

UNIWERSYTET OPOLSKI

Instytut Chemii

PRACA DOKTORSKA

Anna Kafka

ZASTOSOWANIE BADAŃ FOSFOROMICZNYCH W OCENIE KONDYCJI ROŚLIN

PHOSPHOROMIC STUDY IN EVALUATION OF PLANT METABOLICS CONDITION

Praca napisana pod kierunkiem **Prof. dra hab. Jacka Lipoka – promotor Dr Doroty Wieczorek – promotor pomocniczy**

Opole 2024

"Nie można zmusić ziarna do rozwoju i kiełkowania. Można jedynie stworzyć warunki pozwalające na to, aby ziarno rozwinęło wszystkie tkwiące w nim możliwości" C. Rogers

Składam serdeczne podziękowania mojemu Promotorowi Panu prof. dr. hab. Jackowi Lipokowi za przekazaną wiedzę, nieocenione wsparcie, opiekę naukową i niezliczone godziny rozmów podczas powstawania niniejszej pracy.

Szczególne podziękowania kieruję do mojej Promotor pomocniczej Pani dr Doroty Wieczorek za poświęcony czas, opiekę merytoryczną i nieustającą motywację oraz do Pani dr Beaty Żyszki-Haberecht za efektywną współpracę w prowadzonych badaniach i budowanie koleżeńskiej atmosfery.

Pragnę podziękować także wszystkim obecnym i byłym pracownikom Katedry Farmacji i Chemii Ekologicznej za okazaną mi życzliwość.

Na zakończenie pragnę podziękować Rodzinie i Przyjaciołom, których rola w moim życiu jest nieoceniona.

Dla Rodziców i Bartka

Spis treści

Wykaz skrótów	7
I Wstęp	11
1 Związki fosforu i ich rola w metabolizmie roślin	11
1.1 Nieorganiczne pochodne fosforu występujące w roślinach	12
1.1.1 Pochodne kwasu fosforowego(V) (ortofosforany) – podstawowa forma	
występowania połączeń fosforu w roślinach	12
1.1.1.1. Pobieranie, transport, magazynowanie i remobilizacja Pi w roślinach.	13
1.1.1.2. Znaczenie Pi w metabolizmie roślin	16
1.1.2 Udział di- i polifosforanów w metabolizmie roślin	19
1.1.3 Wpływ pochodnych kwasu fosforowego(III) (fosforyn) na gospodarowanie	
fosforem przez rośliny	20
1.2 Organiczne formy fosforu występujące w tkankach roślin	21
1.2.1 Fosforanowe pochodne cukrów	21
1.2.2 Kwas fitynowy i fityniany	22
1.2.3 Nukleotydy i kwasy nukleinowe	24
1.2.3.1. Nukleotydy – metabolizm, rola i pochodne	24
1.2.3.2. Kwasy nukleinowe	30
1.2.4 Ufosforylowane białka	31
1.2.5 Fosfolipidy	33
1.2.6 Fosfoniany	35
2 Kondycja fizjologiczna roślin i metody jej oceny	36
2.1 Czynniki wpływające na wybrane aspekty fizjologii roślin	36
2.2 Wskaźniki stosowane w ocenie kondycji roślin	38
2.3 Fosforomika – nowe podejście w badaniach przemian metabolicznych fosforu	40
II Cel pracy	42
III Metodyka	43
1 Materiał badawczy i odczynniki	43
2 Warunki prowadzenia eksperymentów	45
2.1 Określenie wpływu warunków oświetlenia na kiełkowanie i kondycję kiełków	
rzodkiewki	45
2.2 Ustalenie wpływu dodatku jonów metali na kiełkowanie i kondycję kiełków	
rzodkiewki	46
2.3 Określenie wpływu preparatów fungicydowych na kiełkowanie oraz kondycję	10
kiełków i siewek ogórka	48
3 Wyodrębnianie ekstrahowalnych nieorganicznych i organicznych form fosforu	50
4 Okreslenie profili fostorowych ekstraktów roslinnych techniką ³¹ P NMR	51
5 Oznaczenie zawartości fosforu nieorganicznego	52
6 Pomiar całkowitej zawartości białka i aktywności enzymatycznej kwaśnej fitazy	53
/ Uznaczenie zawartości wybla stałća z dowina z wsłu (ATD, ADD, AMD) wstała	54
8 Okresienie zawartości nukleotydow adeninowych (ATP, ADP, AMP) metodą	Г 4
Wysokosprawnej chromatografii cieczowej	54
9 Pomiar zawartości parwnikow fotosyntetycznych	55
10 Okresienie zawartości antyoksydaniow (w tym związkow feliolowych i nawonoldow	√)
10.1 Drzygotowanie wodnych ekstraktów z materiału roślinnego	
10.1 F12ygotowalite wouliycli eksilaktow 2 iliateriafu fosilililego	
10.2 Politikai Catkowitej Zawałtości flawopoldów 10.3 Domiar całkowitej zawartości flawopoldów	
10.4 Domiar ogólnaj zawartości zwiazków przeciwytloniających	
10.7 I omiar ogomej zavariosci związkow pizeciwuliemających	
11 Analiza statystyczna	

IV Omówienie i dyskusia wyników
1 Charakterystyka fosforomu nasion badanych roślin 59
1 1 Zawartość nieorganicznych form fosforu w nasionach wybranych roślin 59
1.2 Analiza speciacyina fosforu w badanych nasionach roślin 60
1 3 Naturalne fosfoniany obecne w nasionach roślin
1.4 Podsumowanie
2 Kondycja roślin rozwijających się w optymalnych warunkach wzrostu 68
2 1 Drofile fosforowe roślin rozwijających się w optymanych warunkach wzrostu
2.2 7 miany zawartości Di kwasu fitypowego aktywności enzymatycznej fitaz oraz
zawartości hiałka w hadanych gatunkach roślin rozwijających się w warunkach
ontymalnych
2 3 7 miany w zawartości nukleotydów adeninowych w roślinach rozwijających się w
ontymalnych warunkach wzrostu 72
2 / Profile wzrostu 7/
2.5 Zawartość barwników fotosyntetycznych w kiełkach rzodkiewki i siewkach ogórka
rozwijających się w optymalnych warunkąch wzrostu 75
2.6.7 miany aktywności przeciwutleniającej i zawartości antyoksydantów w tym
związków fenolowych i flawonoidów w kiełkach rzodkiewki oraz siewkach ogórka
rozwijających się w warunkach optymalnych 76
3 Wpływ warunków oświetlenia na kiełkowanie i kondycie kiełków rzodkiewki 79
3 1 Profile fosforowe kiełków rzodkiewki rozwijających się w różnych warunkach
oświetlenia
3 2 Zmiany zawartości Pi aktywności enzymatycznej fitaz oraz zawartości białka w
kiełkach rzodkiewki
3.3 Zmiany w zawartości nukleotydów adeninowych i status metaboliczny kiełków
rzodkiewki rozwijających się w różnych warunkąch oświetlenia.
3.4 Profil wzrostu
3.5 Zawartość barwników fotosyntetycznych
3.6 Zmiany aktywności przeciwutleniającej i zawartości antyoksydantów, w tym
zwiazków fenolowych i flawonoidów, w kiełkach rozwijających się w różnych
warunkach oświetlenia
3.7 Podsumowanie
4 Wpływ jonów metali na kiełkowanie i kondycję kiełków rzodkiewki
4.1 Profile fosforowe kiełków rzodkiewki rozwijających się w podłożu z dodatkiem
wybranych jonów metali102
4.2 Aktywność fitaz i zmiany zawartości Pi w kiełkach rzodkiewki105
4.3 Zmiany w zawartości nukleotydów adeninowych i status metaboliczny kiełków
rzodkiewki rozwijających się w różnych warunkach oświetlenia
4.4 Profil wzrostu113
4.5 Zawartość barwników fotosyntetycznych114
4.6 Zmiany aktywności przeciwutleniającej i zawartości antyoksydantów, w tym
związków fenolowych i flawonoidów, w kiełkach rozwijających się w różnych
warunkach oświetlenia116
4.7 Podsumowanie121
5 Wpływ preparatów fungicydowych na kiełkowanie i kondycję siewek ogórka124
5.1 Wariant 1 – przedsiewne zaprawianie nasion ogórka
5.1.1 Profile fosforowe kiełkujących nasion ogórka rozwijających się w podłożu z
dodatkiem preparatów fungicydowych126
5.1.2 Wpływ środków grzybobójczych na zawartość Pi, kwasu fitynowego,
aktywność fitazy oraz zawartość białka w ekstraktach z kiełkujących nasion ogórka

5.1.3 Wpływ preparatów fungicydowych na zmiany zawartości nukleotydów	
adeninowych i wartości parametru AEC w kiełkujących nasionach ogórka	130
5.1.4 Wpływ środków grzybobójczych na dynamikę kiełkowania nasion ogór	133
5.2 Wariant 2 – aplikacja dolistna	134
5.2.1 Profile fosforowe nadziemnych części siewek ogórka traktowanych	
preparatami grzybobójczymi	134
5.2.2 Zmiany w zawartości nukleotydów adeninowych i status metaboliczny s	iewek
ogórka traktowanych preparatem fungicydowym	136
5.2.3 Zmiany zawartości barwników fotosyntetycznych w siewkach ogórka	
traktowanych preparatem fungicydowym	139
5.2.4 Zmiany aktywności przeciwutleniającej i zawartości antyoksydantów, w	tym
związków fenolowych i flawonoidów w siewkach ogórka traktowanych prepa	ratem
fungicydowym	141
5.3 Podsumowanie	143
V Wnioski	146
Streszczenie	147
Summary	150
Bibliografia	153
Dorobek naukowy	170

