Konkluzją prowadzonych badań było stwierdzenie, że dioksyny, furany i dl-PCB występowały w stężeniach niskich, nieprzekraczających dopuszczalnych limitów określonych w Rozporządzeniu Komisji Europejskiej (nr 1259/2011) (limit dla sumy PCDD i PCDF wynosi 3 pg WHO-TEQ/g tłuszczu, limit dla sumy PCDD, PCDF i dl-PCB - 6 pg WHO-TEQ/g tłuszczu). Spośród 218 badanych próbek zdecydowana większość (198) zawierała poziom dioksyn poniżej 50% dopuszczalnego limitu. Piskorska-Pliszczyńska i in. (2015) badając zawartość dioksyn w powszechnie wykorzystywanym produkcie spożywczym, jakim jest jajo, jak również określając wpływ systemu chowu kur niosek, od których pozyskiwano jaja stwierdzili, że najniższy poziom dioksyn występował w jajach pochodzących kolejno od niosek z chowu przemysłowego, z systemu ściółkowego i klatkowego. Najwyższy poziom dioksyn stwierdzono w jajach pochodzących od kur niosek z wolnego wybiegu i chowu ekologicznego, u których stężenie dioksyn było dwukrotnie wyższe niż w jajach z chowu przemysłowego. Autorzy stwierdzili, że takie różnice zawartości dioksyn mogą wynikać z różnic narażenia na te związki w różnych systemach chowu niosek. Kury z wolnego wybiegu, oprócz dostarczanej paszy, mogącej być źródłem dioksyn, uzupełniają ją poprzez zjadanie bezkręgowców,

jak i pasz zielonych ze skażonej gleby. Nioski w chowie przemysłowym mogą jedynie pobierać dawki dioksyn z paszy. W związku z tym, iż surowce paszowe podawane zwierzętom mogą zawierać znaczne ilości dioksyn stąd istnieje potrzeba kontroli ich stężenia. Całkowita eliminacja dioksyn z racji ich wysokiej trwałości z surowców paszowych nie jest możliwa, ale istotna jest ich redukcja do minimum oraz przestrzeganie norm w zakresie ich zawartości, co zapewni również bezpieczeństwo produktów żywnościowych uzyskiwanych od zwierząt. Jak wskazują Piskorska-Pliszczyńska i Małagocki (2013) bardziej narażone na skażenie dioksynami są produkty pochodzące od przeżuwaczy niż produkty drobiowe czy mięso wieprzowe z racji tego, że w ich diecie dominują pasze objętościowe. W przypadku drobiu i trzody chlewnej krótszy czas chowu i żywienia paszą ma również wpływ na niższą zawartość dioksyn w ich mięsie.

5. Podsumowanie

Zboża stanowią ważny surowiec do produkcji wyrobów spożywczych oraz produkcji pasz. Uzasadnione jest, więc stałe kontrolowanie zawartości w ziarnie dioksyn. Ponieważ partie zbóż uprawiane na różnych obszarach kraju, o większym i mniejszym stopniu uprzemysłowienia są w różnym stopniu narażone na skażenie dioksynami. Konieczny jest, więc stały monitoring zawartości dioksyn w ziarnach zbóż konsumpcyjnych i paszowych, co jest jedną z w głównych metod prewencyjnych ochrony zdrowia publicznego.

6. Literatura

- Ahlborg U.G., Brouwer A., Fingerhut M.A. (1992) Impact of polychlorinated dibenzo-p-dioxins, dibenzofurans and biphenyls on human and environmental health, with special emphasis on application of the toxic equivalency factor concept. *Europ. J. Pharmacol.: Environ. Toxicol. Pharmacol.* 228: 179-199.
- Beard A.P., Bartlewski P.M., Chandolia R.K i in. (1999) Reproductive and endocrine function in rams exposed to the organochlorine pesticides lindane and pentachlorophenol from conception. *J. Reprod. Fertil.* 115: 303-314.
- Biernacki B., Bulenger K., Woźniak A. i in. (2015) Czynniki antropogeniczne a układ endokryny. *Życie Weterynaryjne*; 90(11): 720-724.
- Birnbaum L. S. (1994) The mechanism of dioxin toxicity: relationship to risk assessment. *Environ. Health Perspect.*, 102 (Suppl 9): 157-167.
- Brandt, E., Pietrzak-Fiecko, R., Smoczyński, S. S. (2012) Polichlorowane bifenyle we frakcjach ziaren pszenicy różnych odmian oraz w wybranym pieczywie. *Roczniki Państwowego Zakładu Higieny*, 63(1): 31 – 36.
- Całkosiński I., Borodulin-Nadzieja L., Stańda M. i in. (2003) Influence of a single dose of TCDD on estrogen levels and reproduction in female rats. *Med. Wet.*;59(6): 536-538.
- Całkosiński I., Borodulin-Nadzieja L., Wasilewska U., i in. (2004) Wpływ dioksyn na procesy rozrodcze u szczurów w badaniach in vivo. *Adv. Clin. Exp. Med.* 13:885-890.
- Cebulska J., Gembal M., Furga B. i in. (2012) Zawartość dioksyn w mleku i produktach mlecznych oznaczona biologiczną metodą przesiewową. *Proceedings of ECOpole.*;6(2): 695-699.
- Cebulska J., Gembal M., Małagocki P. i in. (2012) Poziomy dioksyn, furanów i dioksynopodobnych PCB w materiałach paszowych badanych w 2011 roku. *Pasze Przemysłowe* 1: 59-66.
- Colborn T., vom Saal F.S., Soto A.M (1993). Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environ. Health Perspect.*, 101: 378-384.
- Dudzińska M.R., Kozak Z. (2001) Polichlorowane dibenzo (p) dioksyny i dibenzofurany — właściwości i oddziaływanie na środowisko. Wydawnictwo Politechniki Lubelskiej, Lublin.
- Korol W., Matyka S., (2000) Dioksyny- ryzyko zanieczyszczenie produktów przemysłu paszowego i możliwości przeciwdziałania, *Biul. Nauk. Przem. Pasz.* vol. XXXIX, no 4: 5-14.
- Makles Z., Świątkowski A., Grybowska S. (2001) Niebezpieczne dioksyny. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa: 39-41.
- Mocarelli P., Gerthoux P.M., Needham L.L. (2011) Perinatal exposure to low doses of dioxin can permanently impair human semen quality. *Environ. Health Perspect.* ;5: 713-718.

- Piskorska-Pliszczynska J. (1999) Dioksyny i związane z nimi zagrożenia zdrowia. *Med. Weter.*;55: 491–496.
- Piskorska-Pliszczynska J. (2011) Dioksyny powracający problem. *Pasze Przemysłowe*, 1:19-26.
- Piskorska-Pliszczynska J., Małagocki P. (2013) Dioksyny w paszach i ich wpływ na toksyczność żywności. *Pasze przemysłowe* 2: 8-17.
- Piskorska-Pliszczynska J., Struciński P., Mikołajczyk S. i in. (2015) Dioxins, furans, and polychlorinated biphenyls in hen eggs – a new source of hazard for consumers? . *Bull Vet Inst Pulawy* 59: 519-526.
- Piskorska-Pliszczynska J., Warenik-Bany M. (2013) Strategia Unii Europejskiej w zakresie rozwiązywania problemu dioksyn w żywności. *Med. Weter.*, 69 (2): 85-90.
- Rozzko M., Jędrzejczak R., Szymczyk K. (2014). Polychlorinated biphenyls (PCBs), polychlorinated diphenyl ethers (PBDEs) and organochlorine pesticides in selected cereals available on the Polish retail market. *Science of the Total Environment*, 466:136-151.
- Rozzko, M., Szymczyk, K., (2010) Oznaczanie wskaźnikowych i dioksynopodobnych polichlorowanych bifenyli w ziarnie wybranych zbóż i produktach zbożowych. *Roczniki Państwowego Zakładu Higieny*, 61(4):355-360.
- Schechter A., Birnbaum L., Ryan J.J. i in (2006) Dioxins: An overview. *Environ. Res.* 101: 419–428.
- Słowińska M., Koter-Michalak M., Bukowska B. (2011) Wpływ dioksyn na organizm człowieka – badanie epidemiologiczne. *Medycyna Pracy*;62(6): 643–652.
- Sokołowski M. (1994) Dioksyny ocena zagrożeń środowiska naturalnego oraz metody ich wykrywania. *Biblioteka monitoring środowiska*, Warszawa.
- Struciński P., Ludwicki J.K., Góralczyk K., i in. (2000) Wybrane aspekty działania ksenoestrogenów z grupy persystentnych związków chloroorganicznych. *Roczn. PZH* 51: 211–228.
- Struciński P., Piskorska-Pliszczynska J., Góralczyk K. i in. (2011) Dioksyny a bezpieczeństwo żywności. *Roczn. PZH*, 62, Nr 1: 3 – 17.
- Struciński P., Piskorska-Pliszczynska J., Góralczyk K. i in. (2011) Dioksyny a bezpieczeństwo żywności. *Roczn. PZH*, 62, Nr 1: 3 – 17.
- Tlustos C. (2009) The dioxin contamination incident in Ireland 2008. *Organohalogen Compounds*, 71: 1155-1159.
- Tsai P.C., Ko Y.C., Huang W., Liu H.S. i in. (2007) Increased liver and lupus mortalities in 24-year follow-up of the Taiwanese people highly exposed to polychlorinated biphenyls and dibenzofurans. *Sci. Total Environ.* 374: 216–222.
- Van der Bergh M., Birnbaum L.S., Denison M. i in. (2006) The 2005 World Health Organization reevaluation of human and mammalian toxic equivalency factors for dioxins and dioxin-like compounds. *Toxicol.Sci.*, 93: 223-241.
- Weisglas-Kuperus N. (1998) Neurodevelopmental, immunological and endocrinological indices of prenatal human exposure to PCBs and dioxins, *Chemosphere* 37: 1845-1853.
- Wyżykowska B., Falandysz J., Hanari J. i in (2006) Dioksyny w glebach rolniczych w Polsce. *Roczniki Państwowego Zakładu Higieny*, 57(4): 361-370.

16. Uprawa i wykorzystanie żyta

Cultivation and use of rye

Marcin Różewicz

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

Opiekun naukowy: Jerzy Grabiński

Marcin Różewicz: mrozewicz@iung.pulawy.pl

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

Streszczenie

W pracy przedstawiono znaczenie żyta i jego udział w strukturze uprawy zbóż oraz możliwości zagospodarowania surowca jakim jest jego ziarno. Opisano znaczenie tego gatunku zboża jakie ma ono w produkcji żywności dla ludzi, przemyśle gorzelniczym, pasz dla zwierząt oraz nowy kierunek jakim jest energetyczne wykorzystanie ziarna żyta.

1. Wstęp

Żyto ozime jest zbożem, które uważane jest za najlepiej dostosowane do warunków klimatycznych panujących w Polsce. Ma wysoki stopień zimotrwałości i stosunkowo niskie wymagania glebowe. Do atutów zachęcających do jego uprawy zalicza się także odporność na okresowe niedobory wody. Uzyskuje się wysoki plon ziarna, które może zostać wykorzystane na różne cele. Żyto uznawane jest jako jedno z podstawowych zbóż, które odgrywa bardzo istotną rolę gospodarczą na terenach o słabszych glebach i ostrzejszym klimacie, a więc tam, gdzie uprawa pszenicy jest mało efektywna lub niemożliwa. Jest to gatunkiem zboża chętnie uprawianym, a jego powierzchnia uprawy w roku 2017 wynosiła 873,2 tys. ha (GUS 2017). Postęp biologiczny w postaci nowych odmian, jak również unowocześnienie agrotechniki spowodowały wzrost plonów tego gatunku zboża (Dworakowski i in. 2018). Obserwuje się jednak tendencję spadkową powierzchni uprawy żyta względem lat 80-tych i 90-tych. Mimo regresu areału uprawy zarówno w skali kraju jak i globalnej, Polska pozostaje wciąż jednym z liderów w Europie pod względem areału uprawy i pozyskania ziarna żyta. Stała jego podaż na rynku jest źródłem surowca do zagospodarowania. Jest ono wykorzystywane na cele spożywcze, w tym głównie na przemiał mąki i wypiek chleba, ale także jako komponent paszowy mieszanek dla zwierząt. W ostatnim czasie poszukuje się także alternatywnych sposobów jego wykorzystania. Po akcesji Polski do Unii Europejskiej, nasz kraj stał się eksporterem netto produktów zbożowych. Wyniki handlu wskazują, że jesteśmy konkurencyjni na wspólnym rynku zbóż (głównie żyta) i produktów wtórnego przetwórstwa (Urban 2006). W pracy o charakterze przeglądowym zaprezentowano najnowsze dane dotyczące możliwości i kierunków wykorzystania ziarna żyta z krajowej uprawy.

2. Charakterystyka wymagań uprawowych żyta

Żyto należy do zbóż o znacznie niższych wymaganiach glebowych, jest chętnie uprawiane na całym obszarze naszego kraju. Dzięki temu wykorzystać można potencjał produkcyjny gleb o niższych klasach bonitacyjnych, ale jednocześnie wysiane na żyzniejszych glebach daje wyższe uzyskanie plonu. Uprawa żyta może być prowadzona również na glebach kompleksu żytanego - od bardzo dobrego do bardzo słabego. Najwyższe plony uzyskać można uprawiając żyto na glebach kompleksu pszennego dobrego. Żyto charakteryzuje się dużą tolerancją na zakwaszenie gleby. Ma dobrze rozwinięty system korzeniowy. Uprawiane na glebach lekkich i przepuszczalnych, gdzie występuje szybka retencja i ubytek wody osiąga wyższy plon niż inne gatunki zbóż na tym stanowisku. Jakość gleby ma pośredni wpływ na plonowanie żyta, większe znaczenie mają warunki klimatyczne. W zależności od ilości opadów uzyskuje się różne plony na odmiennych stanowiskach.

W czasie suchego lata najwyższe plony osiąga się na glebach kompleksu pszennego jednak w latach wilgotnych na glebach kompleksu żytniego.