Wykaz skrótów

³¹ P NMR	fosforowy magnetyczny rezonans jądrowy
6PG	6-fosfoglukonian
10F-THF	tetrahydrofolian 10-formylu, 10-formylotetrahydrofolian
ABTS	kwas 2,2'-azyno-bis(3-etylobenzotiazolino-6-sulfonowy)
Ac-CoA	acetylokoenzym A
ACN	acetonitryl
ADP	adenozyno-5'-difosfororan
ADP-Glc	ADP-α-D-glukoza
AEC	adenylowy ładunek energetyczny
AICAR	rybonukleotyd 5-aminoimidazolo-4-karboksyamidu
AIR	rybonukleotyd 5'-aminoimidazolu
AMP	adenozyno-5'-monofosforan
Asp	kwas asparaginowy
ATP	adenozyno-5'-trifosforan
C1	kompleks I
C3	kompleks III
CAIR	rybonukleotyd 5'-aminoimidazolo-4-karboksylowy
cAMP	cykliczny adenozyno-3',5'-monofosforan
CDP	cytydyno-5'-difosforan
CDP-DAG	cytydynodifosforan diacyloglicerolu
CE-MS	elektroforeza kapilarna sprzężona ze spektrometrią mas
cGMP	cykliczny guanozyno-3',5'-monofosforan
CHAPS	3-[(3-cholinoamidopropylo)dimetyloamino]-1-propanosulfonian
CMP	cytydyno-5'-monofosforan
CP	karbamoilofosforan
CPS	cykli na sekundę (<i>ang.</i> cycles per second)
CTP	cytydyno-5'-trifosforan
dADP	deoksy-ADP
DAG	diacyloglicerol
dAMP	deoksy-AMP
dATP	deoksy-ATP
dCDP	deoksycytydyno-5'-difosforan
dCTP	deoksy-CTP
dGDP	deoksyguanozyno-5'-difosforan
DGK	kinaza DAG
DGPP	pirofosforan diacyloglicerolu
dGTP	deoksyguanozyno-5'-trifosforan
DHAP	fosfodihydroksyaceton
DHO	dihydroorotan
diPGA	1,3-bisfosfoglicerynian

dNDP	difosforan deoksyrybonukleozydu
dNTP	trifosforan deoksyrybonukleozydu
DPPH.	rodnik 2,2-difenylo-1-pikrylohydrazylu
dTMP	deoksytymidyno-5'-monofosforan
dTTP	deoksytymidyno-5'-trifosforan
F2,6BP	fruktozo-2,6-bisfosforan
F6P	fruktozo-6-fosforan
FAICAR	rybonukleotyd 5-formamidoimidazolo-4-karboksyamidu
FAD/FADH ₂	dinukleotyd flawinoadeninowy (forma utleniona/zredukowana)
FBP	fruktozo-1,6-bisfosforan
FFA	wolne kwasy tłuszczowe
FGAM	rybonukleotyd formyloglicynoamidyny
FGAR	rybonukletyd formyloglicynoamid
FI-ICR	cyklotronowy rezonans jonów z transformacją Fouriera
FMN	mononukleotyd flawinowy
FR	światło dalekiej czerwieni
G1P	glukozo-1-fosforan
G3P	aldehyd 3-fosfoglicerynowy, trioza-P
G6P	glukozo-6-fosforan
GMP	guanozyno-5'-monofosforan
Gln	glutamina
Gly	glicyna
GAR	rybonukleotyd glicynoamidu
GDP-Fuc	GDP-β-L-fukoza
GAE	kwas galusowy
GABA	kwas γ-amino-N-masłowy
GC-MS	chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas
GA	kwas giberelinowy
H ⁺ -ATPaza	fosfohydrolaza ATP (transportująca H ⁺)
HAP	kwaśna fosfataza histydynowa
HPTLC	wysokosprawna chromatografia cienkowarstwowa
IMP	inozyno-5'-monofosforan
Ins(1,3,4,5,6)P ₅	1,3,4,5,6-pentafosforan <i>mio</i> -inozytolu
$Ins(3)P_1$	mio-inozytolo-3-fosforan
Ins(3,4,6)P ₃	mio-inozytolo-3,4,6-trisfosforan
InsP	fosforan inozytolu
InsP ₂	mio-inozytolo-1,4-bisfosforan
$InsP_6$	kwas <i>mio</i> -inozytolo-1,2,3,4,5,6-heksakisfosforowy
IP_3	inozytolo-1,4,5-trifosforan
LC-MS	chromatografia cieczowa sprzężona ze spektrometrią mas
L-PC	lizo-fosfatydylocholina

MDA	dialdehyd malonowy
MDH	dehydrogenaza jabłczanowa
MHCA	macierzowa analiza skupień hierarchicznych (<i>ang.</i> matrix hierarchical cluster analysis)
mRNA	informacyjny RNA (<i>ang.</i> messenger RNA)
MS	spektrometria mas
NAD ⁺ /NADH	dinukleotydy nikotynoamidoadeninowy (forma utleniona/zredukowana)
NADP ⁺ /NADPH	fosforan dinukleotydu nikotynoamidoadeninowy (forma utleniona/zredukowana)
NADP-G3P	niefosforylująca dehydrogenaza gliceraldehydo-3-fosforanu
NCA	N-karbamoiloasparaginian
ND(NADH)	roślinna, specyficzna dehydrogenaza NAPH
NDP	difosforan rybonukleozydu
NMR	spektrometria magnetycznego rezonansu jądrowego
NTP	trifosforan rybonukleozydu
OA	kwas orotowy
OMP	kwas orotydyno-5'-fosforowy
OOA	szczawiooctan
Р	fosfor
PA	kwas fosfatydowy
PAK	kinaza kwasu fosfatydowego
PAL	liaza fenyloalaninowa amoniaku
PAP	purpurowa kwaśna fosfataza
PC	fosfatydylocholina
PE	fosfatydyloetanoloamina
PEP	fosfoenolopirogronian
PEPC	karboksylaza fosfoenolopirogronianu
Pfr	forma fitochromu absorbująca światło dalekiej czerwieni (FR)
PG	fosfatydyloglicerol
PGA	3-fosfoglicerynian; kwas 3-fosfoglicerynowy
Phi	fosforyny
PHT	białkowe transportery fosforanów (ang. phosphate transporters)
Pi	fosforan; fosfor nieorganiczny; jony ortofosforanowe
PI	fosfatydyloinozytol
PI3K	3-kinaza fosfatydyloinozytolu
PI3P	fosfatydyloinozytolo-3-fosforan
PI-4-P	fosfatydyloinozytolo-4-fosforanu
PIP ₂	fosfatydyloinozytolo-4,5-bisfosforan
PLA	fosfolipaza A
PLA2	fosfolipaza A2
PLC	fosfolipaza C
PLD	fosfolipaza D
PMP	monofosforan pentozy
	·

Ро	organiczne estry fosforanowe; fosfor organiczny
PPDK	dikinaza pirogronianowo-fosforanowa
PPi	pirofosforan
PPi-PFK	fosfofruktokinaza zależna od PPi
PRA	5-fosforybozylo amina
PRPP	5-fosforybozylo-1-pirofosforan
PS	fosfatydyloseryna
Ptd-Ins	fosfatydyloinozytol
Ptd-Ins $(1,4,5)P_3$	1,4,5-trisfosforan fosfatydyloinozytolu
Ptd-Ins(4)P ₁	4-fosforan fosfatydyloinozytolu
Ptd-Ins $(4,5)P_2$	4,5-bisfosforan fosfatydyloinozytolu
PTM	modyfikacja potranslacyjna (<i>ang.</i> post-translational modification)
Q	kwercetyna
RNAza	rybonukleaza
RNR	reduktaza rybonukleotydowa
ROS	reaktywne formy tlenu
RSA	aktywność przeciwutleniająca (ang. radical scavenging activity)
Ru5P	rybulozo-5-fosforan
RuBP	rybulozo-1,5-fosforan
S7P	sedoheptulozo-7-fosforan
SAICAR	rybonukleotyd 5'-aminoimidazolo-4-N-bursztynylo-karboksyamidu
SAM	S-adenozylo-L-metionina
SAMP	adenylobursztynian
SBP	sedoheptulozo-1,7-bisfosforan
SnRK1	kinaza białkowa 1 związana z sacharozą
SUS	syntaza sacharozy
T6P	trehalozo-6-fosforan
TCA	cykl kwasu cytrynowego
TFC	całkowita zawartość flawonoidów (ang. total flavonoid content)
THF	tetrahydrofolian
TMP	tymidyno-5'-monofosforan
TPC	całkowita zawartość związków fenolowych (ang. total phenolic content)
TPT	białkowe transportery fosforanowe 3-fosfoglicerynianu (ang. triose phosphate translocator)
Troloks	kwas 6-hydrohy-2,5,7,8-tetrametylchromano-2-karboksylowy
UDP	urydyno-5'-difosforan
UGP-aza	UDP-glukozopirofosforylaza
UDP-Glc	UDP- α-D-glukoza
UMP	urydyno-5'-monofosforan
UQ	ubichinon
UTP	urydyno-5'-trifosforan
XMP	ksantozyno-5'-monofosforan

I Wstęp

1 Związki fosforu i ich rola w metabolizmie roślin

Wiele spośród pierwiastków występujących w przyrodzie odgrywa kluczową rolę w prawidłowym metabolizmie roślin. Najbardziej istotne – wegiel, wodór i tlen – pochodza z atmosfery, natomiast pozostałe składniki pokarmowe pobierane są przez rośliny z gleby bądź z nawozów stosowanych dolistnie [1]. Składniki pokarmowe pobierane przez rośliny w największej ilości nazywane są makroelementami i oprócz węgla, wodoru i tlenu należą do nich: azot, fosfor, potas, wapń, magnez i siarka. Pierwiastki te odpowiedzialne są nie tylko za tworzenie makrobiomolekuł, takich jak białka, polisacharydy, kwasy nukleinowe i tłuszczowce, ale pełnia także różne funkcje w przemianach metabolicznych [2]. Nie mniej istotne dla prawidłowego metabolizmu roślin są pierwiastki pobierane w znacznie mniejszej ilości – mikroelementy, do których można zaliczyć: żelazo, mangan, cynk, miedź, bor, molibden, czy nikiel. Odpowiadają one między innymi za stabilizację błon komórkowych u roślin naczyniowych, a także biorą udział w wielu różnorodnych procesach metabolicznych [3]. Ze względu na tak wiele odmiennych funkcji poszczególnych pierwiastków, zapotrzebowanie roślin na makro- i mikroelementy różni się w zależności od gatunku i fazy rozwojowej rośliny. Należy także podkreślić, że zarówno niedobór jak i nadmiar składników pokarmowych ma negatywny wpływ na fizjologie roślin.

Fosfor (P), nawet jeżeli występuje w glebie w odpowiednim stężeniu, nie zawsze jest dobrze przyswajalny przez rośliny. Wpływ na to ma jego chemiczna forma, czyli połączenie z innymi pierwiastkami. Z tego powodu fosfor uważany jest za drugi po azocie pierwiastek ograniczający wzrost roślin, gdyż odpowiada za prawidłowy przebieg wszystkich procesów fizjologicznych i biochemicznych zachodzących na każdym etapie rozwoju roślin – od kiełkowania po kwitnienie i zawiązywanie nasion [4]. Jego niedobór zwiększa też podatność roślin na choroby i dysfunkcje metaboliczne [5]. Przyjmuje się, że średnia zawartość fosforu w roślinach waha się w od 0,05% do 0,50% suchej masy. Tak szeroki zakres zawartości uwarunkowany jest różnicami gatunkowymi, fazą rozwojową oraz organami rośliny (m. in. liść, pęd, łodyga, korzeń) [4].

W tkankach roślin P występuje w jednej z dwóch postaci: niezwiązanych jonów ortofosforanowych (Pi) lub organicznych estrów fosforanowych (Po), do których zalicza się między innymi (i) fosforanowe pochodne cukrów, (ii) nukleotydy i kwasy nukleinowe oraz (iii) fosfolipidy. Istnieją dane źródłowe wskazujące, że w roślinach mogą występować także związki fosfonowe, w których atom fosforu jest bezpośrednio połączony wiązaniem kowalencyjnym z atomem węgla [6].

1.1 Nieorganiczne pochodne fosforu występujące w roślinach

1.1.1 Pochodne kwasu fosforowego(V) (ortofosforany) – podstawowa forma występowania połączeń fosforu w roślinach

Podstawową formę fosforu obecną we wszystkich organizmach żywych stanowi fosfor nieorganiczny w postaci fosforanów (Pi). Fosforany reprezentują jony kwasu fosforowego(V) (H₃PO₄), w którym atom fosforu znajduje się na najwyższym +5 stopniu utlenienia. Dzięki unikatowym właściwościom chemicznym to właśnie fosforany pełnią kluczową rolę w metabolizmie roślin. Pi występuje w środowisku w formie różnych jonów: PO₄³⁻, HPO₄²⁻, H₂PO₄⁻ [7,8], co zależy przede wszystkim od odczynu (pH) roztworu (Rysunek 1.).