Żyto charakteryzuje się małymi wymaganiami cieplnymi oraz szybkim wzrostem po rozpoczęciu wegetacji, dzięki czemu w mniejszym stopniu zagrażają mu rozwijające się chwasty. Optymalna temperatura dla żyta w okresie od siewu do wschodów wynosi 10-13° C, natomiast w okresie jesiennej wegetacji 7-8°C. Systematyczny spadek temperatury rozłożony w dłuższym okresie czasu sprzyja zahartowaniu roślin i zimowaniu. Żyto charakteryzuje się dużą wytrzymałością w stosunku do niskich temperatur w okresie zimowym i dobrze znosi mrozy, zwłaszcza przy występowaniu okrywy śnieżnej. Niskie wymagania temperaturowe sprawiają, że roślina wcześniej rozpoczyna wegetację wiosenną. Dzięki temu maksymalnie wykorzystuje zmagazynowaną wodę w glebie i jest odporna na jej niedobory w czasie wiosny. Niska temperatura w fazie strzelania w źdźbło - ok. 6°C - zapewnia wyższe plonowanie żyta. Dobrym przedplonem dla żyta są nawożone obornikiem wczesne odmiany ziemniaka, warzywa okopowe, jare mieszanki strączkowo-zbożowe na zielonkę oraz rośliny strączkowe. Gorsze plonowanie uzyskuje się uprawiając żyto po mieszankach strączkowo-zbożowych na nasiona oraz po owsie. Zdecydowanie złym przedplonem natomiast są pszenica, żyto, jęczmień i pszenżyto. Uprawa w monokulturze powoduje spadek plonów o ok. 10%, przy kilkukrotnej uprawie są one niższe o 20%. Odpowiednie dawki nawozów jednak pozwalają na zmniejszenie niekorzystnego efektu monokultury. Ze wszystkich uprawianych gatunków, żyto jednak jest najbardziej predysponowane do uprawy w monokulturze (Sadowski i Rychcik 2010; 2007)

3. Spożywcze wykorzystanie żyta

Ziarno żyta stanowi ważny surowiec przetwórczy, wykorzystywany głównie do produkcji maki i wypieku pieczywa, ale także przerabia na płatki zbożowe. Produkty wytwarzane z ziarna żyta wprowadzają do diety człowieka wiele cennych substancji odżywczych o prozdrowotnym działaniu. Potwierdzają to wyniki prowadzonych badań naukowych (Nordlund i in. 2013; Buksa i in. 2012). Należą do nich: błonnik pokarmowy, substancje mineralne, przeciwutleniacze, witaminy, fitoestrogeny i polifenole (Gani i in. 2012). Najczęściej spożywanym produktem, jednocześnie będącym źródłem tych cennych substancji jest pieczywo żytnie (Björk i in. 2012) Ziarno żyta zawiera w swoim składzie wartościowe pod względem biologicznym białko, które zawiera w swoim składzie aminokwasy egzogenne, głównie lizynę. Mąka żytnia podobnie jak ziarno cechuje się wysoką wartością odżywczą, która zależy od rozdrobnienia i oczyszczenia ziarna z okrywy owocowo-nasiennej. Mąka żytnia z pełnego przemiału stanowi źródło błonnika, przewyższając pod tym względem mąkę pszenną. Cechuje ją wyższą zawartością okrywy owocowo-nasiennej i warstwy aleuronowej, a także zawierają więcej białka, witamin (zwłaszcza z grupy B) i składników mineralnych (żelaza, fosforu i magnezu). Błonnik uznawany jest również za ważny składnik diety. Jego zawartość w ziarnie żyta uzależniona jest od sposobu uprawy (Łysoń i Biel 2016). We frakcji błonnika dominują pentozany (arabinoksylany) i beta-glukany, które w przypadku żywienia człowieka mają korzystne działanie w przeciwieństwie do wykorzystania w żywieniu zwierząt. Żyto o dużej zawartości arabinoksylanów oraz wyprodukowana z niego mąka zawierają znaczne ilości tokoferoli (pochodne witaminy E). Mąka żytnia z pełnego przemiału wykorzystywana jest do wypieku pieczywa razowego, które zawiera podwyższoną zawartość substancji prozdrowotnych (Szawara-Nowak 2013). Innym ważnym kryterium, którym kierują się konsumenci podczas wyboru produktów spożywczych jest ich kaloryczność, która w przypadku żyta jest najniższa w stosunku do innych zbóż. Ponadto, w procesie fermentacji kwasowej, której poddawane jest ciasto żytnie, zostają uwolnione większe ilości wapnia niż w przypadku ciasta pszennego (Litwinek i in. 2015). Pieczywo żytnie znacznie dłużej zachowuje świeżość i przydatność konsumpcyjną (Tomilo i in. 2013).

Poza stricte spożywczym wykorzystaniem ziarna żyta, może być ono wykorzystywane w przemyśle gorzelnicznym. Obecnie ponad 70% produkowanego przez krajowe gorzelnie spirytusu otrzymywane jest z żyta (Pietruszka i Szopa 2014). Ziarno żyta charakteryzuje się wysoką zawartością węglowodanów, z czego skrobia stanowi około 60 %. Umożliwia to uzyskanie wysokiej wydajności i efektywności w procesie produkcji alkoholu (Wang i in. 1997). Spirytus produkowany na bazie surowca jakim jest ziarno żyta, charakteryzuje się bardzo dobrą jakością. Zawiera niewielką ilość niepożądanych związków jakimi są aldehydy (średnio 0,07g/dm³). Ostateczna jakość produktu

finalnego uzależniona jest jednak od jakości ziarna. Jeśli ma ono niską jakość, jest porośnięte lub porażone grzybami pleśniowym, uzyskany spirytus surowy zawiera ponadnormatywne ilości aldehydów i kwasów organicznych (Stanisz i in. 2009).

4. Wykorzystanie na cele paszowe

Zapotrzebowanie na energetyczne surowce paszowe pokrywane jest z krajowej produkcji zbóż (Jaśkiewicz i Sułek 2017). Ziarna zbóż stanowią więc podstawowy komponent mieszanek pełnoporcjowych dla różnych grup zwierząt. Spośród uprawianych najczęściej gatunków, żyto odznacza się najniższą ceną netto za 1 tonę. Relacja ceny giełdowej netto w Polsce jest znacznie korzystniejsza dla żyta, gdyż koszt 1 tony stanowi jedynie 73 proc. ceny pszenicy. W przypadku relacji cen pomiędzy żytem, a pszenżytem koszt netto zakupu 1 tony żyta stanowi około 81 % wartości 1 tony pszenżyta. W związku z tym uzasadnione ekonomicznie jest wykorzystanie ziarna żyta na cele paszowe. Posiada ono korzystniejszy skład aminokwasowy białka, co przekłada się na wyższą wartość pokarmową żyta. Jest ona jednak niższa w porównaniu do innych zbóż, zwłaszcza jeśli chodzi o żywienie młodych kurcząt brojlerów (Lázaro i in. 2003; Silva i Smithard 2002). Negatywnym aspektem jest wysoka zawartość polisacharydów nieskrobiowych, co powoduje zmniejszenie tempa wzrostu i pogorszenie wykorzystania paszy u kurcząt brojlerów, a niekiedy stany niedoborowe witamin i mikroelementów poprzez zmniejszenie ich przyswajalności oraz zwiększoną lepkość odchodów. Wszystkie objawy można obserwować głównie w pierwszym okresie odchovu kurcząt otrzymujących w paszy zwiększony poziom śrutu żytniej z powodu zawartości pentozanów. Ich poziom zbliżony jest do pszenicy, natomiast ilość β -glukanów jest znacznie niższa, niż w jęczmieniu. W ziarnie żyta stwierdza się wyższą zawartość inhibitorów trypsyny, których antyodżywcze działanie polega na tworzeniu nieaktywnych kompleksów z enzymami trawiennymi, co wpływa na ograniczenie wykorzystania białka przez organizm i prowadzi w efekcie do zahamowania wzrostu młodych zwierząt. Ogranicza to szersze zastosowanie paszowe tego zboża (Urban 2015). Nowsze odmiany żyta zawierają niższy poziom tych związków porównywalny do jego zawartości w pszenżycie. Substancjami antyodżywczyymi są także zawarte w życie taniny, należące do garbników. Tworzą z białkami trwałe połączenia utrudniające ich trawienie i wykorzystanie przez organizmy zwierząt. Zaletą żyta jest jednak większy stopień odporności na porażenie przez grzyby i zanieczyszczenie mikotoksynami (Tyburcy 2005). W mniejszym stopniu dotyczy go również zagrożenie ze strony buławinki czerwonej (*Claviceps purpurea*) nazywanej sporyszem, której zarodniki znajdujące się na ziarniakach stanowiły przyczynę zatruc u ludzi i zwierząt.

Ziarno żyta może być stosowane w żywieniu kur niosek, gdyż w prowadzonych badaniach nad możliwością wykorzystania w recepturach tego surowca jako substytutu drożdziej kukurydzy i pszenicy w ilości 20-40% nie wpłynęło negatywnie jak masę i jakość jaj (Grabiński i in. 2007). Wykorzystanie ziarna żyta w paszy dla młodych zwierząt monogastycznych, głównie dla trzody chlewnej jest utrudnione. Jednak zastosowanie preparatów enzymatycznych w paszy umożliwia zastosowanie tego ziarna jako komponentu w paszy, jak również zwiększenie jego poziomu. U starszych zwierząt możliwe jest jednak efektywniejsze jego zastosowanie bez pogorszenia wyników tuczu w ilości 30-60% udziału w paszy. Ziarno żyta stosowane jest także jako pasza treściwa dla przeżuwaczy (bydła, owiec, kóz). Stosuje się je w postaci ześrutowanej dodając do pasz w różnych systemach żywienia zwierząt. Dodatek ziarna żyta podnosi wartość energetyczną paszy i sprzyja wyższej mleczności. Może stanowić do 40% udziału w mieszance. Jednocześnie jako szeroko dostępny na rynku i znacznie tańszy surowiec w stosunku do pozostałych gatunków zbóż wpływa na lepsze wskaźniki ekonomiczne produkcji mleka. W przypadku bydła opasowego ziarno żyta może mieć większy udział do nawet 60% w dawce. Żyto może także w pewnym stopniu zastępować owies w dawce paszowej dla koni. Jego znaczny udział powoduje jednak konsekwencje w postaci występowania kolek przez co nie może być stosowane w żywieniu kłaczy żrebnych i młodzięży, ponieważ powoduje zaparcia oraz kolki. Po uprzednim przyzwyczajeniu można koniom roboczym podawać 3-6 kg żyta w postaci zwilżonej śrutu z sieżką lub całego ziarna uprzednio moczonego.

5. Energetyczne wykorzystanie żyta

Polityka Unii Europejskiej nakłada na kraje członkowskie obowiązek wykorzystania do celów energetycznych surowców pochodzących ze źródeł odnawialnych. W polskich warunkach klimatycznych i gospodarczych większego znaczenia nabierają surowce pochodzenia roślinnego. Nowym trendem obecnie obserwowanym jest wykorzystanie ziarna zbóż na cele energetyczne - produkcję bioetanolu. Przewidywany wzrost popytu na biopaliwa będzie czynnikiem dalszego wzrostu przetwórstwa zbóż na cele przemysłowe. Przerób zbóż na ten cel może się zwiększyć z ok. 5-6% do ponad 10% całkowitych zasobów zbóż w Polsce (Urban 2006). W tym kontekście ziarno żyta niespełniające wymagań jakościowych do przetwórstwa młynarskiego i piekarniczego oraz paszowego może zostać wykorzystane na cele energetyczne. Dotyczy to ziarna niskiej jakości, w dużym stopniu porażonego przez choroby grzybowe i zanieczyszczonego mikotoksynami. Ziarno to stanowi jednak cenny surowiec do produkcji bioetanolu (Burczyk 2011). Jest on pozyskiwany z rolniczych surowców odnawialnych, a następnie stosowany jako dodatek do paliw. Produkcja bioetanolu ze zboża pociąga za sobą korzyści z uzyskania produktów odpadowych, które mogą być ponownie wykorzystane. W procesie produkcji bioetanolu powstają produkty uboczne - suszone gorzelniki ziaren (ang. DDGS) coraz częściej stosowane jako substytuty poekstrakcyjnej śrutu sojowej. Odmiany hybrydowe żyta ozimego, które dostarczają znacznych ilości biomasy zarówno świeżej, jak i suchej mogą zostać wykorzystane do produkcji biogazu (Piechota i in. 2017). Biogaz uzyskiwany z żyta nie stanowi raczej konkurencji dla biogazu z rzepaku ozimego ze względu na większą efektywność energetyczną rzepaku – rzędu $43,1 \text{ GJ} \cdot \text{ha}^{-1}$ (Bielski i in. 2014).

Słoma może być przeznaczana na cele energetyczne jedynie w przypadku, kiedy zaspokojone jest zapotrzebowanie w rolnictwie, przy produkcji zwierzęcej (pasza i ściółka) oraz na cele nawozowe, aby zachować zrównoważony bilans substancji organicznej w glebie. Bardziej wartościowa z punktu widzenia jej energetycznego wykorzystania jest podsuszona słoma. Zawiera ona mniejszą ilość wilgoci oraz związków chloru, które niekorzystnie wpływają na trwałość urządzeń wykorzystywanych do jej spalania. Ponadto wartość opałowa słomy suchej jest o kilka MJ wyższa niż świeżej i wynosi ok. 14-15 MJ/kg. Przesuszona słoma jest zbierana z pola przy wykorzystaniu pras o różnym stopniu zgniotu. Może być ona spalana w kotłach wsadowych lub automatycznych.

6. Podsumowanie

Żyto ozime jest zbożem o niskich wymaganiach glebowych, co przy dużym udziale gleb o niskiej bonitacji jest czynnikiem predysponującym ten gatunek do uprawy w naszym kraju. Atutem ziarna żyta jest także możliwość wielokierunkowego wykorzystania tego surowca, zarówno ma cele piekarnicze, paszowe jak również energetyczne. Ziarno tego gatunku posiada cechuje się znaczną zawartością wielu substancji prozdrowotnych. Pomimo spadku spożycia pieczywa ogółem, pieczywo żytnie razowe cieszy się coraz większym zainteresowaniem. Jako surowiec paszowy, mimo pewnych ograniczeń, spowodowanych zawartością substancji antyodżywczych ziarno żyta może być stosowane jako komponent pasz dla różnych grup zwierząt gospodarskich. Jego atutem jest dostępność ziarna z krajowej uprawy, jego stała podaż i niska cena. Przekłada się to na wymierne korzyści ekonomiczne, poprzez obniżenie kosztów jednostkowych paszy. Ziarno niespełniające wymogów jakościowych może zostać przeznaczone na cele energetyczne, podobnie jak nadmiar słomy.

7. Literatura

- Bielski S, Jankowski K, Budzyński W (2014) The energy efficiency of oil seed crops production and their biomass conversion into liquid fuels. *Przem. Chem.*, 93(12): 2270–2273.
- Björk I, Östman E, Kristensen M i in. (2012) Cereal grains for nutrition and health benefits: Overview of results from in-vitro animal and human studies in the health grain project. *Trends Food Sci. Technol.*, 25: 87-100.

- Buksa K, Nowotna A, Gambuś H (2012) Analiza towaroznawcza i skład chemiczny ziarna wybranych polskich odmian żyta pochodzących z trzech kolejnych lat uprawy. *Acta Agrophysica*, 19 (2): 265-276.
- Burczyk H (2011) Przydatność zbóż na potrzeby produkcji energii odnawialnej – w świetle wyników doświadczeń. *Problemy Inżynierii Rolniczej*, 3: 43-51.
- Dworakowski T, Kuźmicki J, Zawojski K (2018) Plonowanie zbóż w latach 1960-2009 w doświadczeniach oraz warunkach produkcyjnych w województwie podlaskim. *Wyd. Centrum Doradztwa Rolniczego w Brwinowie Oddział w Poznaniu*, 9: 103-114.
- Gani A, Wani SM, Masoodi FA i in. (2012) Whole-grain cereal bioactive compounds and their health benefits: A review. *J. Food. Proces. Technol.* 3: 146-56.
- Grabiński J, Hołubowicz-Kliza G, Brzóska F (2007) Uprawa i wykorzystanie żyta ozimego. *Instrukcja Upowszechnieniowa IUNG-PIB Puławy*, 138: 1-80.
- GUS (2017) Użytkowanie gruntów i powierzchnia zasiewów w 2017 r.
- Jaśkiewicz B, Sułek A (2017) Kierunki zmian produkcji zbóż w Polsce. *Roczniki Naukowe Stowarzyszenia Ekonomistów Rolnictwa i Agrobiznesu*, 19(1): 66-73.
- Lázaro R, Garcia M, Medel P i in. (2003) Influence of enzymes on performance and digestive parameters of broilers fed rye-based diets. *Poult. Sci.*, 82: 132-140.
- Litwinek D, Gambuś H, Sabat R i in. (2015) Porównanie jakości i wartości odżywczej mąki żytniej, pszennej i orkiszowej z pełnego przemiału. *Technologiczne kształtowanie jakości żywności*. Red. KM Wójciak, ZJ Dolatowski. *Wyd. Nauk. PTTŻ, Kraków* :171-180.
- Łysoń E, Biel W (2016) Ocena składu chemicznego ziarna wybranych odmian żyta z uprawy ekologicznej i konwencjonalnej. *Żywn. Nauka Technol. Jakość*, 23(3): 91 – 101.
- Nordlund E, Heiniö RL, Viljaen K i in. (2013) Flavour and stability of rye grain fractions in relation to their chemical composition. *Food Rev. Int.*, 54: 48-56.
- Piechota T, Sawińska Z, Kowalski M i in. (2017) Plonowanie i zdrowotność wybranych odmian żyta ozimego uprawianego przeznaczeniem na biogaz. *Fragm. Agron.* 34(2): 67–74.
- Pietruszka M, Szopa J (2014) Agricultural Distillates from Polish Varieties of Rye. *Czech J. Food Sci.*, 32(4): 406–411.
- Sadowski T, Rychcik B (2007) Porównanie efektów chemicznej i mechanicznej regulacji zachwaszczenia żyta ozimego. *Post. Ochr. Rośl.* 47(3): 254–257.
- Sadowski T, Rychcik B (2010) Plonowanie i wybrane cechy jakościowe żyta ozimego w okresie przestawiania jego uprawy na system ekologiczny. *Annales UMCS, sec. E, Agricultura*, 65(2): 91–99.
- Silva SP, Smithard RR (2002) Effect of enzyme supplementation of a rye-based diet on xylanase activity in the small intestine of broilers, on intestinal crypt proliferation and nutrient digestibility and growth performance of the birds. *Br. Poult. Sci.* 43: 274-282.
- Stanisz M, Sapińska E, Pielech-Przybylska K (2009) Charakterystyka zanieczyszczeń występujących w spirytusach surowych. *Zeszyty Naukowe Chemia Spożywcza i Biotechnologia*, 1058:105–121.
- Szawara-Nowak G (2013) Bioaktywne składniki pieczywa. *Towarozn. Probl. Jakości*, 3: 103–115.
- Tomoło J, Dziki D, Różyło R (2013) Zmiany tekstury pieczywa żytniego podczas przechowywania. *Czas. Naukowo-Kulturalne*, 2: 143-154.
- Tyburcy A (2005) Możliwość większego wykorzystania żyta w produkcji pasz. *Przegląd Zbożowo-Młynarski*, 2:8-9.
- Urban R (2006) Stan głównych działów gospodarki żywnościowej po wejściu Polski do Unii Europejskiej Sektor zbożowy, mięsny i napojów. *Instytutu Ekonomiki Rolnictwa i Gospodarki Żywnościowej – Państwowy Instytutu Badawczy*, 25: 57-66.
- Urban S (2015) Zmiany w produkcji pasz treściwych w Polsce. *Rocz. Nauk. Stow. Ekon. Agrobiz.*, 17(5): 307–311.
- Wang S, Thomas KC, Ingledew WM i in. (1997) Sosulski Rye and triticale as feedstock for fuel ethanol *Cereal Chem.*, 74: 621-625.

17. Zastosowanie obrazowania spektrometrii mas w badaniach metabolitów roślinnych

The use of mass spectrometry imaging in plant metabolites studies

Suśniak Katarzyna⁽¹⁾, Krysa Mikołaj⁽¹⁾, Kidaj Dominika⁽¹⁾, Komaniecka Iwona⁽¹⁾, Sroka-Bartnicka Anna^(1, 2)

⁽¹⁾Zakład Genetyki i Mikrobiologii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej

⁽²⁾Zakład Biofarmacji, Katedra Chemii, Uniwersytet Medyczny w Lublinie
Opiekun naukowy: Iwona Komaniecka, Anna Sroka-Bartnicka

Suśniak Katarzyna: kasiasusniak@gmail.com

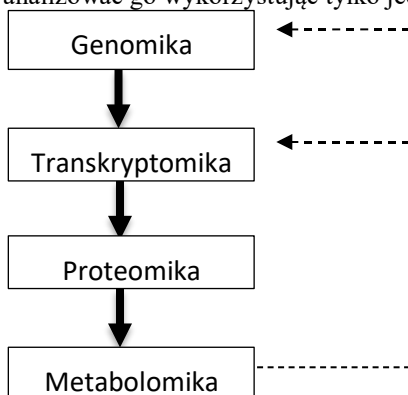
Słowa kluczowe: MALDI-MSI, matryca, metabolomika, tkanka roślinna

Streszczenie

Większość technik stosowanych do badania małych cząsteczek, takich jak leki i środki farmaceutyczne lub endogenne metabolity, wymaga wyizolowania ich z tkanek. Te z kolei trzeba poddać homogenizacji, a poszukiwane związki należy wyekstrahować. Takie podejście może potencjalnie powodować zafałszowania w badanych szlakach metabolicznych. Obrazowanie za pomocą spektrometrii mas (Mass Spectrometry Imaging MSI) to potężne narzędzie analityczne, które może dostarczyć informacji o analitach i ich rozmieszczeniu w nienaruszonych skrawkach tkanek biologicznych. Technika ta jest szeroko stosowana do badania różnych typów związków, w tym białek, peptydów, lipidów i małych cząsteczek, takich jak endogenne metabolity roślinne. Wykorzystanie techniki desorpcji laserowej i jonizacji wzmacnianej matrycą do obrazowania (MALDI-MSI) pozwala na jednoczesne wykrycie, ilościowe oszacowanie i uzyskanie przestrzennego rozkładu wielu metabolitów. Ważnymi etapami w tej metodzie są dobór odpowiedniej matrycy oraz sposób jej nanoszenia na badany preparat.

1. Wstęp

W biologii molekularnej termin – „om” odnosi się do badania globalnych zmian w genach i DNA organizmu (genom), białek (proteom), metabolitów (metabolom). „-Omika” obejmuje badania dużych, kompleksowych zestawów danych koncentrujących się na zmianach zachodzących w tych zestawach. Dlatego też roślinna „-omika” może być zdefiniowana jako holistyczne badanie jednego lub wielu „-omów” dotyczących roślin. Rysunek 1 przedstawia zależności pomiędzy różnymi klasami „-omiki”. Strategia multiomiki (połączenie genomiki, transkryptomiki, proteomiki, metabolomiki) może pozwolić na szerokie spojrzenie w złożony system roślinny, który mógłby zostać źle zinterpretowany, gdyby analizować go wykorzystując tylko jeden „-om”.



Rys.1. Zależności pomiędzy „-omikami” (strzałki pogrubione – produkcja, strzałki przerywane – regulacja), na podstawie Gemperline i in. 2016.

Praca ta skupia się na metabolomice, szeroko wykorzystywanej w badaniach biologicznych, których celem jest kompleksowe poznanie interakcji zachodzących w systemach biologicznych, w tym w roślinach. W dziedzinie tej poczyniono znaczne postępy dzięki wykorzystaniu innowacyjnych metod spektrometrii mas. Podjęto próby podsumowania obecnego stanu wykorzystania spektrometrii mas w badaniach roślinnej „-omiki”, podkreślając zwłaszcza techniki obrazowania metodą spektrometrii mas. Przedstawiona zostanie także prognoza dotycząca kierunku w jakim zmierza ta dziedzina. Celem pracy jest dostarczenie czytelnikom informacji, w jaki sposób można wykorzystać spektrometrię mas w badaniach metabolicznych roślin.

2. Metabolomika

Jako produkty końcowe różnych procesów biochemicznych katalizowanych przez enzymy, metabolity umożliwiają wgląd w biochemię organizmu w danym momencie życia.

Cząsteczki o wadze poniżej 1000 Da są klasyfikowane jako anality niskocząsteczkowe. Metabolity można podzielić na metabolity pierwotne, niezbędne do wzrostu i rozwoju rośliny oraz metabolity wtórne, a więc różnorodne związki produkowane przez rośliny, które nie są bezpośrednio niezbędne do wzrostu i rozwoju, ale mogą mieć określony wpływ na inne organizmy. Szczegółe znaczenie ma metabolomika roślinna, ponieważ rośliny wytwarzają wiele substancji odżywczych i witamin. Fakt ten jest wykorzystywany w inżynierii genetycznej roślin, której celem jest zwiększenie wydajności produkcji tych związków w jadalnych częściach rośliny. Stanowi to ważny obszar badań nad metabolomiką roślin (Okazaki i Saito 2012). Fakt, że obecności metabolitów nie można wywnioskować wprost z danych genetycznych, w przeciwieństwie do transkryptów i białek, stanowi wyzwanie dla badaczy tej dziedziny. W analizach metabolomicznych wykorzystuje się szereg technik analitycznych, w tym spektrometrię mas, która jest metodą selektywną i czułą, która obecnie powszechnie się stosuje w celu scharakteryzowania metabolitów obecnych w organizmie w danym momencie jego rozwoju (Lei i in. 2011). Informacje otrzymane w trakcie badań metabolomicznych nad roślinami mogą mieć ogromny wpływ na postęp badań nad poprawą reakcji roślin na stres, mogą zwiększyć wydajność rolnictwa i jakość żywności (Okazaki i Saito 2012). Na przykład Oms-Oliu wraz ze współpracownikami (2011) badał metabolity obecne w owocach pomidora przed, w trakcie i po dojrzewaniu. Analiza GC-MS ujawniła główne zmiany podczas procesu dojrzewania, takie jak wzrost poziomu glukozy, fruktozy, składników ścian komórkowych i aminokwasów. Ponadto metabolity, takie jak mannoza i cytryniany silnie wskazywały na przejrzały stan. Metabolomika może również dostarczyć informacji na temat reakcji rośliny na stres. Zhang i współpracownicy (2014) zastosowali kombinację transkryptomiki i metabolomiki do zbadania wpływu warunków suszy na

Medicago truncatula. Wiele tysięcy transkrypcji zmieniło się w odpowiedzi na suszę, a analiza GC-MS określiła zmiany w setkach metabolitów. Połączenie dwóch zestawów danych pomogło scharakteryzować regulację szlaków metabolicznych w warunkach suszy.

3. Obrazowanie spektrometrii mas (Mass Spectrometry Imaging MSI)

Jednym z ekscytujących nowych narzędzi w spektrometrii mas jest coraz szerzej stosowane obrazowanie spektrometrią mas (MSI) zwłaszcza w przypadku badań metabolomiki roślin. MSI pozwala na analizę molekularną próbki przy jednoczesnym zachowaniu informacji o rozkładzie przestrzennym w płaszczyźnie x,y różnych analitów w skrawku tkanki.

Istnieje szereg innych technik biologicznych pozwalających na wizualizację makromolekuł w różnych strukturach komórkowych (np. immunolokalizacja), których zasada działania opiera się na interakcjach między analitem i zewnętrzną sondą. Ich poprawne zastosowanie wymaga dogłębnej wiedzy badaczy na temat analizowanych związków. Metody te celują w większe cząsteczki, takie jak białka. MSI pozwala na analizę molekularną tkanki przy jednoczesnym zachowaniu informacji o rozkładzie przestrzennym różnych analitów w próbce bez wcześniejszej wiedzy o zawartości próbki (Gemperline i in. 2016).

W badaniach MSI wykorzystuje się wiele różnych typów analizatorów mas. Prawdopodobnie najczęstszym rodzajem analizatora używanym w MSI są analizatory TOF i TOF/TOF, w których wartość m/z jest wyznaczana przez czas potrzebny do przelotu jonów ze źródła

jonizacji przez tubę analizatora od detektora. Za pomocą tego typu instrumentów można sprawnie zidentyfikować szeroki zakres molekuł (teoretycznie nieograniczony), jednak dokładność masy i moc rozdzielcza są niskie w porównaniu do innych typów instrumentów (Gemperline i in. 2016). Spektrometry mas typu Orbitrap wykorzystujące transformację Fouriera zyskują coraz większą popularność w aplikacjach MSI. W tym spektrometrze wartości m/z są określane przez pomiar osiowej częstotliwości oscylacji jonów poruszających się w przód i w tył wzdłuż elektrody w kształcie wrzeciona (Marakov 2000). Podczas gdy analizator Orbitrap zapewnia doskonałą rozdzielczość i dokładność pomiaru masy, to wadami dostępnych urządzeń MALDI Orbitrap w porównaniu z instrumentami MALDI TOF są większe rozmiary wiązki lasera, wolniejsza szybkość akwizycji, a tym samym dłuższy czas analizy oraz ograniczony zakres masy.

W niektórych zastosowaniach MSI wykorzystywany jest także analizator mas oparty na zjawisku cyklotronowego rezonansu jonów. Rejestrowane wyniki poddaje się transformacji Fouriera, aby uzyskać typowy dla MS rozkład natężenia jonów od wartości m/z (FTICR). W tym typie analizatora, jony wzbudzone (przyspieszone) przez pole elektryczne są wprowadzane do obszaru z silnym polem magnetycznym, dzięki czemu wirują ze ściśle określoną częstotliwością, co generuje prąd wykrywany przez układ elektrod. Analizatory mas FTICR mogą zapewnić bardzo wysoką dokładność pomiaru mas, można w nich przeprowadzać analizy MS/MS i mogą wykrywać cząsteczki o wyższych masach w porównaniu do Orbitrap. Jednak, podobnie jak Orbitrap, czas analizy jest znacznie wydłużony (Gemperline i in. 2016).