Rysunek 1. Wykres przedstawiający zależność występowania poszczególnych form fosforanów (PO₄³⁻, HPO₄²⁻, H₂PO₄⁻, H₃PO₄) od pH roztworów wodnych. Zacieniony obszar przedstawia fizjologiczny zakres pH w tkankach roślin, wskazując główne formy występującego Pi.

Ponieważ skład jonowy roślinnych płynów ustrojowych w komórkach (cytozol), tkankach ksylemu i łyka (soki łyka i ksylemu) oraz przestrzeniach międzykomórkowych i apoplastycznych, determinowany jest procesami fizycznymi (np. wymianą gazową, potencjałem błonowym) oraz chemicznymi (np. dysocjacją) [9] wartości pH płynów fizjologicznych roślin wahają się w przedziale od 6 do 8 [10–12]. Różnice w wartości pH poszczególnych tkanek roślinnych oraz fluktuacje tych wartości w obrębie danej tkanki, determinują charakter jonowy Pi. Przyjmuje się, że dominującą formę fosforanów stanowią jony H₂PO₄⁻ oraz HPO₄²⁻, które występują w różnych relacjach ilościowych. Jony te stanowią także główne formy fosforu pobieranego przez rośliny z roztworu glebowego [13].

1.1.1.1. Pobieranie, transport, magazynowanie i remobilizacja Pi w roślinach

Pobieranie fosforu przez rośliny może odbywać się na dwa sposoby: bezpośrednio przez system korzeniowy roślin [14] lub pośrednio poprzez symbiotyczne grzyby mikoryzowe [15]. Ponieważ stężenie Pi w roztworze glebowym (1 – 10 µM) [16] jest znacznie niższe niż w komórkach roślinnych (5 – 20 mM) [17], a dodatkowo po wewnętrznej stronie błony plazmatycznej występuje ujemny ładunek netto (około -120 mV) [18], transport anionów fosforanowych komórek korzeni pokonania do wymaga silnego gradientu elektrochemicznego. W procesie tym pośredniczą białkowe transportery fosforanów (PHT, ang. phosphate transporters), głównie PHT1, które obecne są w błonie plazmatycznej komórek ryzodermalnych – trichoblastów, oraz w mniejszym stopniu w komórkach korowych [7,18]. Transport Pi przez PHT1 jest zależny od energii i ściśle związany z aktywnością plazmolemowej pompy protonowej H⁺-ATPazy (fosfohydrolaza ATP H⁺), EC 7.1.2.1), która odpowiada (transportująca za tworzenie gradientu protonowego [19,20]. Powstające podczas hydrolizy adenozyno-5'-trifosforanu (ATP), katalizowanej przez H⁺-ATPazę, protony są przenoszone na zewnętrzną powierzchnię błony komórkowej, skąd następnie wraz z Pi przemieszczają się przez transportery PHT1. Wykazano, że przepływowi jednego jonu fosforanowego towarzyszy współtransport od dwóch do czterech protonów [21]. Większość białek przenośnikowych z rodziny PHT1 znajduja się w komórkach różnych tkanek i organów roślinnych [22].

Po pobraniu przez korzenie, fosfor nieorganiczny może być od razu włączony w procesy metaboliczne, między innymi poprzez utworzenie adenozyno-5'-trifosforanu lub adenozyno-5'-difosforanu (ATP/ADP) w reakcji z adenozyno-5'-monofosforanem (AMP). Jednak większość pobranego Pi jest dalej transportowana do nadziemnych części rośliny (Rysunek 2.). Kolejnym etapem na szlaku transportu Pi z gleby do pędów jest proces tak zwanego ładowania ksylemu w steli – przemieszczenia Pi z komórek naskórka i kory pierwotnej do ksylemu poprzez pasemka Caspary'ego [18]. W procesie tym pośredniczy transporter PHO1, który jest zlokalizowany w sieci aparatu Golgiego komórek parenchymatycznych korzeni [23]. Wraz z sokami ksylemu Pi przemieszczany jest w górę rośliny. W transporcie ortofosforanów do komórek pędów pośredniczą inne białka przenośnikowe typu PHT1. W komórkach pędu ortofosforany dystrybuowane są do różnych organelli komórkowych, w celu zapewnienia ich prawidłowego funkcjonowania. Transportery Pi obejmujące plastydowe nośniki PHT2 [24], mitochondrialne transportery PHT3 [25], znajdujące się w błonie aparatu Golgiego i w otoczce plastydowej przenośniki PHT4 [26]

13

oraz wakuolowy transporter fosforanowy PHT5 [27,28], odgrywają kluczową rolę w wewnątrzkomórkowej homeostazie Pi.



Rysunek 2. Schemat przebiegu procesu pobierania fosforanów przez korzenie, transportu do nadziemnych części rośliny oraz dystrybucji w organellach komórkowych. Transportery typu PHT1 odgrywają kluczową rolę w transporcie Pi, m.in. pośrednicząc w wychwycie Pi w korzeniach. PHO1 uczestniczy w szczególności w transporcie Pi na duże odległości, a PHT5 jest głównym transporterem pośredniczącym w wakuolowej sekwestracji Pi. Strzałki na rysunku oznaczają przepływ transportowy Pi, inne jony zostały pominięte.

Białka te ułatwiają wychwyt Pi, a także umożliwiają ponowną mobilizację wewnętrznego Pi pomiędzy różnymi organellami komórkowymi oraz tkankami roślin. Kluczową rolę w utrzymaniu stabilnego stężenia cytoplazmatycznego Pi w stosunku do fluktuacji zawartości fosforanów, związanej z dostępnością fosforu w środowisku bądź z aktywnością metaboliczną komórek, pełnią wakuole [29].

Wakuole, obecne w komórkach roślin odgrywają podstawową rolę w magazynowaniu i recyklingu składników odżywczych, detoksykacji oraz utrzymaniu turgoru [30,31]. Organella te stanowią swoistego rodzaju magazyn szerokiej gamy bytów chemicznych, takich jak aminokwasy, jony, połączenia metali przejściowych, białka, węglowodany, metabolity wtórne i cząsteczki sygnałowe [32]. W zależności od tkanki, głównymi formami magazynowanego fosforu w wakuolach są Pi, fosforan inozytolu (InsP) i polifosforany (PolyP). Ponadto wakuole są głównymi miejscami degradacji makrocząsteczek, ponieważ w ich wnętrzu zachodzi większość procesów hydrolitycznych. W komórkach wegetatywnych, przy wystarczającej podaży fosforu, około 70 do 95% wewnątrzkomórkowego Pi jest przechowywana w wakuolach, podczas gdy tylko 1 – 5% występuje w cytoplazmie [16,33].

Ze względu na wartość pH cytozolu, wynoszącą około 7,4, przeważającą formą fosforu są jony HPO₄²⁻, podczas gdy w wakuoli, przy pH 5,0, są to jony H₂PO₄⁻ [34]. Protonowanie HPO_4^{2-} do $H_2PO_4^{-}$ w wakuoli o kwaśnym odczynie wpływa na zwiększenie akumulacji fosforu. Pi jest eksportowany z wakuoli do cytoplazmy lub importowany z cytoplazmy do wakuoli przez białka błonowe SPX-MFS (określane jako rodzina PHT5 [28]), zgodnie z zapotrzebowaniem komórki na Pi. Nośniki PTH5 są transporterami niezależnymi od ATP i H⁺, Pi а główną siłą napędową przepływu jest gradient potencjału elektrochemicznego [32,34]. Wypływ Pi wakuoli procesem zależnym Z jest od zapotrzebowania komórki na Pi w cytoplazmie, natomiast napływ Pi do wakuoli pozwala uchronić komórkę przed niekorzystnymi efektami nadmiaru Pi [35].

Fosfor jest istotnym składnikiem biomolekuł występującym w komórkach roślinnych, w których bierze udział w rożnych procesach metabolicznych. Dlatego też utrzymanie homeostazy Pi jest niezbędne w prawidłowym przebiegu procesów fizjologicznych i biochemicznych. W przypadku niskiego stężenia przyswajalnego Pi w glebie, rośliny rozwinęły procesy adaptacyjne w celu ułatwienia skutecznego pozyskiwania i translokacji Pi, a także w celu efektywnego wykorzystania zmagazynowanego fosforu. Na wysoką efektywność wykorzystania fosforu wpływa nie tylko optymalna mobilizacja tego pierwiastka, ale również wydajna remobilizacja i redystrybucja Pi ze starzejących się tkanek [36]. Proces ten zapobiega utracie Pi w wyniku gutacji lub wycieku przez błonę plazmatyczną do apoplastu [37]. W późnych stadiach wzrostu wegetatywnego i reprodukcyjnego, kiedy liście i inne organy zaczynają się starzeć, następuje remobilizacja składników odżywczych do tkanek rozwijajacych sie, takich jak młode liście, korzenie i nasiona [37], w wyniku której następuje przeniesienie co najmniej 50% Pi [38]. Natomiast w warunkach niedoboru fosforu, w następstwie redystrybucji Pi odzysk wynosi nawet Pomimo pewnych podobieństw występujących w remobilizacji 80% [22,39]. Pi spowodowanych starzeniem się liści i tzw. głodem Pi, istnieją kluczowe różnice pomiędzy tymi procesami. Podczas gdy starzenie się liści jest zdarzeniem specyficznym dla organu, zachodzącym tylko w określonych liściach, odpowiedź na głód Pi obejmuje całą roślinę, a wyraża się specyficzną tkankową ekspresją genów i zmianami metabolicznymi [40]. Proces remobilizacji Pi wymaga skoordynowanej funkcji hormonów i czynników transkrypcyjnych w celu zainicjowania kaskad sygnałowych, co skutkuje działaniem hydrolaz, które mogą uwolnić Pi z cząsteczek zawierających P, w tym kwasów nukleinowych, fosfolipidów, fosforylowanych białek i innych metabolitów zawierających w swojej strukturze reszty fosforanowe. Istotną rolę w redystrybucji Pi odgrywają między innymi rybonukleazy

(RNazy) [41], a także enzymy przebudowujące fosfolipidy do sulfolipidów [42] oraz purpurowe kwaśne fosfatazy (PAP) [43] – enzymy katalizujące hydrolizę wiązania estrowego z uwolnieniem Pi. Wykazano, że izozym PAP jest odmiennie regulowany w procesie starzenia się liści i odpowiedzi na niedobór fosforu [44]. Po degradacji biomolekuł zawierających w swojej strukturze fosfor (Rysunek 3.), uwolniony Pi zostaje przeniesiony do tkanek rozwijających się, gdzie jest ponownie wykorzystywany do syntezy nowych makrocząsteczek lub metabolitów o niskiej masie cząsteczkowej [36]. Transport ten odbywa się głównie za pośrednictwem transporterów fosforanów z rodziny PHT1 [41].



Rysunek 3. Schemat przebiegu procesu remobilizacji fosforanów w starzejącej się komórce roślinnej z uwzględnieniem substratów, związków pośrednich i produktów końcowych rozkładu związków fosforoorganicznych (czarne strzałki). Czerwonym kolorem zaznaczono wypływ Pi z organelli komórkowych do cytozolu oraz na zewnątrz komórki.

1.1.1.2. Znaczenie Pi w metabolizmie roślin

Fosforany odgrywają kluczową rolę jako reagenty i cząsteczki efektorowe w metabolizmie komórek roślinnych. Niedobór Pi przyczynia się do zmniejszenia poziomu glukozy, pirogronianu i chlorofilu, jednocześnie powodując wzrost poziomu sacharozy i skrobi [45]. Ograniczona synteza chlorofilu u roślin rozwijających się w warunkach niedoboru Pi, doprowadza do chlorozy liści [46]. Z kolei długotrwały niedobór Pi przyczynia się do akumulacji antocyjanów w liściach, jako reakcji na stres, prowadząc w konsekwencji do purpurowych przebarwień na powierzchni tych organów [47]. Na Rysunku 4. przedstawione zostały, zależne od Pi, procesy fotosyntezy i tworzenia cukrów. Prawidłowy przebieg tych procesów jest uzależniony nie tylko od poziomu Pi, ale także od obecności wysokoenergetycznych cząsteczek, takich jak ATP, czy NADPH [48,49].



Rysunek 4. Uproszczony model obrazujący fotosyntetyczny metabolizm węgla i biosyntezy cukrów złożonych, zależnych od Pi oraz innych związków fosforoorganicznych zawierających wysokoenergetyczne wiązania. Dwa główne rozgałęzienia cyklu Calvina-Bensona prowadzą do (i) wytwarzania skrobi w chloroplastach i (ii) eksportu triozy-P do cytozolu przez zlokalizowane na wewnętrznej powłoce błony chloroplastu specyficznych transporterów TPT (*ang.* triose phosphate translocator). Transportowi triozy-Pi towarzyszy jednoczesne przeniesienie fosforanów, uwolnionych podczas syntezy sacharozy w cytozolu, do zrębu chloroplastu. 6PG – 6-fosfoglukonian; ADP – adenozyno-5'-difosfororan; ADP-Glc – ADP-α-D-glukoza; ATP – adenozyno-5'-trifosfororan; diPGA – 1,3-bisfosfoglicerynian; F2,6BP – fruktozo-2,6-bisfosforan; F6P – fruktozo-6-fosforan; FBP – fruktozo-1,6-bisfosforan; G1P – glukozo-1-fosforan; G6P – glukozo-6-fosforan; NADP⁺/NADPH – fosforan dinukleotydu nikotynoamidoadeninowy (forma utleniona/zredukowana); PGA – 3-fosfoglicerynian; Pi – fosforan; S7P – sedoheptulozo-7-fosforan; SBP – sedoheptulozo-1,7-bisfosforan; trioza-P – aldehyd 3-fosfoglicerynowy; UDP-Glc – UDP-α-D-glukoza; UTP – urydyno-5'-trifosforan.

U roślin rozwijających się w warunkach niedoboru Pi, dochodzi do zahamowania procesu fotosyntezy [45]. Zahamowanie to jest spowodowane wieloma czynnikami, między innymi: (i) obniżeniem produkcji ATP [50], (ii) inaktywacją enzymów zaangażowanych w regenerację bisfosforanu rybulozy (RuBP) [51] oraz (iii) inaktywacji enzymu karboksylazy RuBP, który katalizuje wiązanie CO₂ [52]. Ponadto, fosforany wpływają na dystrybucję węgla związanego podczas fotosyntezy (w postaci aldehydu 3-fosfoglicerynowego (trioza-P lub G3P)) kierując pierwiastek do syntezy skrobi chloroplastach bądź syntezy ten W sacharozy w cytoplazmie [45]. Niski poziom cytozolowego Pi prowadzi do zahamowania układu antyportowego trioza-Pi/Pi (TPT), w wyniku tego PGA (kwas 3-fosfoglicerynowy) jest włączany w szlak syntezy skrobi [53].

Warunki głodu fosforanowego prowadzą także do spadku aktywności fruktokinazy i heksokinazy, co skutkuje obniżeniem poziomu fosforylowanych cukrów zarówno w liściach,

jak i korzeniach [45]. Dodatkowo uaktywniane zostają alternatywne szlaki metaboliczne, które nie wymagają Pi i nukleotydów adeninowych. Przykład takich reakcji w procesie glikolizy i mitochondrialnego transportu elektronów przedstawiony został na Rysunku 5.



Rysunek 5. Schemat przedstawiający szlak glikolizy i transportu elektronowego (czarne strzałki) oraz ich alternatywny przebieg niezależny od Pi i nukleotydów adeninowych (kolorowe strzałki). Kluczowym elementem tego modelu jest wskazanie enzymów glikolitycznych zależnych od PPi i metabolicznych systemów recyklingu Pi aktywowanych w przypadku niedoboru Pi. Ac-CoA – acetylokoenzym A; ADP – adenozyno-5'-difosfororan; AMP – adenozyno-5'-monofosforan; ATP – adenozyno-5'-trifosforan; C1 – kompleks I; C3 – kompleks III; DHAP – fosfodihydroksyaceton; diPGA – 1,3-bisfosfoglicerynian; F6P – fruktozo-6-fosforan; FBP – fruktozo-1,6-bisfosforan; G1P – glukozo-1-fosforan; G3P – aldehyd 3-fosfoglicerynowy; G6P – glukozo-6-fosforan; MDH – dehydrogenaza jabłczanowa; NAD⁺/NADH – dinukleotydy nikotynoamidoadeninowy (forma utleniona/zredukowana); NADP⁺/NADPH – fosforan dinukleotydu nikotynoamidoadeninowy (forma NADP-G3P utleniona/zredukowana); niefosforylująca dehydrogenaza gliceraldehydo-3-fosforanu; ND(NADH) dehydrogenaza NAPH; OOA roślinna. specyficzna szczawiooctan: PEP – fosfoenolopirogronian; PEPC – karboksylaza fosfoenolopirogronianu; PGA – kwas 3-fosfoglicerynowy; Pi – fosforan; PPDK – dikinaza pirogronianowo-fosforanowa (EC 2.7.9.1); PPi – pirofosforan; PPi-PFK – fosfofruktokinaza zależna od PPi; SUS – syntaza sacharozy; TCA – cykl kwasu cytrynowego; UDP – urydyno-5'-difosforan; UDPG _ UDP-glukoza; UGP-aza UDP-glukozopirofosforylaza; UQ - ubichinon; UTP - urydyno-5'-trifosforan.

Kluczowym elementem tego modelu jest aktywność enzymów glikolitycznych zależnych od pirofosforanów (PPi), takich jak UDP-glukozopirofosforylaza (UGP-aza), fosfofruktokinaza zależna od PPi (PPi-PFK) oraz niefosforylująca dehydrogenaza gliceraldehydo-3-fosforanu (NADP-G3P dehydrogenaza), która katalizuje przemiany z pominięciem etapu tworzenia 1,3-bisfosfoglicerynianu (diPGA), a także zestaw enzymów przekształcających fosfoenolopirogronian w pirogronian bez udziału ADP [40,54].

1.1.2 Udział di- i polifosforanów w metabolizmie roślin

Innymi formami nieorganicznego fosforu obecnego w komórkach roślin są difosforany (PPi) oraz polifosforany (PolyP), stanowiące liniowe polimery reszt ortofosforanowych. Difosforany (inaczej pirofosforany) składają się z dwóch jednostek Pi, podczas gdy w skład polifosforanów może wchodzić 3 – 1000 reszt fosforanowych, połączonych ze sobą wysokoenergetycznymi wiązaniami bezwodnikowymi (Rysunek 6.) [55].



Rysunek 6. Jonowe formy fosforu nieorganicznego występujące w komórkach roślin.

PPi są wytwarzane jako produkt uboczny reakcji biosyntetycznych, takich jak: (i) aktywacja cukrów (np. synteza UDP-glukozy, ADP-glukozy), (ii) aktywacja aminokwasów (przyłączenie aminokwasu do transferowego RNA), (iii) aktywacja kwasów tłuszczowych (np. w reakcji tworzenia acylokoenzymu A), (iv) synteza terpenów oraz (v) reakcje elongacji w syntezie białek i kwasów nukleinowych [56]. Pomimo, iż procesy te zachodzą w cytoplazmie albo w różnych organellach subkomórkowych (jądro, chloroplasty, mitochondria, tonoplast, aparat Golgiego) [57], pirofosforany są gromadzone w cytoplazmie komórek roślinnych [58] i stanowią około 15% wszystkich związków fosforu obecnych w roślinie [59].

Powstające podczas biosyntezy PPi, w pewnych warunkach, mogą być wykorzystywane jako źródło energii. Energia uwalniana podczas hydrolizy wiązania bezwodnikowego

w cząsteczce PPi wynosi $\Delta G = -20 - -30 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ i stanowi 60–80% energii uwalnianej podczas hydrolizy ATP ($\Delta G = -35 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$) [60]. Przydatność PPi jako źródła energii zależy od adenylowanego ładunku energetycznego komórki, stężenia jonów magnezu (Mg²⁺) oraz miejsca syntezy PPi [61]. Rola PPi, jako alternatywnego źródła energii jest kluczowa przede wszystkim w warunkach stresowych, skutkujących deficytem energii, np. w warunkach niedoboru tlenu lub fosforanów [60].

PolyP stanowią ważne formy magazynowania fosforanów oraz energii i zostały zidentyfikowane w różnych organizmach pro- i eukariotycznych [62]. Aktualny stan wiedzy wskazuje, że polifosforany występują również w komórkach roślin, w których jądrach znajdują się białka wiążące PolyP oraz enzymy metabolizujących te połączenia [55]. Jednak metody stosowane w oznaczaniu PolyP, nie pozwalają na odróżnienie wolnych polifosforanów od polifosforanów inozytolu, które również występują w roślinach [63]. Do tej pory nie przypisano zdefiniowanych funkcji roślinnym polifosforanom.

1.1.3 Wpływ pochodnych kwasu fosforowego(III) (fosforyn) na gospodarowanie fosforem przez rośliny

Fosforyny (Phi) reprezentują jony kwasu fosfonowego (H₃PO₃), w którym atom fosforu znajduje się na +3 stopniu utlenienia. W odróżnieniu od reszty fosforanowej (Pi) w cząsteczce Phi, jeden z atomów tlenu związany z P jest zastąpiony atomem wodoru (Rysunek 7.) [64,65]. Podstawienie to skutkuje znaczącymi różnicami wpływającymi na zachowanie obu cząsteczek w komórkach roślin.



Rysunek 7. Porównanie struktury chemicznej jonu fosforanowego i fosforynowego.