4. MALDI – MSI

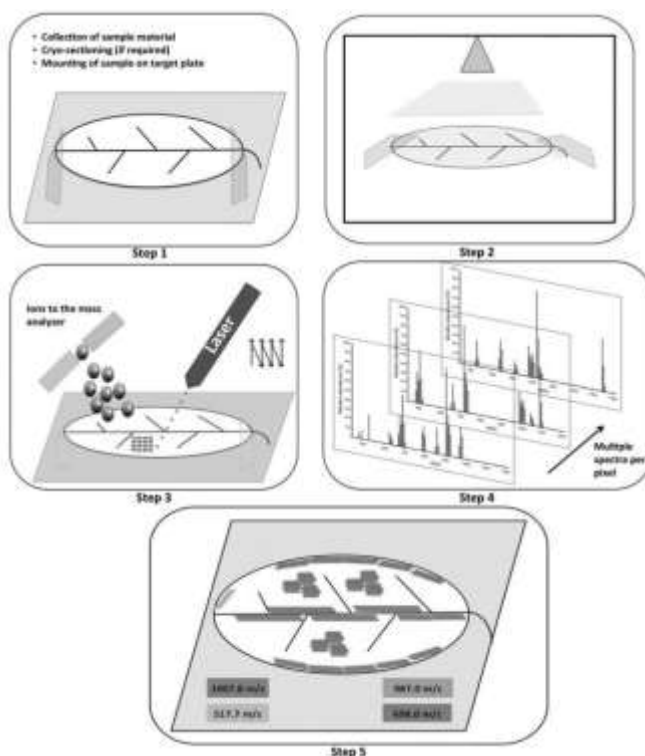
Technika obrazowania spektrometrii mas MALDI MSI (ang. Matrix Assisted Laser Desorption / Ionization Mass Spectrometry Imaging) jest najpopularniejszą techniką obrazowania MS. Technika ta pozwala zarówno na chemiczną analizę metabolitów jak również wizualizację ich dystrybucji (dzięki określeniu współrzędnych x, y wielu związków bezpośrednio w tkance roślinnej (Seaman i in. 2014). Zaletą tej metody jest prostota przygotowania próbki bez konieczności izolacji wytypowanych do analizy związków z fragmentów tkanki. Klasycznym podejściem w badaniach zmian poziomu metabolitów w tkankach roślinnych jest izolacja tych substancji i następnie analiza tych związków przy użyciu techniki chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas (GC/MS), chromatografii ciekłowej (HPLC) oraz chromatografii ciekłowej sprzężonej ze spektrometrią mas (LC-MS, LC-MS/MS). W przypadku użycia techniki LC-MS w eksperymentach proteomicznych łączonych jest wiele wycinków badanych tkanek, a następnie przeprowadzana jest ekstrakcja analitu. Konieczne tu są dodatkowe etapy trawienia trypsyną i odsalania preparatów. W badaniach MALDI-MSI pojedynczy skrawek tkanki jest osadzony w ośrodku stabilizującym, np. w żelatynie, umieszczony na szkiełku i pokrywany jest matrycą. Przy zastosowaniu techniki LC-MS ekstrakt tkankowy wstrzykuje się na kolumnę UPLC w celu rozdzielenia składników. Wyciek z kolumny analizuje się za pomocą spektrometru mas, uzyskując widma mas i chromatogram. W przypadku techniki MALDI-MSI szkiełko mikroskopowe wkłada się do spektrometru masowego, gdzie widma mas uzyskuje się systemie rastrowym na całej powierzchni tkanki, uzyskując szeroki wachlarz widm masowych, które są skoordynowane ze współrzędnymi w płaszczyźnie x i y (Gemperline i in. 2016).

Użycie czulej techniki obrazowania MALDI MSI pozwala na precyzyjną analizę metabolitów wytwarzanych pod wpływem różnych warunków stresowych. Co więcej, technika ta umożliwi obserwację dynamiki dyslokacji różnych metabolitów *in situ* w tkance roślinnej bez dodatkowych modyfikacji tych związków, a tym samym odzwierciedla fizjologiczne warunki w roślinie. Określenie obecności danych metabolitów w konkretnej lokalizacji w tkance roślinnej może być kluczowe w rozumieniu ich funkcji w organizmie.

Pierwsze badania roślinne przy użyciu obrazowania MALDI były przeprowadzone w celu analizy dystrybucji związków agrochemicznych w soi (*Glycine max*) (Mullen i in. 2005) oraz węglowodanów w pszenicy (*Triticum aestivum*) (Robinson i in. 2007). Późniejsze badania dotyczyły zastosowania tej techniki w analizie nasion ryżu (*Oryza sativa*) (Yoshimura i in. 2012), kwiatów i korzeni rzodkiewnika (rośliny modelowej *Arabidopsis thaliana*) (Jun i in. 2010) i nasion jęczmienia (*Hordeum vulgare*) (Peukert i in. 2012). Publikacje Sturtevanta i współpracowników oraz Heymana

i współpracowników z 2016 r. dotyczące analiz metabolitów *in situ* w tkankach roślinnych są doskonałym przykładem rozwoju możliwości i potencjalnego użycia MALDI MSI w metabolomice. Interesujące wyniki przedstawiają badania dotyczące alokacji pewnych związków w tkance roślinnej: glikozydów polifenoli zlokalizowanych w epidermie oraz lizofosfatydylocholiny i feofityny rozlokowanych przestrzennie w komórkach parenchymy, w tym w aktywnych fotosyntetycznie komórkach chlrenchymy (Heyman i in. 2016). Innym przykładem jest wizualizacja zmian fosfolipidów występująca podczas infekcji grzybowych w liściach, ponieważ następują one gwałtownie w odpowiedzi na atak patogenu, co jest przydatny markerem nabywania oporności (Gottwald i in. 2012).

Przykładowy schemat przygotowania próbki i wykonania analizy MALDI w celu zobrazowania rozmieszczenia przestrzennego szukanych metabolitów przedstawiono na rysunku 2.



Rys. 2. Schemat przygotowania próbki do obrazowania techniką MALDI MSI. Etap 1 – umieszczenie próbki na szkiełku mikroskopowym; Etap 2 - nałożenie matrycy MALDI na powierzchnię próbki; Etap 3 – wykonanie mapowania; Etap 4 – analiza danych; Etap 5 Wizualizacja i przetwarzanie uzyskanych danych MS (konkretne wartości m/z dla każdej współrzędnej x,y) w celu zobrazowania przestrzennego rozkładu szukanych metabolitów (Gottwald i in. 2012).

Podczas wykorzystywania techniki MALDI MSI konieczne jest przygotowanie próbki (liścia, łodygi, kwiatu, korzenia), która może być poddana badaniom bezpośrednio bądź po zamrożeniu i pokrojeniu w kriostacie na skrawki o określonej grubości (10-30 μm). Etap przygotowania próbki to bardzo ważny aspekt w analizie MSI. Potwierdzeniem tego mogą być czynności przedstawione przy analizie ziaren jęczmienia (Peukert i in. 2012). W tej publikacji istotnymi aspektami przygotowania próbki były: krojenie przy użyciu kriostatu, dobór matrycy oraz sposób jej aplikacji. Badania te pokazały dwa ważne czynniki wpływające na optymalną grubość preparatu, które muszą być wzięte pod uwagę podczas cięcia na kriostacie, a więc rodzaj tkanki oraz wiek tkanki. Mając do czynienia z młodą tkanką, w tym przypadku z młodymi nasionami jęczmienia,

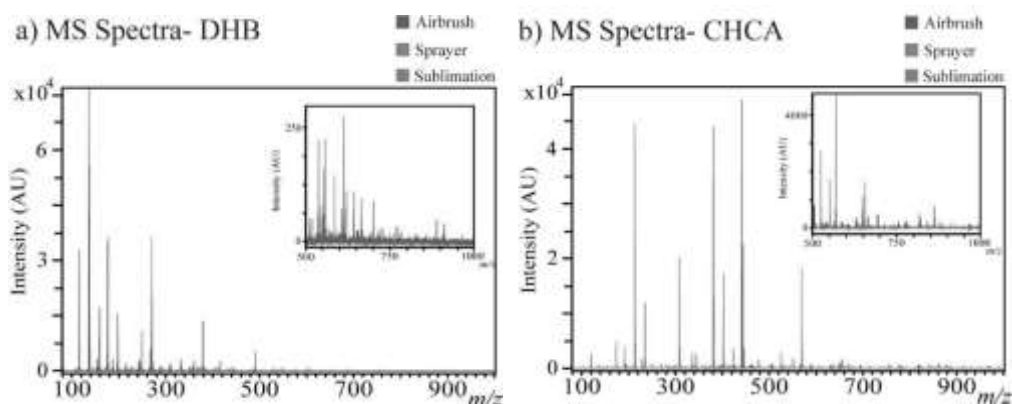
optymalna była grubość 20 μm . Natomiast dojrzały materiał roślinny stanowiący nasiona, które zakumulowały skrobię, wymagał pocięcia na grubsze 3040 μm fragmenty. Fragmenty tkanek o grubości od 20 do 30 μm pozwalały uzyskać lepsze intensywności widm w porównaniu do fragmentów o grubości 40 μm . Typowe skrawki pobierane do analiz MSI mają od 10 do 20 μm grubości (Peukert i in. 2012).

Wybór matrycy MALDI i sposób jej aplikacji jest kolejnym istotnym krokiem podczas obrazowania. Matryca MALDI jest to związek chemiczny umożliwiający proces desorpcji/ionizacji analizowanego analitu. Matryca pozwala na wygenerowanie jonów, co ma zasadnicze znaczenie dla analizy spektrometrii mas, ponieważ spektrometr mas wykrywa tylko naładowane cząsteczki. W obrazowaniu standardowe matryce obejmują np. kwas 2,5dihydroksybenzoowy (DHB), kwas α -cyjano-4-hydroksycynamonowy (CHCA) i 9-

aminoakrydyny (9-AA) (Gemperline i in., 2016) dla trybu jonów dodatnich i ujemnych. Mniej popularne matryce, takie jak TiO_2 , złoto lub nanocząstki srebra, są używane w celu poprawy jakości widm, krystalizacji i stabilność próżni (Shrivastava i in. 2011).

Metoda aplikacji matrycy MALDI i jej krystalizacja są niezwykle istotnymi etapami w trakcie analizy metodą spektrometrii mas, ponieważ ma to bezpośredni wpływ na ilość metabolitów znalezionych w tkance (Gemperline i Li 2014). Najpopularniejszą metodą jest aplikacja matrycy za pomocą aerografu. Jest ona powszechnie stosowana ze względu na stosunkowo szybkie i łatwe rozprowadzenie matrycy jednakże wymaga dużej wprawy operatora, który nakłada matrycę na tkankę. Metodą tą ciężko uzyskać powtarzalne wyniki, tak aby rozmiar kryształów matrycy był zawsze taki sam. Matrycę MALDI można także nałożyć na preparat za pomocą specjalistycznej aparatury do nanoszenia warstw o określonej grubości bądź metodą sublimacji. Rezultaty otrzymane w obrazowaniu MSI w dużym stopniu zależą od sposobu aplikacji matrycy. Jak zaprezentowano na rysunku 3 zarówno dla matrycy DHB jak i

CHCA sygnał matrycy jest najsilniejszy przy zastosowaniu aerografu. Występuje także więcej pików odpowiadających jonom matrycowym w porównaniu do dwóch kolejnych metod, co może powodować interferencje z niektórymi poszukiwanymi metabolitami. Dlatego też zastosowanie specjalistycznej aparatury do nanoszenia warstw bądź metod sublimacji może być konkurencyjne dla aerografu przy wykrywaniu metabolitów o niskiej masie molekularnej, które mogłyby być maskowane przez piki matrycy o zbyt dużej intensywności.



Rys. 3. Widma MS czystych matryc MALDI (a) DHB i (b) CHCA (bez próbki) po nałożeniu na szkiełko z zastosowaniem aerografu (niebieski), przy użyciu automatycznego rozpylacza (czerwony) i metodą nakładania matrycy przez sublimację (zielony). Wstawki pokazują spektrum MS powiększone do wyższego zakresu m/z (m/z 500-1000) (Gemperline i in. 2014).

Po nałożeniu matrycy na próbkę i skryształowaniu preparatu wraz z matrycą, płytka na której znajduje się próbka jest wprowadzana do spektrometru w określonej płaszczyźnie XY. Wypalenie (strzał) laserem w próbkę powoduje uwolnienie matrycy i wytworzenie smug gazów,

w którym powstają jony matrycowe i analizowanych substancji. Możliwość poruszania się w płaszczyźnie X-Y umożliwia przejście lasera w poprzek próbki i uzyskanie widm mas, z każdego z wcześniej zdefiniowanych punktów. Po zakończeniu rastra 2D, możliwe jest obserwowanie obrazów jonów dla każdej (wybranej) masy (wartości m/z) w widmie, a oprogramowanie wyświetli względną ilość każdego jonu jako kolorową mapę intensywność sygnału w obszarze rastra (Gemperline i in. 2016). Jedną z zalet MALDI-MSI dla analiz biologicznych jest to, że możliwe jest generowanie większych jonów, takich jak peptydy i białka, co jest jednym z powodów, dla których MALDI jest najczęściej używaną techniką MSI (Balluff i in. 2011). Matryca pochłania znaczną część energii lasera, zapewniając delikatną jonizację analitów, co pozwala na zjonizowanie większych cząsteczek (m/z powyżej 100 kDa) bez ich rozpadu. Niestety, istnieją zarówno wady jak i zalety analizy w zakresie dużych i małych mas cząsteczkowych. Jednym z możliwych problemów mogących się pojawić w analizach techniką MALDI jest sama matryca, która wytwarza jony, mogące zakłócać lub maskować analizowane jony o tych samych masach cząsteczkowych co cząsteczki matrycy. Problemy tego typu można rozwiązać stosując do analizy spektrometrii o wysokiej rozdzielczości lub zastosować nowe inne matryce, których masa cząsteczkowa nie będzie pokrywała się z masą cząsteczkową szukanych analitów (Shrivastava i in. 2011).

Jak wcześniej wspomniano, MALDI-MSI jest najbardziej popularną techniką obrazowania w spektrometrii mas. MALDI-MSI może być stosowana do wykrywania szerokiego zakresu cząsteczek od małych mas cząsteczkowych np. metabolitów i peptydów po duże masy cząsteczkowe (np. białka). Obecnie prowadzi się szereg badań metabolomiki roślinnej z wykorzystaniem MALDI-MSI. Przykładem jest badanie symbiotycznego związku między modelowymi roślinami strączkowymi (*Medicago truncatula*) i bakteriami wiążącymi azot (*Sinorhizobium meliloti*), przeprowadzone przez Gemperline i współpracowników, którego wyniki opublikowano w 2015 roku. Porównywano tam kombinacje typu dzikiego i zmutowanego szczepu roślin i bakterii. Zidentyfikowano metabolity, takie jak hem, o masie molekularnej 612,2 m/z , składnik leghemoglobiny, która wytwarza środowisko beztlenowe niezbędne do redukcji azotu przez bakteroidy, a także różne aminokwasy, w tym asparaginę o masie 133,1 m/z , która jest końcowym produktem transformacji biologicznie wiązanej azotu. Obserwowano także kwasy organiczne, które są obecne w funkcjonalnej, wiążącej azot brodawce (symbioza rośliny i bakterii typu dzikiego) i nieobecne w niefunkcjonalnych brodawkach (symbioza dzikiej rośliny i mutanta bakteryjnego, mutanta rośliny z bakterią typu dzikiego, bądź mutantów zarówno rośliny jak i bakterii). Informacje uzyskane dzięki zastosowaniu tej techniki mogą zapewnić cenny wgląd w proces biologicznego wiązania azotu w roślinach strączkowych, nie tylko identyfikując metabolity, które mogą być zaangażowane w tym procesie, ale także lokalizując te cząsteczki w obrębie struktury brodawki korzeniowej.

Z kolei współpraca zespołów Jina Lee i Basila Nikolau pokazała możliwość wykorzystania MALDI-MSI do obrazowania metabolitów w liściach kukurydzy na poziomie komórkowym, co pozwoliło na nowe spojrzenie w znany asymetryczny metabolizm związany z różnymi typami tkanek w tych liściach (Korte i in. 2015). To badanie udowadnia, że zrozumienie szczegółów molekularnych procesów metabolomicznych i ich dystrybucji oraz lokalizacji na poziomie subkomórkowym daje nadzieję dla głębsze poznanie mechanizmów biologicznych i ich implikacji.

5. Perspektywy na przyszłość

W związku ze zintegrowaną strategią badania „-omików”, wśród badaczy pojawiają się oczywiście obawy dotyczące złożoności i dynamicznego zasięgu różnych klasy badanych analitów. Te wyzwania spowodowały rozwój bardziej zaawansowanego oprzyrządowania zapewniającego większe możliwości separacji i ulepszonej detekcji spektrometrii mas z dużymi szybkościami skanowania, lepszą czułością i wyższą wydajnością. Aparatura MALDIMS z rozdzielczością przestrzenną do około 20 μm jest obecnie powszechnym i łatwo dostępnym wyposażeniem wielu laboratoriów w Polsce i zagranicą. Niestandardowo wbudowane oprzyrządowanie do spektrometrów może osiągnąć rozdzielczość przestrzenną poniżej 3 μm i jest to tylko kwestią czasu, gdy tego typu aparatura stanie się komercyjnie dostępna (Boggio i in. 2011). Udoskonalenia technik jonizacji może również dostarczyć więcej ważnych biologicznie informacji o systemach roślinnych. Wprowadzenie

tych nowych technologii z nowymi ważnymi udoskonaleniami aparaturowymi wraz z dokładnym przygotowaniem próbki, może zapewnić znaczący postęp w zintegrowanych badaniach nad metabolomiką.

Oprócz postępu technologicznego w dziedzinie oprzyrządowania, jednoczesny rozwój, zaawansowanie i integracja ściśle powiązanych ze sobą dziedzin „-omiki” mogą doprowadzić naukowców do lepszego zrozumienia i charakterystyki różnych procesów biologicznych i mechanizmów sygnalizacyjnych w roślinach. Powszechne zastosowanie MSI jako techniki badania dostarczy informacji przestrzennych na temat tego, gdzie anality znajdują się w obrębie rośliny. Znaczącą na przykład miejsce występowania pewnego metabolitu oraz enzymu, który wchodzi z nim w interakcję mamy możliwość poznania kluczowych informacji o procesach biologicznych i mechanizmach występujących w roślinach. Oprócz badania rozwoju roślin, MSI może również być narzędziem do lokalizowania różnic między analitami w wielu typach tkanek, w różnych stanach chorobowych, wskazania różnic genetycznych lub następstw manipulacji genetycznych. Można szybko ustalić potencjał funkcjonalny roślin dla różnych biotechnologicznych aplikacji takich jak produkcja bioenergii, ochrona środowiska, dekontaminacja, produkcja produktów naturalnych i wiele innych ważnych zastosowań.

Praca finansowana przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju w ramach realizacji projektu Lider (nr projektu: LIDER/11/0070/L-8/16/NCBR/2017).

6. Literatura

- Balluff B, Schöne C, Höfler H i in. (2011) MALDI imaging mass spectrometry for direct tissue analysis: technological advancements and recent applications. *Histochem. Cell Biol.* 136: 227–244
- Boggio KJ, Obasuyi E, Sugino K i in. (2011) Recent advances in single-cell MALDI mass spectrometry imaging and potential clinical impact. *Expert Rev. Proteomics* 8: 591–604
- Gemperline E, Jayaraman D, Maeda J i in. (2015) Multifaceted investigation of metabolites during nitrogen fixation in *Medicago* via high resolution MALDI-MS imaging and ESI-MS. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 26(1): 149-158
- Gemperline E, Keller C, Li L (2016) Mass Spectrometry in Plant-OMICS. *Anal. Chem.* 88(7): 3422-3434
- Gemperline E, Li L (2014) MALDI-mass spectrometric imaging for the investigation of metabolites in *Medicago truncatula* root nodules. *J. Visualizes Exp.* 85: 1-11
- Gottwald S, Samans B, Luck S i in. (2012) Jasmonate and ethylene dependent defence gene expression and suppression of fungal virulence factors: two essential mechanisms of *Fusarium* head blight resistance in wheat? *BMC Genomics* 13: 1-22
- Heyman HM, Dubery IA (2016) The potential of mass spectrometry imaging in plant metabolomics: a review. *Phytochem Rev.* 15: 297-316
- Jun JH, Song ZH, Liu ZJ i in. (2010) High-Spatial and High-Mass Resolution Imaging of Surface Metabolites of *Arabidopsis thaliana* by Laser Desorption-Ionization Mass Spectrometry Using Colloidal Silver. *Anal. Chem.* 82: 3255-3265
- Korte AR, Yandea-Nelson MD, Nikolau BJ i in. (2015) Subcellular-level resolution MALDI-MS imaging of maize leaf metabolites by MALDI-linear ion trap-Orbitrap mass spectrometer. *Anal Bioanal Chem* 407: 2301–2309
- Lei ZT, Huhman DV, Sumner LW (2011) Mass spectrometry strategies in metabolomics. *J. Biol. Chem.* 286: 25435–25442.
- Makarov A (2000) Electrostatic Axially Harmonic Orbital Trapping: A High-Performance Technique of Mass Analysis. *Anal. Chem.* 72: 1156–1162.
- Mullen AK, Clench MR, Crosland S i in. (2005) Determination of agrochemical compounds in soya plants by imaging matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 19: 2507–2516
- Okazaki Y, Saito K (2012) Recent advances of metabolomics in plant biotechnology. *Plant Biotechnology Reports* 6: 1–15.

- Oms-Oliu G, Hertog MLATM, van de Poel B i in. (2011) Metabolic characterization of tomato fruit during preharvest development, ripening, and postharvest shelflife. *Postharvest Biol. Technol.* 62: 7–16.
- Peukert M, Matros A, Lattanzio G i in. (2012) Spatially resolved analysis of small molecules by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometric imaging (MALDI-MSI). *New Phytol.* 193: 806-815
- Robinson S, Warburton K, Seymour M i in. (2007) Localization of water-soluble carbohydrates in wheat stems using imaging matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. *New Phytologist* 173: 438 –444
- Seaman C, Flinders B, Eijkel G i in. (2014) “Afterlife Experiment”: Use of MALDI-MS and SIMS Imaging for the study of the Nitrogen Cycle within Plants. *Anal. Chem.* 86: 10071–10077
- Shrivastava K, Hayasaka T, Sugiura Y i in. (2011) Method for simultaneous imaging of endogenous low molecular weight metabolites in mouse brain using TiO₂ nanoparticles in nanoparticle-assisted laser desorption/ionization-imaging mass spectrometry. *Anal. Chem.* 83: 7283–7289
- Sturtevant D, Lee YJ, Chapman KD (2016) Matrix assisted laser desorption/ionization mass spectrometry imaging (MALDI-MSI) for direct visualization of plant metabolites in situ. *Current Opinion in Biotechnology* 37: 53-60
- Zhang JY, de Carvalho MHC, Torres-Jerez I i in. (2014) Global reprogramming of transcription and metabolism in *Medicago truncatula* during progressive drought and after rewatering. *Plant, Cell Environ.* 37: 2553–2576

18. Znaczenie kwasów humusowych w glebie i ich wpływ na plonowanie zbóż

The importance of humic acids in soil and the influence on the yielding of cereal

Marta Wyzńska, Marcin Różewicz

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

Marta Wyzńska: mwyzinska@iung.pulawy.pl

Słowa kluczowe: kwasy humusowe, gleba, materia organiczna, plonowanie zbóż

Streszczenie

Opracowanie obejmuje przegląd badań dotyczących znaczenia zasobności gleb uprawnych w kwasy humusowe, a także ich wpływu na żyzność gleby i plonowanie roślin zbożowych. Zaprezentowano wpływ kwasów humusowych na środowisko glebowe i roślinę uprawną. Na podstawie dokonanego opisu zagadnienia i przeglądu literatury można stwierdzić, że poziom kwasów humusowych ma pozytywny wpływ na mikroorganizmy glebowe, żyzność gleby i plonowanie zbóż.

1. Wstęp

Jednym z ważniejszych czynników decydujących o żyzności gleb jest zawartość materii organicznej. Zalicza się do niej substancje humusowe, które odgrywają istotną rolę w funkcjonowaniu agrokosystemu gleby. Do najważniejszych ich funkcji należą, m.in. udział w obiegu mikro- i makropierwiastków, kształtowanie właściwości fizycznych, biologicznych i chemicznych gleby. Jednocześnie wpływają również na unieczynnienie i zmniejszenie pobierania przez rośliny toksycznych związków (Dziadowiec 1993). Na zawartość substancji humusowych w glebie, a przez to na poprawę jej żyzności wpływają stosowane zabiegi agrotechniczne, a zwłaszcza nawożenie organiczne. Nawożenie obornikiem oraz resztkami organicznymi wzbogaca glebę w materię organiczną, która poprzez procesy humifikacji wpływa na zawartość próchnicy, ale także na skład frakcyjny oraz na właściwości fizykochemiczne substancji humusowych (Zaujec 2007). W procesie mineralizacji i humifikacji wprowadzona do gleby materia organiczna (obornik, resztki poźniwne) ulega przemianom poprzez działalność mikroorganizmów. Powstają wtedy substancje humusowe – kwasy humusowe i huminy oraz związki mineralno-organiczne, mające znaczący wpływ na właściwości gleby decydujące o jej żyzności. Dzięki postępowi agrotechnicznemu i wprowadzaniu do środowiska produktów i substancji poprawiających jej żyzność, poprawie ulegają właściwości funkcjonalne gleb. Bezpośrednio sprzyja to efektywniejszemu wykorzystaniu składników pokarmowych przez rośliny, (Canellas i in. 2002). Efektywniejsza uprawa roślin skutkuje zwykłą plonu oraz lepszym wykorzystaniem powierzchni uprawnej, co w perspektywie wzrostu liczby ludności i zapotrzebowania na żywność jest korzystnym zjawiskiem.

2. Charakterystyka kwasów humusowych

Substancje huminowe są jednymi ze swoistych związków próchnicznych występujących w glebach, do których należą kwasy humusowe, kwasy fulwowe i huminy (Tab. 1). Różne typy gleb charakteryzują się inną zawartością tych poszczególnych związków jak również wynikającymi z tego faktu właściwościami. Najżyźniejsze są te gleby, które zawierają w swoim składzie najwięcej kwasów humusowych. Gleby bogate w te substancje mają zazwyczaj barwę od ciemnobrązowej do czarnej. Z racji tego, że związki te są bardzo cenne i wykorzystywane w rolnictwie i ogrodnictwie opracowano metody ich ekstrakcji z gleb i produkcję skoncentrowanych preparatów o wysokiej ich zawartości. Gonet (2003) definiuje substancje humusowe jako grupę związków heterogenicznych (polimolekularnych i polidispersyjnych) substancji organicznych pochodzenia naturalnego (biogenicznego), charakteryzująca się zabarwieniem od żółtego do czarnego, względnie odpornych na biodegradację. Do ich ekstrakcji zazwyczaj stosuje się alkaliczne rozpuszczalniki (NaOH). Są one nierozpuszczalne w wodzie w warunkach kwaśnych (pH < 2) i dlatego ulegają wytrąceniu po

zakwaszeniu roztworu. Zdolności sorpcyjne związków próchnicznych przewyższają kilka lub kilkanaście razy pojemność sorpcyjną składników mineralnych kompleksu sorpcyjnego. Jest to ich istotna właściwość wpływająca na zachowanie żyzności gleby i utrzymanie w jej górnych warstwach składników pokarmowych zapobiegając ich wypłukiwaniu przez wodę w głębsze warstwy. Źródłem ładunków zależnych od pH są przede wszystkim grupy karboksylowe i fenolowe związków próchnicznych, z których wodór, związany kowalentnie, oddysocjowuje w miarę wzrostu pH, przyczyniając się do powiększania ładunku ujemnego. Inną istotną różnicą w budowie substancji humusowych jest to, że tlen w kwasach fulwowych jest w większości powiązany z grupami funkcyjnymi, natomiast większa część tlenu w kwasach huminowych jest związana z rdzeniem aromatycznym. Badania przeprowadzone przy użyciu mikroskopii elektronowej potwierdzają budowę polimeryczną kwasów huminowych. Poszczególne makrodrobiny mają kształt kulisty, świadczący o sferycznej ich budowie i są połączone ze sobą w formie pierścieni, łańcuchów i gron (Stevenson 1994). Wielkość makrodrobin nie jest jednakowa dla wszystkich kwasów huminowych. Przyjmuje się, że kwasy huminowe są polimerami składającymi się z rdzenia aromatycznego, który jest połączony wiązaniami z aminokwasami, cukrami, peptydami, alifatycznymi kwasami i innymi składnikami o budowie alifatycznej. Rdzeń składa się z pierścieni aromatycznych typu fenoli lub związków zawierających azot w postaci cyklicznej (indol, pirymidyna i inne). Te właściwości substancji huminowych mają szczególne znaczenie w kontekście żyzności gleby.

Jak wskazują wyniki prowadzonych badań, kwasy huminowe są zdolne do wiązania substancji takich jak metale ciężkie czy inne szkodliwe substancje. Znaczna zawartość metali ciężkich w glebach, takich jak: kadm, rtęć, ołów, arsen, stanowią w wysoce uprzemysłowionych regionach znaczący problem. Dbając o dobra kulturę rolną i zawartość kwasów humusowych w glebie można zapobiegać kumulacji metali ciężkich w roślinach. Dzięki temu, że substancje huminowe są dobrymi sorbentami, nie tylko mają właściwości zatrzymywania metali ciężkich, ale także utrzymują wilgotność gleby.

Tab. 1. Podział i charakterystyka kwasów humusowych (Galeska i in., 2001).

Kwasy huminowe	Kwasy fulwowe
-trudniej rozpuszczalne	-łatwo rozpuszczalne w wodzie
-budowa bardziej złożona i polimerowa	-heterogeniczna, małocząsteczkowa budowa
-budowa porowata przez co mają większe zdolności sorpcyjne i zdolność zatrzymywania wody	- łatwiej migrują w głąb warstwy gleby
-właściwości strukturotwórcze gleby	- wyższy stopień dysocjacji
- zdolność tworzenia chelatów z jonami Cu, fe, Mn	- wiążą jony Al i Fe

3. Znaczenie kwasów humusowych dla gleby

Wprowadzenie do gleby materii organicznej wpływa na wzrost zawartości w niej próchnicy. Składa się ona w zdecydowanej większości z kwasów humusowych. W przypadku niedostatecznej ilości próchnicy w glebie i niskiej zawartości substancji huminowych pojemność sorpcyjną gleby zmniejsza się przez co następuje utrata wielu składników odżywczych oraz szybsza utrata wody. O właściwościach sorpcyjnych decyduje w głównej mierze kompleks sorpcyjny zbudowany z organicznych koloidów glebowych obdarzonych przeważnie ujemnym ładunkiem elektrycznym, którego źródłem są grupy karboksylowe ($-\text{COOH}$) i hydroksylowe fenoli ($-\text{OH}$), w których wodór może być częściowo zastępowany przez inne kationy. Pod tym względem substancje humusowe podobne są do krzemianowych minerałów ilastych (Gonet, 2003). Kwasy humusowe zapobiegają pękaniu gleby, powierzchniowemu odpływowi wody i erozji gleby poprzez zwiększenie zdolności koloidów do wiązania wody, Procesy zubożenia gleby poprzez spadek zawartości próchnicy powodują więc negatywne zjawiska takie jak niższa aktywność mikrobiologiczna, degradacja struktury gleby. Kwasy humusowe są zdolne do obniżania stężenia soli (mineralnych), których zbyt wysokie stężenie działa toksycznie na rośliny. Szczególnie skutecznie zredukowane jest zagrożenie

zbyt wysokim stężeniem NH_4 , co jest szczególnie ważne dla młodych roślin. Ogólnie kwasy humusowe redukują zniszczenia korzeni wynikające ze zbyt wysokiego stężenia soli mineralnych w glebie. Kwasy humusowe mają także właściwości biostymulacyjne, poprzez zwiększanie aktywności i namnażanie się pożytecznych mikroorganizmów glebowych (m.in. bakterii z rodzajów *Azotobacter* i *Nitrosomonas*). Wpływają poprzez to także na polepszenie wymiany gazowej w glebie. Ponadto mikroorganizmy glebowe czerpią z substancji organicznej niezbędną energię i mineralne składniki pokarmowe. Gleby zasobne w próchnicę odznaczają się zdecydowanie wyższą aktywnością biologiczną. Dzięki niej szybsza jest mineralizacja materii organicznej, której źródło w uprawach stanowi obornik lub resztki poźniwne. Kwasy humusowe mają zdolności buforowe gleb, dzięki czemu stabilizują ich odczyn (zarówno zbyt kwaśny, jak i zbyt zasadowy). Pozwala to na zmniejszenie szkodliwego działania czynników zakwaszających (m.in. nawozów mineralnych), choć nie bez znaczenia jest także obecność w glebie części ilastych, próchnicy i węgla wapnia. Kwasy humusowe zapobiegają w ten sposób utracie składników mineralnych z gleby oraz umożliwiają przechodzenie ich w formy przyswajalne dla roślin. Kwasy humusowe wpływają także korzystnie na strukturę fizyczną gleby. Ich właściwości agregacyjne cząstek szkieletowych gleby w większe struktury tzw. gruzełki, tworzą kanały pomiędzy nimi kanały powietrzne i poprawiają jej napowietrzenie. Właściwości te są korzystne dla różnych rodzajów gleb. W przypadku gleb piaszczystych zwiększają ich zwięzłość, natomiast w stosunku do gleb ciężkich powodują ich lekkie rozluźnienie i napowietrzenie przez co powstają warunki korzystniejsze dla rozwoju systemu korzeniowego. Główną rolę odgrywają tutaj kwasy fulwowe, które posiadają właściwości elektrodynamiczne, powodując rozluźnienie nadmiernie zagęszczonych koloidów glebowych.