Obecność wiązania P–H w cząsteczce fosforynów zwiększa ich stabilność w układach biologicznych. W komórkach roślin, tylko niewielka część Phi ulega utlenieniu do Pi [66], a zatem obecność Phi nie przyczynia się do znaczącego zwiększenia puli fosforu nieorganicznego w komórkach roślin [67–69]. Ponadto różnice w stopniu utlenienia, wielkości i ładunku, powodują, że Phi nie jest rozpoznawany jako substrat przez enzymy związane z metabolizmem Pi [70]. Chociaż fosforyn nie jest substratem w reakcjach enzymatycznych, inne białka takie jak transportery fosforanów (w szczególności PHT1)

lub komponenty systemu transdukcji sygnału zaangażowane w określenie statusu ilościowego Pi, nie rozróżniają Phi od Pi [65,71]. Ze względu na wyższą rozpuszczalność w roztworach wodnych, Phi jest szybciej wchłaniany i przemieszczany w roślinie niż Pi [64], a gromadzenie się niemetabolizowanego Phi w tkankach roślinnych może powodować negatywne skutki [72]. Zaburzenia homeostazy Pi związane z obecnością Phi prowadzą do zahamowania ekspresji genów zaangażowanych w reakcję rośliny na niedobór fosforu, krytyczny dla właściwego wzrostu i funkcjonowania roślin [64].

1.2 Organiczne formy fosforu występujące w tkankach roślin

Związki fosforoorganiczne obecne w organizmach żywych występują najczęściej w postaci estrów, w których reszta kwasu fosforowego(V) jest związana z cząsteczką organiczną poprzez atom tlenu (P-O-C). W zależności od budowy, związki fosforu mogą uczestniczyć w różnych przemianach metabolicznych lub łączyć się z cząsteczkami niebiorącymi aktywnego udziału w reakcjach biochemicznych. Fosfor stanowi kluczowy składnik strukturalny biomolekuł, takich jak: (i) pochodne cukrowe, (ii) fityniany, (iii) nukleotydy i kwasy nukleinowe, (iv) pochodne białek, w tym enzymy, oraz (v) fosfolipidy. Ze względu na powszechne występowanie fosforu w tych związkach, odgrywa on szczególną rolę w przemianach metabolicznych, takich jak procesy fotosyntezy, oddychania oraz metabolizm wtórny.

1.2.1 Fosforanowe pochodne cukrów

Estry fosforanowe cukrów odgrywają ważną rolę w metabolizmie komórkowym, szczególnie w procesie fotosyntezy. Rośliny przekształcają zasymilowany wegiel w szereg cukrów prostych, z których wiele służy jako prekursory do syntezy bardziej złożonych oligoi polisacharydów. Związki pośredniczące w metabolizmie weglowodanów stanowią fosforany cukru – estry Pi monosacharydów. W tkankach roślin występuje około 50 fosforanowych pochodnych cukrów, które w strukturze zawierają od 3 do 6 atomów węgla i są włączane w różne szlaki przemian węglowodanów [73]. Ditlenek węgla zasymilowany w redukcyjnym szlaku pentozofosforanowym (zwanym także cyklem Calvina-Bensona) reaguje z rybulozo-1,5-bisfosforanem, a po dalszych przemianach powstają dwie cząsteczki 3-fosfoglicerynianu [74,75], który następnie jest przekształcony do aldehydu 3-fosfoglicerynowego. G3P ulega dalszym przekształceniom, w wyniku których mogą powstać: (i) skrobia, (ii) sacharoza, (iii) aminokwasy, (iv) lipidy lub (v) nukleotydy adeninowe (Rysunek 4., Rysunek 8.) [74–76].



Rysunek 8. Ilustracja przedstawiająca znaczenie fosforanowych pochodnych cukrów w biosyntezie innych związków o znaczeniu biologicznym

Fosforanowe pochodne cukrów pełnią także ważną rolę jako cząsteczki sygnałowe, które modulują wiele procesów metabolicznych i rozwojowych w roślinach. Przykładem może być trehalozo-6-fosforan (T6P), który: (i) reguluje wykorzystanie sacharozy, (ii) reguluje metabolizm skrobi, (iii) hamuje aktywność kompleksu kinazy białkowej 1 związanej z sacharozą (SnRK1), jednocześnie dostosowując metabolizm do podaży i zapotrzebowania na energię, a także (iv) reguluje stężenie nukleotydów urydynowych [77,78].

1.2.2 Kwas fitynowy i fityniany

Na etapie reprodukcji rośliny mobilizują Pi z organów wegetatywnych do nasion, gdzie jest on przekształcany w kwas *mio*-inozytolo-1,2,3,4,5,6-heksakisfosforowy (InsP₆), powszechnie znany jako kwas fitynowy. InsP₆ powstaje w wyniku stopniowej fosforylacji *mio*-inozytolu – cyklicznej alkoholowej pochodnej glukozy [79]. Biosynteza kwasu fitynowego rozpoczyna się już kilka dni po kwitnieniu [80]. W pierwszym etapie następuje enzymatyczna konwersja glukozo-6-fosforanu do *mio*-inozytolo-3-fosforanu (Ins(3)P₁), który ulega dalszym przekształceniom (Rysunek 9.) [81]. Kolejne etapy syntezy kwasu fitynowego mogą przebiegać szlakiem niezależnym od lipidów lub rzadziej, szlakiem zależnym od lipidów [82]. Zsyntetyzowany w cytozolu kwas fitynowy jest następnie transportowany do ciałek białkowych wakuoli, gdzie zachodzi jego akumulacja [83].



Rysunek 9. Schemat biosyntezy kwasu fitynowego, przedstawiający ścieżki zależną i niezależną od lipidów, szlak rezerwowy oraz akumulację w wakuoli. Przedstawione reakcje są katalizowane przez enzymy zaliczane do różnych klas: kinazy, fosfatazy, lipazy. DAG – diacyloglicerol; G6P – glukozo-6-fosforan; Ins(3)P₁ – *mio*-inozytolo-3-fosforan; Ins(3,4,6)P₃ – *mio*-inozytolo-3,4,6-trisfosforan; Ins(1,3,4,5,6)P₅ – 1,3,4,5,6-pentafosforan *mio*-inozytolu; InsP₂ – *mio*-inozytolo-1,4-bisfosforan; Ptd-Ins – fosfatydyloinozytol; Ptd-Ins(4)P₁ – 4-fosforan fosfatydyloinozytolu; Ptd-Ins(4,5)P₂ – 4,5-bisfosforan fosfatydyloinozytolu; Ptd-Ins(1,4,5)P₃ – 1,4,5-trisfosforan fosfatydyloinozytolu.

Kwas fitynowy jest dominującą formą fosforu występującą w nasionach i pyłku, gdzie stanowi 50 – 90% całkowitego fosforu, a jego zawartość waha się w przedziale 1 – 5% suchej masy [84]. InsP₆ i mniej ufosforylowane pochodne inozytolu, ze względu na unikatową zdolność do strukture i anionowy charakter, wykazują tworzenia chelatów z wielowartościowymi kationami metali. Połączenia te, zwane fitynianami, są trudno rozpuszczalne w wodzie. Stabilność tych związków kompleksowych zależy od jonów metali tworzących wiązanie kowalencyjne z ujemnie naładowaną grupą fosforanową ($Cu^{2+} > Zn^{2+} >$ $Ni^{2+} > Co^{2+} > Mn^{2+} > Fe^{3+} > Ca^{2+}$) [80,85]. Jednak najczęściej występują chelaty kwasu fitynowego z kationami potasu, magnezu i wapnia [86]. Fityniany, oprócz jonów metali, mogą zawierać reszty polisacharydów (np. skrobi), białek lub lipidów [87,88]. Nagromadzony w okresie dojrzewania nasion InsP₆ jest rozkładany enzymatycznie podczas kiełkowania. Reakcja ta katalizowana jest przez fitazy – fosfohydrolazy heksakisfosforanu *mio*-inozytolu – należące do klasy kwaśnych fosfataz histydynowych (HAP) albo kwaśnych fosfatazy purpurowych (PAP) [82,89]. Podczas reakcji zachodzi stopniowa defosforylacja fitynianów w wyniku której zostaje uwolniony Pi. Pozostają mniej ufosforylowane pochodne *mio*-inozytolu oraz kationy metali i reszty organiczne wchodzące w skład fitynianów (Rysunek 9.) [89,90].

Fityniany oraz kwas fitynowy, stanowią nie tylko rezerwuar Pi, inozytolu i mikroelementów, ale wpływają również na wiele procesów metabolicznych zachodzących w kiełkujących nasionach i tkankach rozwiniętych roślin. InsP₆ wykazuje aktywność przeciwutleniającą, między innymi ograniczając powstawanie reaktywnych form tlenu w wyniku działania katalitycznego żelaza podczas reakcji peroksydacji lipidów [80,82]. Kwas fitynowy i jego pochodne odgrywają także kluczową rolę w (i) transporcie i aktywności mRNA, (ii) naprawie i rekombinacji DNA, (iii) transdukcji i regulacji sygnałów, (iv) endocytozie i przemieszczaniu pęcherzyków komórkowych oraz (v) w regeneracji ATP [82,83,91–93].

1.2.3 Nukleotydy i kwasy nukleinowe

1.2.3.1. Nukleotydy – metabolizm, rola i pochodne

Nukleotydy odgrywają główną rolę w wielu procesach biochemicznych zachodzących w komórkach organizmów żywych. Stanowią budulec do syntezy kwasów nukleinowych, źródło energii, prekursory do syntezy metabolitów pierwotnych, takich jak sacharoza, polisacharydy, fosfolipidy, a także metabolitów wtórnych. Zbudowane są z trzech podstawowych jednostek (Rysunek 10.) [94]:

- 1. Zasady azotowej pochodnej puryny lub pirymidyny,
- Pentozy reszty rybozy lub deoksyrybozy, połączonej z zasadą azotową wiązaniem N-glikozydowym w pozycji C1',
- Reszty fosforanowej przyłączonej do cząsteczki cukru wiązaniem estrowym w pozycji C5'. W zależności od liczby reszt fosforanowych wyróżnia się mono-, dii trifosforany.



Rysunek 10. Struktury zasad pirymidynowych (górny rząd) i purynowych (dolny rząd) (R = H), oraz odpowiadających im nukleozydów (R = ryboza/deoksyryboza) i nukleotydów (R = fosforan rybozy/deoksyrybozy). AMP – adenozyno-5'-monofosforan; dAMP – deoksy-AMP; CMP – cytydyno-5'-monofosforan; GMP – guanozyno-5'-monofosforan; IMP – inozyno-5'-monofosforan; XMP – ksantozyno-5'-monofosforan; TMP – tymidyno-5'-monofosforan; UMP – urydyno-5'-monofosforan.

W komórkach roślinnych, w których panuje fizjologiczny odczyn (pH 6 – 8) nukleotydy, ze względu na obecność grup fosforanowych, są naładowane ujemnie, podczas gdy zasady purynowe i pirymidynowe pozbawione są ładunku. Wyjątek stanowi ksantyna, która powyżej wartości pKa = 5,5 jest naładowana ujemnie.

Nukleotydy ulegają różnym przemianom biochemicznym (Rysunek 11.), a ich metabolizm można podzielić na: (i) syntezę *de novo*, (ii) degradację nukleotydów, (iii) szlaki odzyskiwania – synteza nukleotydów z wolnych zasad nukleinowych lub nukleozydów, (iv) reakcje przenoszenia fosforu – przekształcenia mono- i difosforanów w trifosforany nukleotydów oraz (v) modyfikacje – np. redukcja do deoksynukleotydów lub dodanie łańcuchów bocznych [95].



Rysunek 11. Schemat metabolizmu nukleotydów. 10F-THF – 10-formylotetrahydrofolian; ATP – adenozyno-5'trifosforan; CTP – cytydyno-5'-trifosforan; dNDP – difosforan deoksyrybonukleozydu; dNTP – trifosforan deoksyrybonukleozydu; GMP – guanozyno-5'-monofosforan; NADH – dinukleotydy nikotynoamidoadeninowy; NDP – difosforan rybonukleozydu; NTP – trifosforan rybonukleozydu; PRPP – 5-fosforybozylo-1-pirofosforan; SAM – S-adenozylo-L-metionina; UDP – urydyno-5'-difosforan; UDP-Glc – UDP-α-D-glukoza. UMP – urydyno-5'-monofosforan.

Rośliny wytworzyły odrębne szlaki metaboliczne syntezy de novo nukleotydów adenozyno-5'-monofosforan purynowych generujących (AMP) oraz nukleotydów pirymidynowych, których produktem jest urydyno-5'-monofosforan (UMP). Podczas biosyntezy de novo nukleotydy są tworzone z aktywowanej rybozy (5-fosforybozylo-1pirofosforan (PRPP)), glutaminy (Gln), kwasu asparaginowego (Asp) i wodoroweglanu oraz specyficznie dla nukleotydów purynowych – glicyny (Gly) i tetrahydrofolianu 10-formylu (10F-THF) (Rysunek 12. A, B) [95–97]. Natomiast biosynteza deoksyrybonukleotydów polega na redukcji cząsteczki cukrowej difosforanów rybonukleozydów (NDP), katalizowanej przez pojedynczą roślinną reduktazę rybonukleotydową (RNR, EC 1.17.4.10), w wyniku której powstają difosforany deoksyrybonukleozydów (dNDP). Powstałe dNDP, z wyjątkiem dUDP, są dalej fosforylowane, a powstałe dCTP, dATP i dGTP są wykorzystywane jako bezpośrednie prekursory do syntezy DNA. Natomiast dUDP utworzony przez reduktaze rybonukleotydową jest najpierw przekształcany w dUTP, a następnie hydrolizowany do dUMP i dalej przekształcany do dTTP (Rysunek 12. C) [96,98].



Rysunek 12. Schemat syntezy de novo nukleotydów purynowych (A) i pirymidynowych (B) oraz syntezy deoksynukleotydów (C) w komórkach roślin. 10F-THF – 10-fornylotetrahydrofolian; ADP – adenozyno-5'difosfororan; AICAR - rybonukleotyd 5-aminoimidazolo-4-karboksyamidu; AIR - rybonukleotyd 5'aminoimidazolu; AMP – adenozyno-5'-monofosforan; ATP – adenozyno-5'-trifosforan; CAIR – rybonukleotyd 5'-aminoimidazolo-4-karboksylow; CP – karbamoilofosforan; CTP – cvtvdvno-5'-trifosforan; dADP – deoksydeoksy-ATP; dCDP deoksycytydyno-5'-difosforan; ADP; dATP dCTP deoksy-CTP; dGDP – deoksyguanozyno-5'-difosforan; dGTP – deoksyguanozyno-5'-trifosforan; DHO – dihydroorotan; – deoksytymidyno-5'-monofosforan; FAICAR – rybonukleotyd dTMP 5-formamidoimidazolo-4karboksyamidu; FGAM – rybonukleotyd formyloglicynoamidyny; FGAR – rybonukletyd formyloglicynoamid; GAR – rybonukleotyd glicynoamidu; GMP – guanozyno-5'-monofosforan; IMP – inozyno-5'-monofosforan; NAD⁺/NADH dinukleotydy nikotynoamidoadeninowy utleniona/zredukowana); (forma NCA – N-karbamoiloasparaginian; NDP – difosforan rybonukleozydu; OA – kwas orotowy; OMP – kwas orotydyno-5'-fosforowy; PRA – 5-fosforybozylo amina; PRPP – 5-fosforybozylo-1-pirofosforan; SAICAR – rybonukleotyd 5'-aminoimidazolo-4-N-bursztynylo-karboksyamidu; SAMP – adenylobursztynian; THF – tetrahydrofolian; TMP – tymidyno-5'-monofosforan; UDP – urydyno-5'-difosforan; UMP – urydyno-5'monofosforan; UTP – urydyno-5'-trifosforan; XMP – ksantozyno-5'-monofosforan.

Ogólna zawartość nukleotydów zmienia się w trakcie rozwoju roślin oraz w wyniku odpowiedzi na czynniki stresowe. Zjawiska te następują wskutek: (i) zmiany puli netto nukleotydów w wyniku syntezy *de novo* lub ich degradacji i zużycia oraz (ii) zmiany stężenia poszczególnych nukleotydów bez zmian w całkowitej ich zawartości. Na szybkość syntezy i wielkość puli nukleotydów wpływa także dostępność fosforanów, węgla i azotu [99]. W komórkach roślin nukleotydy adeninowe i urydynowe występują w wyższych stężeniach, niż nukleotydy guaninowe i cytozynowe [99,100]. Odzwierciedla to większy udział nukleotydów adeninowych i urydynowych jako kofaktorów w metabolizmie, jak również w syntezie kwasów nukleinowych. Zawartość nukleotydów adeninowych mieści się

w przedziale 80 – 200 nmol g⁻¹ świeżej masy, natomiast nukleotydy guaninowe stanowią zwykle około 10 - 25% puli nukleotydów adeninowych [96].

W procesach metabolicznych, zachodzących w komórkach, roślin największe znaczenie przypisuje się nukleotydom adeninowym, w szczególności adenozyno-5'-trifosforanowi (ATP), które stanowią uniwersalny substrat energetyczny [101]. Hydroliza wiązań bezwodnikowych (γ i β) oraz wiązania estrowego (α) w cząsteczce ATP prowadzi do uwolnienia energii (odpowiednio: 34,0; 27,2 i 13,8 kJ/mol), która jest wykorzystywana w różnych procesach, takich jak synteza fosfolipidów błonowych oraz transport wbrew gradientowi stężeń [73]. Podobne, wysokoenergetyczne wiązania fosfobezwodnikowe są obecne również w cząsteczkach GTP i UTP, które są ważnymi donorami elektronów, odpowiednio w glukoneogenezie i metabolizmie sacharydów [73].

Ponadto zawartość i wzajemny stosunek poszczególnych nukleotydów adeninowych (ATP, ADP i AMP) określa status energetyczny komórki [102]. W roślinach będących w stanie homeostazy, nukleotydy adeninowe ulegają wzajemnym przekształceniom. Na skutek tego pula nukleotydów adeninowych znajduje się w stanie równowagi dynamicznej [103]. Podstawowym parametrem służącym do opisu stanu energetycznego komórki jest adenylowy ładunek energetyczny (AEC). AEC reprezentuje względne nasycenie puli adenylanów w wiązaniach bezwodnika fosforowego i wyraża się stosunkiem: $([ATP] + \frac{1}{2}[ADP])/([ATP]+[ADP]+[AMP])$ [102]. Stosunek ten informuje o przewadze procesów anabolicznych (AEC > 0,5) lub katabolicznych (AEC < 0,5) zachodzących w komórce [104].

Wszystkie żywe komórki zawierają sieć szlaków transdukcji sygnału, które umożliwiają rozwój, pozyskiwanie składników odżywczych, kontrolowanie metabolizmu i generowanie odpowiedzi na stres środowiskowy. Przykładem związków biorących udział w odpowiedzi roślin zarówno na stresy biotyczne (patogeny), jak i abiotyczne (np. stres solny, stres osmotyczny) [105,106] są cykliczne nukleotydy. Posiadają one w strukturze jedną grupę fosforanową połączoną z cząsteczką cukrową dwoma wiązaniami estrowymi – w pozycji C3' oraz C5' (Rysunek 13. A). Ze względu na specyficzną budowę cząsteczki nukleotydy te są znacznie bardziej odporne na hydrolizę kwasową i zasadową, a dodatkowo są mniejszymi i mniej polarnymi cząsteczkami niż ich niecykliczne odpowiedniki [107]. Najważniejszymi związkami w systemie przekazywania sygnału wewnątrz komórki są adenozyno-3',5'-cykliczny monofosforan (cAMP) i guanozyno-3',5'-cykliczny monofosforan (cGMP). cAMP działa w kilku procesach roślinnych, na przykład w (i) transporcie jonów, (ii) progresji cyklu komórkowego oraz (iii) odpowiedzi obronnej roślin, obejmującej aktywację liazy

fenyloalaninowej amoniaku (PAL, EC 4.1.3.5) [107,108]. Natomiast cGMP bierze udział między innymi w (i) działaniu fitochromu, stymulując biosyntezę antocyjanów oraz wraz z Ca²⁺ aktywując całkowity rozwój chloroplastów, (ii) regulacji transportu jonów przez błony komórkowe, poprzez zmiany sygnatury proteomu białek błonowych współtworzących kanały jonowe oraz (iii) sygnalizacji hormonalnej w reakcji aleuronu zboża na obecność kwasu giberelinowego (GA), jako cząsteczka sygnałowa w indukowanej przez GA syntezie α -amylazy [107–109].



Rysunek 13. Przykładowe struktury cyklicznych nukleotydów (A), nukleotydów będących kofaktorami (B) oraz cukrowych pochodnych difosforanów rybonukleotydów (C). ADP-Glc – ADP- α -D-glukoza; cAMP – cykliczny adenozyno-3',5'-monofosforan; cGMP – cykliczny guanozyno-3',5'-monofosforan; FAD/FADH₂ – dinukleotyd flawinoadeninowy (forma utleniona/zredukowana); FMN – mononukleotyd flawinowy; GDP-Fuc – GDP- β -L-fukoza; NAD⁺/NADH – dinukleotydy nikotynoamidoadeninowy (forma utleniona/zredukowana); NADP⁺/NADPH – fosforan dinukleotydu nikotynoamidoadeninowy (forma utleniona/zredukowana); UDP-Glc – UDP- α -D-glukoza.

Inne pochodne nukleotydów (Rysunek 13. B), takie jak mononuklotyd flawinowy (FMN), dinukleotyd flawinoadeninowy (FAD/FADH₂), dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy (NAD⁺/NADH) oraz fosforan dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (NADP⁺/NADPH) pełnią funkcję koenzymów w wielu reakcjach metabolicznych roślin. FMN oraz FAD są niezbędnymi kofaktorami enzymów, biorących udział w procesach: (i) fotosyntezy, (ii) mitochondrialnego transportu elektronów, (ii) utleniania kwasów tłuszczowych, (iv) fotorecepcji, (v) naprawy DNA, (vi) metabolizmu innych kofaktorów oraz (vii) w procesach biosyntezy wielu metabolitów wtórnych [110]. Natomiast NAD⁺ oraz NADP⁺ są niezbędnymi metabolitami odpowiadającymi za homeostazę redoks komórek roślinnych poprzez generowanie i wychwytywanie reaktywnych form tlenu (ROS) [111]. Nukleotydy odgrywają również istotną rolę w systemach kontrolujących adaptację do warunków stresu środowiskowego, takiego jak promieniowanie UV, zasolenie, szok cieplny i susza. NAD⁺ i jego pochodne uczestniczą także w regulacji złożonych procesów komórkowych, w tym regulacji transkrypcji i metabolizmu mikrotubuli [112].