4. Znaczenie dla roślin

Substancje humusowe stymulują rozwój roślin, zwłaszcza systemu korzeniowego. Poprzez bardziej rozbudowany system korzeniowy następuje zwiększenie pobrania składników pokarmowych przez rośliny (Canellas i in. 2002, Eyheraguibel i in. 2008). Stymulacja systemu korzeniowego spowodowana jest przez wyższą pojemność kationową gleby. Zwiększa się wtedy dostępność fosforu na skutek ograniczonego wytrącania fosforanu wapnia i stymulacja enzymów roślinnych, co dodatkowo zapewnia ochronę przed czynnikami stresowymi. Uzyskany efekt działania substancji humusowych zależy od źródła i dawki tych substancji, sposobu ich aplikacji, warunków środowiska, gatunku rośliny (du Jardin, 2015). Badania przeprowadzone przez Rose i in. (2014) wykazały dodatni wpływ kwasów humusowych na ogólny wzrost masy suchej o 22 ($\pm 4\%$) dla pędów i o 21 ($\pm 6\%$) dla korzeni. Korzystnym oddziaływaniem kwasów humusowych na system korzeniowy, a także na odżywienie roślin jest także stymulacja jonów H^+ i $-\text{ATP}$ błony komórkowej, która przekształca energię swobodną uwolnioną przez hydrolizę ATP w transbłonowy potencjał elektrochemiczny niezbędny do absorpcji azotanów i innych składników odżywczych (Jindo i in., 2012). Badania jakie przeprowadził du Jardin (2012) wskazują także na hormonalne oddziaływanie kwasów humusowych na rośliny poprzez grupy funkcyjne rozpoznawane przez kompleksy sygnałowe szlaków hormonalnych roślin, wyzwalają związki hormonalne lub stymulują mikroorganizmy wytwarzające hormony. Kwasy humusowe o wysokiej masie cząsteczkowej mogą również działać jako promotory wzrostu korzeni za pośrednictwem szlaków metabolicznych auksyny (Trevisan i in. 2010). Kwasy humusowe mają więc właściwości biostymulatorów. Ich aktywność biostymulacyjna odnosi się do zwiększenia odporności na stres środowiskowy. Poprzez metabolizm fenylopropanoidów, które odgrywają znaczącą rolę w produkcji związków fenolowych, zaangażowanych w metabolizm wtórny i szeroki zakres reakcji na stres (Kaufmann i in. 2007). Wykazano, że wielkocząsteczkowe kwasy humusowe zwiększają aktywność kluczowych enzymów tego metabolizmu w hydroponicznie hodowanych siewkach kukurydzy (Schiavon i in., 2010; Olivares i in., 2015). Poprzez działanie chelatujące na jony metali ograniczają też ich wzajemne antagonizmy w procesie przyswajania przez rośliny. Ułatwiają więc w ten sposób ich pobieranie przez system korzeniowy i zapobiegają niedoborom. Próchnica jest także jednym z głównych źródeł azotu i fosforu, które w tej postaci są magazynowane w glebie. Te właściwości kwasów humusowych sprawiają, że wykorzystać można naturalne i mniej szkodliwe dla środowiska źródła substancji mineralnych dla roślin oraz obniżyć dawki nawozów mineralnych, bez negatywnych skutków dla plonu, a z pozytywnym efektem

ekonomicznym. Dodatkowo kwasy humusowe zawarte w warstwie próchnicy są w stanie zmagazynować 4-12 razy więcej składników pokarmowych niż część mineralna gleby (odpowiadają za 20-70% całkowitej pojemności sorpcyjnej gleby). Stosowanie intensywnego nawożenia doglebowego na stanowiskach ubogich w kwasy humusowe jest mniej efektywne z punktu widzenia ekonomicznego i środowiskowego.

5. Źródła kwasów humusowych

Naturalnym źródłem kwasów humusowych w glebie jest stopniowy rozkład materii organicznej, która w procesach humifikacji przeprowadzanych przez mikroorganizmy zostaje przekształcona w substancje humusowe. Dostępna w warstwie gleby materia organiczna ulega powolnemu rozkładowi, powstaje warstwa próchniczna, która zawiera również kwasy humusowe. Istnieje więc konieczność stałego dostarczania materii organicznej, co zapewni odpowiednią zawartość próchnicy w glebie, a także zawartość składników pokarmowych dla roślin oraz jej mikrobiologiczną aktywność. Jest to jeden z głównych celów nawożenia organicznego, które utrzymuje prawidłową zawartość próchnicy w glebie. W dobie stale wzrastającej intensyfikacji produkcji roślinnej istotne jest również wykorzystanie potencjalnych składników pokarmowych zawartych w substancjach organicznych. Innymi źródłami kwasów humusowych w glebach są kopaliny takie jak węgiel kamienny. Z badań przeprowadzonych przez Huculak-Mączkę i in. (2010) wynika, że węgiel brunatny zawiera znaczne ilości kwasów humusowych, zwłaszcza kwasów huminowych (Tab. 2), choć jest ona zróżnicowana w zależności od regionu z którego został on wydobyty. Występujące w nim kwasy huminowe występują w postaci wolnej lub w postaci soli, które dodatkowo wprowadzają do gleby pierwiastki. Gleby wulkaniczne powstałe na skutek erupcji wulkanów i wypływu lawy, która następnie zamienia się w zastygniętą magmę, również zawierają znaczne ilości kwasów humusowych, co sprawia, że odznaczają się dużą żyznością (Hiradate i in., 2004). W ostatnim czasie dostępne są również komercyjne preparaty, zawierające w swoim składzie skoncentrowany udział kwasów humusowych do przygotowania rozcieńczonego roztworu, który aplikuje się do gleby.

Tab. 2. Zawartość całkowitych i wolnych kwasów huminowych w różnych materiałach organicznych (Huculak-Mączka i in., 2010).

Zawartość kwasów humusowych	Materiał			
	Węgiel brunatny	Węgiel brunatny ziemisty	Nawóz humusowy	Wychmieliny
Zawartość całkowitych kwasów huminowych [% mas.]	43,16	53,35	47,17	27,16
Zawartość wolnych kwasów huminowych [% mas.]	23,76	26,80	24,69	23,89

6. Wpływ kwasów humusowych na plonowanie zbóż

Badania prowadzone przez wielu autorów potwierdzają korzystny wpływ kwasów humusowych na plonowanie zbóż. Malik i Azam (1985) prowadzili badania mające na celu sprawdzenie wpływu kwasu humusowego na wzrost siewek pszenicy w obecności i przy braku azotu (N). Doglebowy dodatek kwasu humusowego spowodował pięciokrotne zwiększenie długości korzeni. Świeża i sucha masa korzeni również znacznie wzrosła na skutek dodatku kwasu humusowego, podobnie jak suchej masy pędów (22%). Rośliny były bardziej odporne na stres wywołany niedoborem wody i lepiej wykorzystywały zawarty w niej azot. W glebie, gdzie nie stosowano nawożenia azotowego, a wyłącznie dodatek kwasów humusowych stwierdzono lepszy rozwój korzeni niż w podłożu, gdzie nie stosowano dodatku kwasów humusowych. Najlepsze efekty wzrostu i plonowania uzyskano przy zastosowaniu rozcieńczonego preparatu kwasów humusowych

w ilości 54 mg/l. Dodatek kwasów humusowych wpływa na lepszą przyswajalność żelaza nieorganicznego, co zostało udowodnione na siewkach pszenicy. Jest to więc skuteczny sposób na zapobieganie chlorozie zbóż i zmniejszeniu plonów (Mackowiak i in., 2001). Reakcja zbóż na zastosowanie dodatku kwasów humusowych uzależniona jest jednak od rodzaju gleby. Jak udowodnili Tahir i in. (2011) wzrost pszenicy i pobieranie azotu z gleby, o niższej zawartości wapnia było wyższe. Aplikacja kwasów humusowych znacznie poprawiła stężenie K w glebie o niskim stężeniu wapnia, a P i NO₃-N w glebie wapiennej. Najwyższa zastosowana dawka kwasów humusowych w ilości 90 mg/kg⁻¹ gleby miała negatywny wpływ na wzrost i pobieranie składników pokarmowych przez pszenicę, a także na gromadzenie składników odżywczych w glebie, podczas gdy średnia dawka 60 mg/kg⁻¹ gleby była bardziej skuteczna w stymulowaniu wzrostu pszenicy. Jones i in. (2007) wskazują, że zbyt niskie stężenie preparatów z kwasami humusowymi nie wpływa na przyswajanie biopierwiastków przez siewki zbóż, przez co nie wykazują one pozytywnego efektu. Cytowani autorzy zwracają uwagę, że niskie stężenie kwasów humusowych nie wpłynęło na plonowanie pszenicy jarej. Dopiero wyższa dawka (1,7 kg kwasów humusowych/ ha) miała wpływ na uzyskanie wyższego plonu ziarna. Natomiast Van Tonder (2008) uważa, iż bardziej efektywne wprowadzenie kwasów humusowych do gleby to stosowanie ich soli potasowych. Stosując w doświadczeniu wazonowym dodatek humianopotasu uzyskał wyższy stopień krzewienia pszenicy i wyższy plon ziarna niż w przypadku stosowania samych kwasów humusowych.

7. Podsumowanie

Kwasy humusowe należą do substancji mających specyficzne właściwości fizyczne i chemiczne, które pozytywnie wpływają na żyzność gleby. Jako substancje pochodzenia naturalnego, powstające w procesie humifikacji materii organicznej, mogą być szeroko stosowane w rolnictwie w celu poprawienia właściwości gleby, a przez to wpływać na plonowanie roślin zbożowych..

8. Literatura

- Canellas LP, Olivares FL, Okorokova-Façanha AL i in. (2002) Humic acids isolated from earthworm compost enhance root elongation, lateral root emergence, and plasma membrane H⁺-ATPase activity in maize roots. *Plant Physiol.* 130:1951–1957.
- du Jardin P (2012) The Science of Plant Biostimulants-A bibliographic analysis. Ad hoc Study Report to the European Commission DG ENTR.
- du Jardin P (2015) Plant biostimulants: definition, concept, main categories and regulation. *Scientia Horticulturae*, 196, 3-14.
- Dziadowiec H (1993) Ekologiczna rola próchnicy Glebowej. *Probl. Post. Nauk Roln.* 411: 269- 281.
- Eyheraguibel B, Silvestre J, Morard P (2008) Effects of humic substances derived from organic waste enhancement on the growth and mineral nutrition of maize. *Bioresour. Technol.* 99:4206–4212.
- Galeska I, Hickey T, Moussy F i in. (2001) Characterization and biocompatibility studies of novel humic acids based films as membrane material for an implantable glucose sensor. *Biomacromolecules*, 2(4), 1249-1255.
- Gonet S (2003) Próchnica, substancje humusowe, węgiel organiczny - definicje. Komentarze i metody oznaczania, (w:) Substancje humusowe w glebach i nawozach, Dębska B, Gonet S (red.), PTSH, Wrocław: 21-29.
- Hiradate S, Nakadai T, Shindo H i in. (2004) Carbon source of humic substances in some Japanese volcanic ash soils determined by carbon stable isotopic ratio, $\delta^{13}C$. *Geoderma*, 119(1-2): 133-141.
- Huculak-Mączka M, Hoffmann K, Skut J i in. (2010) Ocena zawartości substancji humusowych w wybranych surowcach i odpadach. *Proceedings of ECOpole*, Vol. 4, No. 2: 383-387.
- Jindo K, Martim SA, Navarro EC i in. (2012) Root growth promotion by humic acids from composted and non-composted urban organic wastes. *Plant Soil*, 353: 209-220.

- Jones CA, Jacobsen JS, Mugaas A (2007) Effect of low-rate commercial humic acid on phosphorus availability, micronutrient uptake, and spring wheat yield. *Communications in soil science and plant analysis*, 38(7-8): 921-933.
- Kaufmann GL, Kneivel D, Watschke TL (2007) Effects of a biostimulant on the heat tolerance associated with photosynthetic capacity, membrane thermostability, and polyphenol production of perennial ryegrass. *Crop Sci.* 47:261–267.
- Mackowiak CL, Grossl PR, Bugbee BG (2001) Beneficial effects of humic acid on micronutrient availability to wheat. *Soil Science Society of America Journal*, 65(6): 1744-1750.
- Malik KA, Azam F (1985) Effect of humic acid on wheat (*Triticum aestivum* L.) seedling growth. *Environmental and Experimental Botany*, 25(3): 245-252.
- Olivares FL, Aguiar NO, Rosa RCC i in. (2015) Substrate biofortification in combination with foliar sprays of plant growth promoting bacteria and humic substances boosts production of organic tomatoes *Sci. Hortic.*, 183: 100-108.
- Rose MT, Patti AF, Little KR i in. (2014) A meta-analysis and review of plant-growth response to humic substances: practical implications for agriculture. *Advances in Agronomy*, Vol. 124: 37-89.
- Schiavon M, Pizzeghello D, Muscolo AS i in. (2010) High molecular size humic substances enhance phenylpropanoid metabolism in maize (*Zea mays* L.) *J. Chem. Ecol.*, 36: 662-669.
- Stevenson FJ (1994) *Humus chemistry: genesis, composition, reactions*. John Wiley & Sons.
- Tahir MM, Khurshid M, Khan MZ i in. (2011) Lignite-derived humic acid effect on growth of wheat plants in different soils. *Pedosphere*, 21(1): 124-131.
- Trevisan S, Pizzeghello D, Reperti B i in. (2010) Humic substances induce lateral root formation and expression of the early auxin-responsive IAA19 gene and DR5 synthetic element in *Arabidopsis*. *Plant Biology*, 12(4): 604-614.
- Van Tonder JT (2008) Effect of potassium humate on soil properties and growth of wheat (Doctoral dissertation, University of the Free State).
- Zaujec A (2007) Funkcje materii organicznej w obiegu związków węgla i żyzności gleb. W: Rola materii organicznej w środowisku. Gonet SS, Markiewicz M (red.). PTSIL Wrocław: 31-45.