W komórkach roślin nukleotydy mogą występować również w postaci pochodnych cukrowych (Rysunek 13. C), które są uniwersalnymi donorami węglowodanów (o wysokim potencjale przenoszenia grup cukrowych) i prekursorami syntezy polisacharydów (m. in. celulozy, hemicelulozy, pektyn), glikoprotein, proteoglikanów, glikolipidów oraz glikozylowanych metabolitów wtórnych. Najliczniejszą grupę tych związków stanowią pochodne difosforanów nukleozydów (NDP) [113].

Podsumowując, nukleotydy odgrywają kluczową rolę w prawie wszystkich procesach biochemicznych, w tym w [94]:

- 1. Syntezie kwasów nukleinowych jako prekursory DNA i RNA.
- Transferze energii: ATP jest używany jako uniwersalny substrat energetyczny w układach biologicznych, a GTP jest wykorzystywany w wielu układach zaangażowanych w transport lub zmiany konformacyjne makrocząsteczek.
- 3. Procesach transdukcji sygnału, które często obejmują nieenzymatyczne wtórne przekaźniki, w tym cykliczne nukleotydy (cAMP, cGMP, cykliczny di-GMP). Procesy te umożliwiają komórkom synchronizację aktywności metabolicznej oraz komunikowanie się z innymi komórkami, w celu zmian ich aktywności i ekspresji genów.
- Tworzeniu koenzymów nukleotydy adeninowe są składnikami niektórych głównych koenzymów.
- 5. Regulacji procesów metabolicznych pochodne nukleotydów (np. cukrowe pochodne) są aktywowanymi półproduktami w wielu reakcjach biosyntezy.

1.2.3.2. Kwasy nukleinowe

Kwasy nukleinowe – rybonukleoinowy (RNA) i deoksyrybonukleinowy (DNA) – są polimerami o długich łańcuchach, których integralną część stanowią ugrupowania fosfodiestrowe [114,115]. Grupy fosforanowe łączą węgiel 5' nukleozydu z węglem 3' następnego nukleozydu, a utworzone w ten sposób wiązania nazywa się kowalencyjnym wiązaniem fosfodiestrowym [116]. Charakter tych wiązań odpowiada za istnienie dwóch odrębnych końców (5' oraz 3') kwasów nukleinowych (Rysunek 14.). Fosforanowe wiązanie nukleozydów odpowiada za charakter kwasowy kwasów nukleinowych [73,117]. Kwasy nukleinowe tworzą największą pulę całkowitego fosforu organicznego w komórkach roślin

(0,3 – 2,0 mg P g⁻¹ suchej masy) [73]. Pulę kwasów nukleinowych w 25% stanowi DNA – nośnik informacji genetycznej, natomiast 85% to RNA odpowiedzialne za translokację informacji genetycznej [73]. Pomimo wielu podobieństw w budowie, cząsteczki DNA i RNA wykazują pewne różnice, które determinują ich rolę. DNA stanowi materiał genetyczny komórki i znajduje się głównie w jądrze komórkowym komórek roślinnych, a w niewielkich ilościach także w mitochondrium i plastydach. Cząsteczki RNA występują w dużych ilościach zarówno w jądrze komórkowym, jak i cytoplazmie. RNA pełni kluczową rolę w syntezie białek oraz w procesach, takich jak modyfikacja i restrukturyzacja innych nici RNA, a także w regulacji ekspresji genów, szczególnie ważnej w adaptacji roślin do różnych warunków środowiskowych [116,118].



Rysunek 14. Budowa kwasu rybonukleinowego (A) oraz deoksyrybonukleinowego (B) z zaznaczonymi końcami 3' i 5' na każdej z nici kwasów nukleinowych. Pogrubione nazwy zasad azotowych są specyficzne dla danej struktury.

1.2.4 Ufosforylowane białka

Białkom, biopolimerom utworzonym z reszt aminokwasów w wyniku procesów transkrypcji i translacji kwasów nukleinowych, przypisuje się wiele różnorodnych funkcji w komórkach roślin. W zależności od sekwencji aminokwasów, których kolejność i wzajemne interakcje łańcuchów bocznych wpływają na trójwymiarową strukturę (strukturę drugoi trzeciorzędową), białka mogą pełnić między innymi rolę transporterów i receptorów (białka błonowe) lub regulować procesy biochemiczne (enzymy) [119]. Pierwszym etapem syntezy białek jest proces transkrypcji, w którym na podstawie sekwencji nukleotydów w DNA, utworzona zostaje nić RNA, stanowiąca matrycę, na bazie której w dalszym etapie powstają peptydy cechujące się określoną sekwencją aminokwasów (Rysunek 15.) [120].



Rysunek 15. Schemat biosyntezy białka uwzględniający potranslacyjne modyfikacje białka (PTM), determinujące jego funkcje w komórkach. Spośród różnych typów modyfikacji białek, odwracalna fosforylacja jest głównym potranslacyjnym sposobem przekazywania informacji w komórkach.

Aktywne białka i kompleksy białkowe są końcowymi produktami ekspresji większości genów kodujących białka. Jednak wiele białek ulega modyfikacjom potranslacyjnym (PTM), różnicującym właściwości chemiczne tworzących je aminokwasów, bądź modyfikując istniejące grupy funkcyjne. Modyfikacje te obejmują fosforylację, ubikwitynację, glikozylację, nitrozylację, metylację, acetylację oraz lipidację. W zależności od rodzaju wprowadzonej zmiany, PTM wpływają na funkcjonowanie białek roślinnych: (i) nadając specyficzną aktywność (np. katalityczną) lub status sygnalizacyjny, (ii) zmieniając ich lokalizację subkomórkową, a także (iii) przyczyniając się do zwiększenia stabilności lub przyspieszenia degradacji [120,121]. Fosforylacja jest najczęściej występującą modyfikacją kowalencyjną białek, związaną z regulacją metabolizmu komórkowego. Proces ten może zachodzić w różnych przedziałach subkomórkowych [122,123].

Fosforylacja białek opiera się na przeniesieniu grupy fosforylowej z ATP poprzez utworzenie wiązania estrowego z grupą hydroksylową określonej reszty aminokwasu. Najczęściej modyfikacji ulega reszta seryny (80 - 85%), treoniny (10 - 15%) lub tyrozyny ($\geq 5\%$) w białku docelowym [123,124]. Fosforylacji mogą ulegać także reszty histydyny i kwasu asparaginowego [125]. Szacuje się, że ufosforylowane białka stanowią do 30% spośród wszystkich białek występujących w organizmie [126]. Odwracalna fosforylacja białek katalizowana przez kinazy białkowe i fosfatazy odgrywa istotną rolę w reakcjach na stres biotyczny i abiotyczny, regulacji metabolizmu i sygnalizacji hormonalnej, np. poprzez kaskady sygnalizacyjne (Rysunek 16.) [127,128].



Rysunek 16. Fosforylacji i defosforylacja białek jako kluczowy etap w transdukcji sygnału prowadzącej do odpowiedzi komórkowej.

1.2.5 Fosfolipidy

Fosfolipidy stanowią drugą co do wielkości pulę fosforu w komórkach roślin [73]. Pomimo różnic strukturalnych, na podstawie których wydzielono kilku klas fosfolipidów, w skład każdej cząsteczki wchodzi szkielet glicerolu, do którego przyłączone są jedna lub dwie hydrofobowe reszty kwasów tłuszczowych i jedno polarne ugrupowanie fosforowe (Rysunek 17.). Ta specyficzna budowa cząsteczek fosfolipidów nadaje im właściwości amfifilowe, dzięki którym fosfolipidy są w stanie tworzyć dwuwarstwy lipidowe, stanowiące podstawę strukturalną błon komórkowych [129].



Rysunek 17. Struktura fosfolipidów (A), *lizo*-fosfolipidów (B) i kwasu fosfatydowego (C) oraz przykłady podstawników wchodzących w skład ugrupowania fosforowego (R).

Błony komórkowe roślin zbudowane są głównie z fosfatydylocholiny (PC) i fosfatydyloetanoloaminy (PE), których biosynteza rozpoczyna się od fosforylacji i aktywacji, odpowiednio choliny lub etanoloaminy (Rysunek 18. A) [130,131]. Fosfatydyloglicerol (PG) i fosfatydyloinozytol (PI), podobnie jak fosfatydyloseryna (PS) mogą stanowić dodatkowe składniki błon komórkowych. W roślinach PG i PI powstają z kwasu fosfatydowego (PA) w wyniku sekwencji reakcji enzymatycznych, które przebiegają poprzez cytydynodifosforan diacyloglicerolu (CDP-DAG), który następnie reaguje odpowiednio z glicerolo-3-fosforanem lub *mio*-D-inozytolem (Rysunek 18. B) [131]. Fosfatydyloinozytol może ulegać dalszej fosforylacji, w wyniku której dochodzi do utworzenia między innymi fosfatydyloinozytolo-4-fosforanu (PI-4-P) lub PI-4,5-bisfosforanu (PIP₂) (Rysunek 18. C). Zawartość ufosforylowanych form PI w wewnętrznej warstwie błony komórkowej, utrzymuje się na stałym poziomie między 1 – 3% stężenia PI.



Rysunek 18. Schemat przedstawiający główne etapy syntezy roślinnych fosfolipidów. CDP – cytydyno-5'difosforan; CTP – cytydyno-5'-trifosforan; DAG – diacyloglicerol; PA – kwas fosfatydowy; PC – fosfatydylocholina; PE – fosfatydylo-etanoloamina; PG – fosfatydyloglicerol; PI – fosfatydyloinozytol; PIP₂ – fosfatydyloinozytolo-4,5-bisfosforan; PS – fosfatydyloseryna.

Oprócz funkcji budulcowej w strukturze błony komórkowej, fosfolipidy odgrywają kluczową rolę w procesach, takich jak transdukcja sygnału, przegrupowanie cytoszkieletu oraz transport błonowy [129]. Związki te działają jako kofaktory dla zlokalizowanych w błonie enzymów zaangażowanych w kaskady sygnałowe i ułatwiają interakcje białko-lipid i białko-białko. W procesach tych aktywacja białka zachodzi przez zmianę konformacyjną wywołaną przez lipidy lub przestrzenne przegrupowanie białek w obrębie błony komórkowej.

Fosfolipidy i ich pochodne (np. *lizo*-fosfolipidy) mogą zmieniać właściwości fizyczne błon, prowadząc do zwiększenia lub zmniejszenia strumienia transportowanych jonów lub prowadzić do utworzenia pęcherzyków uczestniczących w procesach endoi egzocytozy [131]. Inny mechanizm transdukcji sygnału z udziałem fosfolipidów zachodzi za pośrednictwem enzymów efektorowych aktywowanych przez receptory, które wytwarzają wewnątrzkomórkowe wtórne przekaźniki sygnału. Ponieważ enzymy efektorowe znajdują się na powierzchni błony komórkowej, przekaźniki te często pochodzą ze składników tych błon [132]. Aktywacja enzymu efektorowego (np. fosfolipazy A (PLA), C (PLC) i D (PLD)) prowadzi do przekształcenia fosfolipidów w cząsteczki sygnałowe (Rysunek 19.) [133].