19. Wpływ nawożenia azotem na ilość i jakość plonu ziarna pszenicy

The effect of nitrogen fertilization on the quantity and quality of wheat grain yield

Marta Wyzinińska, Marcin Różewicz

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

Marta Wyzinińska: mwyzinska@iung.pulawy.pl

Słowa kluczowe: nawożenie, azot, pszenica

Streszczenie

W niniejszym opracowaniu o charakterze przeglądowym przedstawiono znaczenie prawidłowej dawki azotu w uprawie pszenicy, a także jej wpływu na plon i jakość ziarna. Na podstawie przeglądu literatury można wnioskować, że zarówno wielkość jak i jakość uzyskanego plonu w dużym stopniu zależą od wielkości dawki azotu.

1. Wstęp

Uprawa zbóż stanowi istotny element produkcji roślinnej, której podstawowym celem jest pozyskanie ziarna wykorzystywanego na cele przemysłu spożywczego oraz paszowego. Skala produkcji poszczególnych gatunków zbóż i kierunki ich wykorzystania są uzależnione od wielu czynników i podlegają sezonowym zmianom (Urban 2015). Ogólna powierzchnia uprawy zbóż według danych GUS (2017) kształtowała się na poziomie 6773 tys. ha. w tym 2029 tys. ha zajmowała pszenica. Krajowa produkcja ziarna zbóż stanowi podstawę surowcową pasz dla wielu gatunków zwierząt. Stanowią one nieodzowny element dawki pokarmowej, bowiem ich udział może stanowić 50-90% jej składu. Pomimo, że stanowią w głównej mierze komponent energetyczny z racji wysokiego udziału skrobi, to wprowadzają również do dawki pokarmowej pewną ilość białka. Jego zawartość jest jednym z kryteriów jakościowych ziarna i przydatności paszowej. Niemniej ważną cechą ilościową wpływającą na ekonomikę produkcji ziarna zbóż jest uzyskiwany plon ziarna z hektara. Jest on zmienny w kolejnych sezonach i uwarunkowany wieloma czynnikami do których należą warunki pogodowe, zastosowana agrotechnika, odmiana, a także poziom nawożenia.

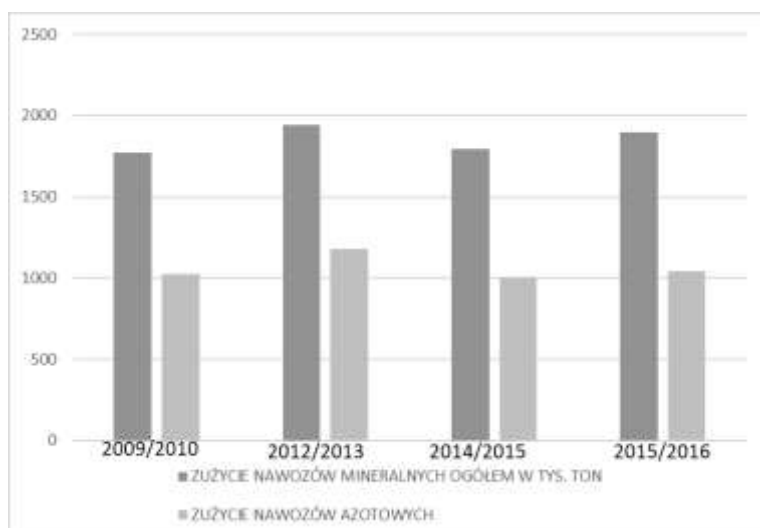
Jednym z głównych czynników związanych z plonowaniem i jakością ziarna jest nawożenie azotem. Stosowanie odpowiedniego poziomu nawożenia tym pierwiastkiem wpływa na plonowanie zbóż (Sułek i in. 2007). Jest to spowodowane tym, że zaopatrzenie w azot powoduje znacznie większe rozkrzewienie produkcyjne roślin, a przez to obsadę kłosów na jednostce powierzchni, a także większą masę i ilość uzyskiwanego ziarna. Istotnie wpływa także na jakość paszową ziarna poprzez zwiększenie w nim zawartości białka (Podolska 2008; Jaśkiewicz 2014). Przekroczenie zalecanej dawki azotu powoduje z kolei negatywny wpływ na środowisko. Związki azotu przedostają się do wód powierzchniowych powodując zjawisko ich eutrofizacji.

2. Opis zagadnienia

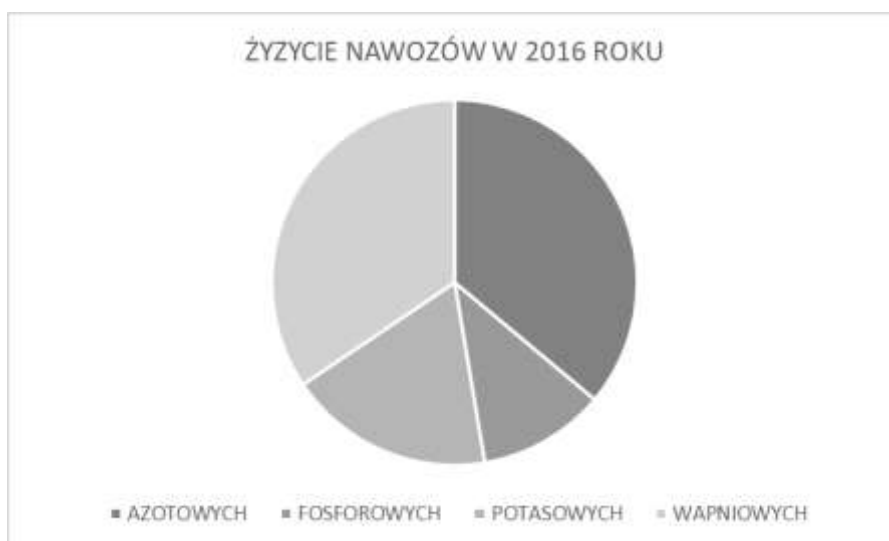
Azot to pierwiastek, który jest niezbędny do prawidłowego rozwoju roślin. Przy jego deficycie w glebie, występują objawy niedoborów objawiające się żółknięciem liści, zahamowaniem wzrostu roślin. W początkowym okresie wzrostu niedobór azotu zaznacza się na najstarszych liściach oraz słabszym wykształceniem nowych blaszek liściowych. Przy długotrwałym niedoborze azotu u roślin również na młodych liściach zaczynają występować objawy niedoboru tego pierwiastka (charakterystyczne dla azotu jest to, iż chlorozy pokrywają całą powierzchnię, w przeciwieństwie do chloroz wywołanych niedoborem żelaza). Konsekwencją jest także niedorozwój części generatywnych prowadzący do obniżenia produktywności roślin. Niższe plony i ich gorsza jakość powodują straty dla plantatorów. Zapobieganie niedoborom polega na uzupełnianiu zawartości azotu

w glebie poprzez nawożenie mineralne. Alternatywą jest także możliwość stosowania nawozów organicznych takich jak: obornik, gnojówka czy gnojowica. Konieczne jest jednak stosowanie takiej technologii nawożenia, aby zapewnić odpowiedni plon i jego jakość, jednocześnie bez negatywnego wpływu na środowisko, zgodnie z zasadami dobrej praktyki rolnictwa zrównoważonego. Nadmiar azotu pomimo, że nie wpływa toksycznie na rośliny, to może powodować nadmierny wzrost rośliny i brak możliwości przyjmowania innych pierwiastków niezbędnych roślinie. Jest on również niekorzystny ze względu na eutrofizację wód, a poprzez to nadmierny rozwój glonów i zaburzenie równowagi biologicznej w zbiornikach wodnych. Istotne jest więc ustalenie optymalnej dawki azotu pod względem ekonomicznym i przyrodniczym.

Jak wynika z danych GUS (2017) produkcja nawozów azotowych w formie mineralnej i ich zużycie utrzymuje się na stałym poziomie z niewielkimi, sezonowymi wahaniami. W sezonie 2015/2016 – zużytych zostało 1043 tys. ton. Obserwuje się także wzrost zużycia mineralnych nawozów w uprawach, w tym nawozów azotowych w ogólnej strukturze produkcji i zużyciu nawozów mineralnych (Rys. 1; Rys. 2.).



Rys. 1. Zużycie nawozów azotowych w ogólnej strukturze nawozów mineralnych (GUS 2017).



Rys. 2. Struktura zużycia nawozów mineralnych w Polsce (GUS 2017).

3. Formy azotu stosowane w nawożeniu

Nawozy mineralne stosowane w nawożeniu pszenicy oparte są na różnych formach azotu: amidowej, amonowej oraz azotanowej. Forma amidowa i aminowa są wolniej przyswajane przez rośliny. Stąd stosowane są one w nawozach długodziałających. Są one również odporniejsze na wymywanie w głębsze warstwy gleby. Korzystne jest zatem zastosowanie formy azotanowej, która zostanie szybciej pobrana przez rośliny i uzupełni niedobory azotu, podczas, gdy forma amonowa zostanie przyswojona wolniej stanowiąc rezerwuar azotu w glebie. Forma amidowa, aby mogła zostać skutecznie pobierana przez system korzeniowy roślin, musi przejść hydrolizę do formy amonowej i nitryfikację do azotanowej. Proces ten wymaga czasu i działania bakterii oraz obecności enzymu ureazy. Odpowiada ona za przekształcenie mocznika w węglan amonu, po którego rozpadzie rośliny mogą pobierać jon amonowy. Proces ten trwa średnio od jednego tygodnia do jednego dnia. Tempo przekształcania mocznika w formę amonową, uzależnione jest od temperatury gleby i jej wilgotności. Dla przykładu w temperaturze gleby 2°C, po 4 dniach mocznik jest przekształcony do amoniaku, natomiast przy temperaturze 10°C proces ten zachodzi już po 2 dniach. Dalszy wzrost temperatury przyspiesza proces hydrolizy, w 20°C – trwa on 1 dzień.

Jednym ze źródeł azotu jest także nawożenie organiczne poprzez wprowadzenie do gleby obornika, gnojówki lub gnojowicy. W ten sposób wprowadza się materię organiczną, powstałą jako uboczny produkt hodowli zwierząt. Synergiczne stosowanie nawozów organicznych i mineralnych w świetle wyników wielu badań jest najlepszym sposobem utrzymania, a nawet zwiększenia żyzności i produktywności gleby (Suwara 2010). Według Gondek i Gondek (2010) nawożenie pszenicy jarej siarką niezależnie od samej formy zastosowanego nawożenia, powoduje wzrost wykorzystania azotu z gleby, co przekłada się na wyższy plon roślin.

Przed zastosowaniem nawożenia mineralnego, powinno się uwzględnić możliwość przenawożenia gleby azotem, gdyż może mieć to ujemne konsekwencje środowiskowe związane z możliwością jego przedostawania się do wód gruntowych i powierzchniowych zbiorników wodnych, co negatywnie oddziałuje na środowisko wodne poprzez jego eutrofizację (Achremowicz i in. 1989). W związku z powyższym, w celu racjonalnego stosowania nawożenia azotem, istotne jest precyzyjne dawkowanie tym pierwiastkiem oraz dobór jego odpowiedniej formy. Efektywne zastosowanie nawożenia odpowiednią formą azotu pozwala dostosować je do tempa pobierania tego składnika w okresie wzrostu roślin (Kocoń 2005). Dobierając dawkę azotu, należy uprzednio dokonać kontroli jego zawartości w glebie, ale również wziąć pod uwagę warunki uprawy i przedplon (Sułek i in. 2007). Jeśli przedplon stanowiły rośliny bobowate, pozostawiają one w glebie pewną część azotu, co pozwala zmniejszyć dawkę nawożenia tym pierwiastkiem.

4. Wielkość dawki azotu w uprawie pszenicy jarej

Zapewnienie odpowiednich warunków glebowych oraz optymalnej dawki składników pokarmowych dla roślin uprawnych jest nieodzownym elementem, który w decydującym stopniu wpływa na uzyskiwanie możliwie najwyższego plonu, a także dobrej jakości ziarna. Poza czynnikiem genetycznym, który odgrywa bardzo ważną rolę istotne znaczenie mają warunki środowiskowe i agrotechniczne. Z dotychczas prowadzonych przez wielu autorów badań wynika, że zalecana dawka azotu powinna oscylować w przedziale od 50 do 120 kg N·ha⁻¹, jednak maksymalna dawka azotu nie powinna być wyższa niż 160 kg N·ha⁻¹ (Gąsiorowska i in. 2006; Fotyma i Fotyma 2005; Garrido-Lestache i in. 2004; Borkowska i in. 2002). W uzasadnionych przypadkach można jednak zastosować pod pszenicę jarą łącznie nawet 180 kg N·ha⁻¹ (Sułek i Podolska 2008). Nawożenie azotem należy zatem prowadzić stosownie do potrzeb rośliny uprawnej, w odpowiednich dawkach, proporcjach i terminach (Kocoń 2005). Różnicowany zakres stosowania azotu uwarunkowany jest wieloma czynnikami. Do jednego z nich należy czynnik odmianowy (genetyczny). Z badań przeprowadzonych przez Sułek i Mazurka (2001) wynika, iż odmiany pszenicy jarej w zależności od reakcji na nawożenie azotem można podzielić na dwie grupy. Do pierwszej z nich zaklasyfikować można odmiany, które w reakcji na nawożenie dużą dawką azotu znacznie wyżej plonowały (KOC 4898 i Triso), natomiast drugą grupę stanowiły odmiany reagujące zwykłą plonem na średnią dawkę azotu (NAD 297, KOC 4297, KOC 4497, KOH 797, KOH 997, STRG 109/94, SW 32470). Odmiany

reagujące na duże dawki azotu istotnie zwiększyły liczbę ziaren z rośliny i kłosa oraz wzrastało rozkrzewienie produkcyjne. Z kolei odmiany z grupy drugiej reagowały zwiększeniem elementów struktury plonu przy średniej dawce azotu oraz utrzymały je przy zwiększeniu tej dawki. Jarecki i in. (2016) stwierdzili, że wzrost dawki nawożenia azotem z 80 do 120 kg N·ha⁻¹ wpływała na zwiększenie plonu ziarna, liczbę kłosów na jednostce powierzchni, masę tysiąca nasion oraz zawartość białka. Z badań przeprowadzonych przez Cacak-Pietrzak i Sułek (2007) wynika, że pod wpływem zwiększonej dawki azotu uzyskano wyższe plony ziarna pszenicy jarej. Jednak w wieloletnim doświadczeniu wazonowym, niezależnie od sezonu wegetacyjnego najwyższej plonowały odmiany Hewilla, Raweta oraz ród NAD 403. W roku 2005 jedynie u odmiany Raweta stwierdzono efektywne wykorzystanie najwyższej dawki N (3,6 g/wazon). W kolejnym roku podobny efekt zaobserwowano u odmiany Hewilla. Pozostałe odmiany reagowały zwiększonym plonem jedynie do średniej dawki N (2,4 g/wazon).

Na duże znaczenie czynnika odmianowego w nawożeniu azotem pszenicy jarej wskazują także wyniki badań uzyskane przez Gąsiorowską i Makarewicza (2004). Autorzy w trakcie dwuletniego okresu uprawy czterech odmian pszenicy jarej (Banti, Henika, Jasna, Eta), uzyskali najwyższy plon ziarna pszenicy jarej stosując nawożenie azotem w ilości 160 kg N·ha⁻¹ (Tab.1). Również Biskupski i in. (2007) wskazują na duże znaczenie nawożenia azotem pszenicy jarej, zwłaszcza w przypadku nowych odmian, gdzie nie do końca poznana jest agrotechnika, a zwłaszcza optymalny poziom nawożenia tym pierwiastkiem.

Tab. 1. Plon ziarna pszenicy jarej w zależności od dawki azotu (Gąsiorowska, Makarewicz 2004).

Rok	Odmiana	Nawożenie azotem (kg·ha ⁻¹)					Średnio
		0	40	80	120	160	
2001	Banti	3,10	3,90	4,77	5,22	5,54	4,51
	Henika	3,16	3,95	4,57	5,02	5,31	4,40
	Jasna	3,32	4,16	4,92	5,36	5,69	4,69
	Eta	3,18	4,27	4,70	5,44	5,72	4,66
Średnio		3,17	4,07	4,74	5,26	5,57	4,56
2002	Banti	2,74	3,71	4,65	5,04	5,35	4,30
	Henika	3,04	3,62	3,87	5,03	5,08	4,13
	Jasna	2,97	3,93	4,47	5,06	5,17	4,32
	Eta	3,10	3,83	4,09	4,93	5,49	4,29
Średnio		2,96	3,73	4,27	4,94	5,27	4,23

Buczek i in. (2011) prowadzili badania dotyczące poziomu nawożenia pszenicy odmiany Kandela, gdzie stosowano dwie technologie uprawy, tj.: średnio intensywną (A1) i intensywną (A2). Autorzy uzyskali wyższy plon ziarna przy zastosowaniu wyższego poziomu nawożenia azotem (120 kg N·ha⁻¹). W tych badaniach zaobserwowano wzrost plonu ziarna, wraz ze wzrostem wartości cech struktury łanu takich jak: liczba kłosów i masa tysiąca nasion (MTZ). Zwiększenie plonu proporcjonalnie do wzrostu dawki nawożenia azotem pszenicy jarej stwierdzili również Gąsiorowska i in. (2006). Konkluzją prowadzonych przez autorów badań, było stwierdzenie, iż zwiększenie dawki nawożenia pszenicy jarej azotem (od 40 do 160 kg N·ha⁻¹) powoduje istotne zwiększenie poziomu plonowania. Natomiast badania Borkowskiej i in. (2002) wskazują, że dopiero zastosowanie wysokiej dawki azotu w ilości 150 kg N·ha⁻¹ powoduje zwiększenie plonu pszenicy jarej o 0,21 t·ha⁻¹. Podobną tendencję zauważyli Panasiewicz i in. (2011) w przypadku jarej formy pszenicy twardej. Autorzy uzyskali najwyższy plon pszenicy na obiektach, gdzie zastosowano dawkę 150 kg N·ha⁻¹. Przeciwnie wyniki dały badania przeprowadzone przez Borkowską i in. (2002), które wykazały niewielki wpływ nawożenia azotem na plonowanie pszenicy jarej. Jedynie w jednym roku badań zastosowanie wyższej (150 kg N·ha⁻¹) dawki spowodowało istotny wzrost plonów, kiedy to w porównaniu do dawki

50 kg N·ha⁻¹ uzyskano plon wyższy o 0,66 t·ha⁻¹. Również w badaniach przeprowadzonych przez Biskupskiego i in. (2007) nie stwierdzono istotnych różnic w plonowaniu pszenic jarych przy zastosowaniu różnych poziomów nawożenia azotem (80 i 120 kg N·ha⁻¹). Wyniki te spowodowane mogą być warunkami pogodowymi w jakich uprawiane były rośliny, a w szczególności niedoborami wody, które powodują znaczne obniżenie pobrania azotu z gleby.

Badania Dreslera i in. (2010) potwierdzają zależność pomiędzy zwiększoną dawką azotu a wzrostem plonu ziarna pszenicy jarej. Autorzy zaobserwowali wzrost wielkości plonu ziarna przy nawożeniu 120 kg N·ha⁻¹, który wynosił 5,6 t·ha⁻¹ i był wyższy o 2,06 t·ha⁻¹ w stosunku do obiektu kontrolnego. Również wyniki badań Wojciechowskiego (2005) wykazały, że wyższy poziom nawożenia azotem wpłynął na sukcesywny oraz istotny statystycznie wzrost plonowania pszenicy. Najniższy plon ziarna pszenicy autor uzyskał z obiektu kontrolnego. Poza tradycyjnym, dogłębowym systemem nawożenia upraw pszenicy jarej, możliwe jest także zastosowanie nawożenia dolistnego, które uzasadnione jest zwłaszcza w warunkach suszy. Wtedy utrudnione jest pobranie azotu poprzez system korzeniowy, a dolistne nawożenie pozwala uzupełnić dawkę azotu. W badaniach Gąsiorowskiej i Makarewicz (2008) zastosowano dwa sposoby nawożenia. Najwyższy plon ziarna pszenicy jarej uzyskano z plantacji nawożonej azotem w dawce 150 kg N·ha⁻¹, natomiast podzielenie dawki azotu na dwa sposoby nawożenia tradycyjny w ilości 60 kg N·ha⁻¹ i nawożenie dolistne był niższy jedynie o 0,6 t·ha⁻¹.

5. Wpływ dawki azotu na jakość plonu

Ziarno pszenicy w znaczącym stopniu wykorzystywane jest głównie do przerobu na mąkę, która z kolei służy jako surowiec do wypieku pieczywa. Jakość ziarna uzależniona jest od wielu czynników, do których poza odmianą i warunkami meteorologicznymi należy również nawożenie azotem. Z tego względu, dotychczas prowadzono szereg badań nad wpływem dawki nawożenia azotem na przydatność technologiczną ziarna (Cacak-Pietrzak i in. 1999, Gooding i Smith 1998, Hevia i Fuenzalida 1988, Knapp i Harms 1988). W wyniku wzrostu dawki N obserwuje się wzrost ogólnej zawartości białka (Chrzanowska-Drożdż i in. 1999, Mazurek i Sułek 1999). W badaniach jakie przeprowadzili Ralcewicz i Knapowski (2004) stwierdzono istotną dodatnią korelację pomiędzy nawożeniem azotem, a zawartością białka ogólnego. Mazurek i Sułek (1999) przy zwiększeniu nawożenia N do 80 t·ha⁻¹ uzyskali wzrost zawartości białka w ziarnie pszenicy o 2%. Badania tych samych autorów także udowadniają, iż zawartość białka związana jest z poziomem nawożenia azotem. Największy wzrost zawartości białka w tych badaniach stwierdzono u rodu NAD 297. Niezależnie od odmiany różnica między najniższym, a najwyższym nawożeniem w zakresie zawartości białka w ziarnie wynosiła 5,2 %. Podobne wyniki uzyskali Wróbel i Szempliński (1999). W ich badaniach zastosowanie dawki 160 kg N·ha⁻¹ spowodowało wzrost zawartości białka o 3%, a glutenu mokrego o 13% w porównaniu do obiektu kontrolnego. Natomiast Podolska (2008) stwierdziła, że zastosowanie 120 kg N·ha⁻¹ trzy razy w okresie wegetacji pszenicy w dawkach po 40 kg N·ha⁻¹ powodowało wzrost zawartości białka i glutenu w porównaniu z taką samą dawką zastosowaną dwukrotnie po 60 kg N·ha⁻¹.

6. Podsumowanie

Azot jest ważnym pierwiastkiem wpływającym na plonowanie i jakość ziarna pszenicy jarej. Na podstawie analizowanej literatury wnioskować można, że nie tylko sama dawka azotu, ale także sposób jej podziału w czasie wegetacji wpływa na efektywność wykorzystania tego pierwiastka. W dążeniu do pozyskania wysokiego plonu ziarna o dobrej jakości nie należy zapominać o tym, że ewentualne nie wykorzystanie azotu przez rośliny może prowadzić do jego wymywania do wód gruntowych, a tym samym do eutrofizacji wód powierzchniowych i niekorzystnego wpływu na środowisko naturalne. Nie bez znaczenia jest także aspekt ekonomiczny nawożenia, gdyż jest ono jednym z głównych czynników generujących koszty uprawy pszenicy.

7. Literatura

Achremowicz B, Podgórska E, Styk B (1989) Wpływ wysokich dawek NPK na fizyczne i technologiczne właściwości ziarna pszenicy. Zesz. Probl. Post. Nauk Rol. 354: 15-21.

- Biskupski A, Kaus A, Włodek S i in. (2007) Zróżnicowane nawożenie azotem a plonowanie i wybrane wskaźniki architektury łanu kilku odmian pszenicy jarej. *Inżynieria Rolnicza* 3(91): 29-36.
- Borkowska H, Grundas S, Styk B (2002). Wysokość i jakość plonów niektórych odmian pszenicy jarej w zależności od nawożenia azotowego. *Annales UMCS, Sec. E.* 57: 99-103.
- Buczek J, Bobrecka-Jamro D, Jarecki W (2011) Plon i jakość ziarna wybranych odmian pszenicy jarej w zależności od dawki i terminu stosowania azotu. *Frag. Agron.* 28(4): 7-15
- Cacak-Pietrzak G, Sułek A (2007) Wpływ poziomu nawożenia azotem na plonowanie i jakość technologiczną ziarna pszenicy jarej. *Biul. IHAR* 245: 47-55.
- Cacak-Pietrzak G, Ceglińska A, Haber T (1999) Wartość technologiczna wybranych odmian pszenicy ozimej w zależności od zróżnicowanego nawożenia azotem. *Pam. Puł.* 262: 81-91
- Chrzanowska-Drożdż B, Jasińska Z, Gil Z (1999) Ocena jakościowa ziarna pszenicy jarej w siewach czystych i mieszankach odmian. *Pam. Puł.* 118: 67-75.
- Dresler S, Bednarek W, Tkaczyk P (2010) Plonowanie pszenicy jarej w zależności od niektórych właściwości gleby i zabiegów agrotechnicznych. *Acta Agrophysica*, 16(1): 15-24
- Fotyma E, Fotyma M (2005) Parametry modelu optymalizacji dawek azotu pod pszenicę ozimą. *Naw. Nawoż./Fert. Fertiliz.* 1: 83-89.
- Garrido-Lestache E, Lopez-Bellido RJ, Lopez-Bellido L (2004) Effect of N rate, timing and splitting and N type on bread-making quality in hard red spring wheat under rainfed Mediterranean conditions. *Field Crop Res.* 85: 213-236.
- Ğasiorowska B, Makarewicz A (2004) Wpływ nawożenia azotowego na plonowanie pszenicy jarej. *Annales UMCS, Sec. E.* 59(2): 713-719.
- Ğasiorowska B, Makarewicz A, Nowosielska A i in. (2006) Efektywność produkcyjna nawożenia azotem różnych odmian pszenicy jarej. *Pam. Puł.* 142: 117-125.
- Gondek K, Gondek A (2010). Wpływ nawożenia mineralnego na plonowanie i zawartość wybranych makro i mikroelementów w pszenicy jarej. *Journal of Research and Applications in Agricultural Engineering*, 55(1): 30-36.
- Gooding MJ, Smith G. P. 1998. The potential to use climate, variety and nitrogen relationships to optimize wheat quality. *Short Communications Fifth ESA congress:* 229-230
- Heva H, Fuenzalida P.J (1988) Effect of nitrogen fertilizers on bread-making quality and protein content of spring wheat cv. Onda. II. Timing of nitrogen application. *Agri Ciencia.* 4(1): 27-34.
- Jarecki W, Bobrecka-Jamro D, Jarecka A (2016). Reakcja pszenicy jarej na zróżnicowane nawożenie azotowe oraz dokarmianie dolistne. *Acta Agrophysica*, 23(1): 39-50.
- Jaśkiewicz B (2014). Wpływ nawożenia azotem na plonowanie i zawartość białka w ziarnie odmian pszenżyta ozimego. *Fragm. agron.* 31(1): 25–31.
- Knapp JS, Harms CL (1988) Nitrogen fertilization and plant growth regulator effects on yield and quality of four wheat cultivars. *J. Prod. Agric.* 1(2): 94-98
- Kocoń A (2005) Nawożenie jakościowej pszenicy jarej i ozimej a plon i jakość ziarna . *Pam . Puł .* 139: 55–64 .
- Mazurek J, Sułek A (1999) Wpływ różnych dawek i techniki nawożenia azotem na plon i cechy jakościowe ziarna pszenicy jarej. *Pam. Puł.* 118: 271-274.
- Panasiewicz K, Koziara W, Sulewska H (2011) Produkcyjność azotu w uprawie pszenicy twardej jarej (*Triticum durum* Desf.). *Nauka Przyroda Technologie.* Tom 5, Zesz. 2: 1-7
- Podolska G (2008) Wpływ dawki i sposobu nawożenia azotem na plon i wartość technologiczną ziarna odmian pszenicy ozimej. *Acta Scientiarum Polonorum. Agricultura*, 7(1): 57-65.
- Ralcewicz M, Knapowski T (2004) Wpływ zróżnicowanego nawożenia azotem na wielkość plonu i wartość technologiczną pszenicy jarej. *Annales UMCS, Sec. E.* 59(2): 969-678.
- Sułek A, Podolska G, Leszczyńska D i in. (2007) . Reakcja zbóż na nawożenie azotem . *Studia i Raporty IUNG-PIB .* 9: 29–36 .
- Sułek A, Mazurek J (2001). Wpływ podstawowych czynników agrotechnicznych na plon i cechy plonotwórcze nowych odmian pszenicy jarej. *Biul. IHAR.* 220: 59-67.

- Sulek A, Podolska G (2008). Plonowanie i wartość technologiczna ziarna pszenicy jarej odmiany Nawra w zależności od dawki i terminu stosowania azotu. *Acta Sci. Pol., Agricultura*, 7(1), 103-110.
- Sulek A, Podolska G, Leszczyńska D i in. (2007) Reakcja zbóż na nawożenie azotem. *Studia i Raporty IUNG – PIB*. 9: 29-36.
- Suwara I (2010) Rola wieloletniego nawożenia w kształtowaniu wybranych właściwości gleby lekkiej ze szczególnym uwzględnieniem stosunków wodno-powietrznych . Wyd . SGGW Warszawa, Rozpr . Nauk . Monogr .
- Urban S (2015). Zmiany w produkcji pasz treściwych w Polsce. *Roczniki Naukowe SERiA XVII* (5): 307-311.
- Wojciechowski W (2005) Reakcja pszenicy jarej odmiany Torka na nawożenie azotem w warunkach przyorywania międzyplonów ścierniskowych. *Biul. IHAR*. 237/238: 23-30.
- Wróbel E, Szempliński W (1999) Plonowanie i wartość technologiczna ziarna pszenicy ozimej nawożonej zróżnicowanymi dawkami azotu. *Pam. Puł*. 118: 463-469