Rysunek 19. Schemat tworzenia przekaźników sygnału uwzględniający fosfolipidowy prekursor, enzymy efektorowe oraz cząsteczki sygnałowe. DAG – diacyloglicerol; DGK – kinaza DAG; DGPP – pirofosforan diacyloglicerolu; FFA – wolne kwasy tłuszczowe; IP₃ – inozytolo-1,4,5-trifosforan; L-PC – *lizo*-fosfatydylocholina; PA – kwas fosfatydowy; PAK – kinaza kwasu fosfatydowego; PC – fosfatydylocholina; PI – fosfatydyloinozytol; PI3K – 3-kinaza fosfatydyloinozytolu; PI3P – fosfatydyloinozytolo-3-fosforan; PIP₂– fosfatydyloinozytolo-4,5-bisfosforan; PLA₂– fosfolipaza A2; PLC – fosfolipaza C; PLD – fosfolipaza D.

Homeostaza fosfolipidów jest ważnym elementem wszystkich etapów normalnego wzrostu i rozwoju roślin. Metabolizm fosfolipidów jest integralnym procesem (i) dojrzewania zarodka, (ii) kiełkowania nasion, (iii) sygnalizacji hormonalnej, (iv) podziału i wzrostu komórek stymulowanych auksyną, (v) polaryzacji komórek, (vi) regulacji osmotycznej oraz (vii) starzenia się organów roślinnych. Ponadto transdukcja sygnałów, w której uczestniczą fosfolipidy, jest kluczowa w odpowiedzi komórek na biotyczne i abiotyczne bodźce stresowe, w tym: infekcję patogenami, suszę, zasolenie, temperaturę, oraz zranienie [131,134,135].

1.2.6 Fosfoniany

Znacznie mniej liczną grupę naturalnych organicznych połączeń fosforu w komórkach roślinnych stanowią związki fosfonowe (fosfoniany), w molekułach których występuje bezpośrednie wiązanie pomiędzy atomami fosforu i węgla (C–P). Naturalne związki fosfonowe po raz pierwszy odkryto dopiero w XX wieku, mimo że badania geologiczne wskazują na ich występowanie na ziemi od milionów lat [136]. Obecność fosfonianów
w środowisku jest zjawiskiem naturalnym – w początkowej atmosferze Ziemi, kiedy stężenie tlenu było niskie, organiczne związki fosforu obecne we wczesnych formach życia były reprezentowane głównie przez fosfoniany [104]. Jednak wraz ze wzrostem stężenia tlenu cząsteczkowego, fosfor obecny w związkach organicznych występował na wyższym stopniu utlenienia. W rezultacie fosfoniany zostały wyparte przez związki fosforanowe [137]. Pomimo tego, iż obecność fosfonianów w układach biologicznych została potwierdzona ponad 60 lat temu, ich rola w tkankach roślin wciąż jest nieznana. Dane literaturowe, dotyczące obecności i metabolizmu naturalnie występujących związków fosfonowych, odnoszą się przede wszystkim do struktur wyizolowanych z mikroorganizmów (bakterii, mikroalg prokariotycznych, grzybów) oraz zwierząt [138]. Zawartość fosfonianów w materiałach roślinnych była badana sporadycznie – w 1984 roku wyizolowano fosfolipidy z pestek moreli [139], a w 1989 roku z nasion ketmii [140]. Dopiero w 2021 roku wykazano obecność związków fosfonowych w nasionach roślin należących do ponad 30 gatunków (zaklasyfikowanych taksonomicznie do 6 różnych rodzin) [6]. Ograniczona ilość danych dotyczących obecności związków fosfonowych w tkankach roślin oraz fakt, iż fosforyny nie są metabolizowane przez rośliny, przyczyniły się do braku informacji na temat przemian metabolicznych fosfonianów w roślinach. Jednak warto zauważyć, że zgodnie z teorią endosymbiozy sinice uczestniczyły w powstawaniu pierwotnych plastydów w roślinach. Co więcej, te fotoautotroficzne prokarionty są zdolne do interakcji i nawiązywania długotrwałych symbiotycznych oddziaływań z przedstawicielami królestwa roślin [141]. Te niezwykłe zdolności sinic, w połączeniu z naturalnym występowaniem fosfonianów w ich komórkach sugerują, że rośliny również potrafią syntezować związki fosfonowe.

2 Kondycja fizjologiczna roślin i metody jej oceny

2.1 Czynniki wpływające na wybrane aspekty fizjologii roślin

Kondycja roślin odzwierciedla aktualny stanu fizjologiczny rośliny. Zgodnie z teorią homeostazy każdy żywy organizm dąży do utrzymania określonych parametrów fizycznych, chemicznych i biochemicznych na stałym poziomie [142]. Pomimo że rośliny tolerują pewne odchylenia od stanu równowagi homeostatycznej, ich optymalne funkcjonowanie osiągane jest w wąskim zakresie zmian czynników charakteryzujących dany ekosystem [143]. Każda bardziej istotna zmiana warunków panujących w środowisku życia roślin stanowi czynnik stresowy. Zatem stresorem środowiskowym jest każdy czynnik zewnętrzny, który wywiera niekorzystny wpływ na roślinę, prowadząc do zmian fizjologicznych, których efektem jest nowy stan homeostazy [144]. W naturze, przetrwanie każdego organizmu w ekosystemie zależy od jego zdolności przystosowania się do warunków środowiskowych. W celu obrony

przed negatywnym wpływem zjawisk zewnetrznych, rośliny rozwineły zaawansowane strategie działań obserwowane na poziomie molekularnym, często połączone ze zmianami wzorców wzrostu i rozwoju [145]. Proces dostosowania metabolizmu, mający na celu osiągnięcie nowego stanu homeostazy, określany jest jako aklimatyzacja [146,147]. W początkowej fazie zmiany środowiskowe odbierane przez roślinę aktywują sieć szlaków sygnałowych, które w kolejnym etapie wywołują produkcję specyficznych białek i związków przywracających równowagę biochemiczną do stanu wyjściowego lub pozwalających na osiągniecie nowego stanu homeostazy (Rysunek. 20). Z punktu widzenia metabolomiki w procesach tych ważne są co najmniej trzy rodzaje związków: (i) związki niwelujące wpływ czynników stresowych, takie jak przeciwutleniacze czy substancje osmoprotekcyjne, (ii) produkty uboczne stresu, które pojawiają się w komórkach z powodu zakłócenia homeostazy oraz (iii) czasteczki transdukcji sygnału zaangażowane w pośredniczenie w odpowiedzi rośliny na działanie stresorów [148]. Jednak ciągłe i długotrwałe działanie stresorów przyczynia się do pogorszenia kondycji fizjologicznej roślin, co w konsekwencji może doprowadzić do nieodwracanych zmian, w skrajnych przypadkach skutkujących śmiercią organizmu [149,150].



Rysunek 20. Proces percepcji i transdukcji sygnału, wywołany stresem środowiskowym, prowadzący do ekspresji genów i odpowiedzi metabolicznej komórki.

Czynniki wpływające na zmiany metaboliczne roślin można podzielić na dwa rodzaje (i) biotyczne, obejmujące szeroki zakres patogenów roślin (bakterie, grzyby i wirusy) i zwierzęta roślinożerne oraz (ii) abiotyczne czynniki chemiczne i fizyczne [151]. Do abiotycznych czynników stresogennych, które najczęściej wpływają na kondycję roślin, należą:

- niedobór (susza) lub nadmiar wody;
- oświetlenie (intensywność, długość fali, fotoperiod);
- temperatura;
- niedobór lub nadmiar składników odżywczych w podłożu, w tym makroi mikroelementów;
- zasolenie;
- nadmiarowa obecność toksycznych metali w podłożu;
- obecność ksenobiotyków w środowisku życia roślin.

Występowanie tych czynników poza ich normalnymi zakresami ma negatywne konsekwencje biochemiczne i fizjologiczne dla roślin. Zakres stresu fizjologicznego można określić ilościowo, poprzez ocenę różnic wybranych parametrów – markerów biochemicznych u roślin rozwijających się w optymalnych lub w niekorzystnych warunkach wzrostu.

2.2 Wskaźniki stosowane w ocenie kondycji roślin

Istnieje kilka grup parametrów jakościowych i ilościowych – stosowanych w ocenie kondycji roślin – służących do scharakteryzowania rozwoju i wzrostu roślin, ale także stanu fizjologicznego i objawów stresu. Ze względu na fakt, iż większość gatunków roślin należy do grupy Spermatophyta, w której nasiona stanowią najważniejszy organ odpowiedzialny za propagowanie życia, kiełkowanie jest kluczowym procesem w rozwoju, a jego intensywność może być traktowane jako wyznacznik produktywności roślin [152,153]. W wyniku pobierania wody przez nasiona, następuje aktywacja aparatu enzymatycznego i mobilizacja rezerw materiałów magazynujących. W tym czasie większość związków chemiczne zawartych w nasionach ulegają przemianom, co prowadzi do kiełkowania nasion oraz rozwinięcia się siewek [154]. Podstawowymi wskaźnikami określającymi jakość i kondycję nasion są energia kiełkowania oraz siła kiełkowania. Energia kiełkowania określa procent nasion zdolnych do wykiełkowania w najkrótszym możliwym czasie (3 – 10 dni), podczas gdy siła kiełkowania odnosi się do odpowiednio długiego okresu czasu (10 – 28 dni) w zależności od gatunku badanej rośliny. W przypadku siewek i rozwiniętych roślin, do podstawowych parametrów jakościowych zaliczyć można zmiany obserwowane w wyglądzie rośliny, między innymi: (i) pokrój rośliny, (ii) wielkość i kolor liści, (iii) symptomy więdnięcia, martwicy lub starzenia się liści, a także (iv) mokra i sucha masa rośliny, czy (v) stosunek masy korzeni do pędów nadziemnych [155]. Pomimo iż starzenie się liści jest naturalnym etapem w rozwoju roślin, proces więdnięcia i martwicy liści może stanowić odpowiedź rośliny na niekorzystne warunki klimatyczne np. suszę oraz niedobór składników odżywczych takich jak azot i fosfor [156]. Natomiast zmiana architektury korzeni, gęstości włośników oraz stosunku masy korzeni do pędów nadziemnych jest głównym efektem niedoboru fosforu w podłożu [157,158].

Reakcje komórkowe na stres obejmują nie tylko zmiany w architekturze i przepuszczalności ściany komórkowej oraz błony komórkowej, ale także zmiany w metabolizmie i cyklu komórkowym [159]. Zauważalne różnice w morfologii rośliny, występujące na skutek stresu fizjologicznego, poprzedzone są zmianami stężeń różnych markerów chemicznych metabolizmu. W badaniach nad wpływem wybranych czynników stresowych, jako wskaźniki odpowiedzi roślin najczęściej oznaczane są:

- zawartość barwników fotosyntetycznych (chlorofilu a, chlorofilu b oraz karotenoidów), wewnątrzkomórkowe stężenie CO₂ w liściach, czy stężenie węglowodanów, których metabolizm jest bezpośrednio związany z wydajnością fotosyntezy [160,161];
- zawartość związków o działaniu przeciwutleniającym (m. in. kwas askorbinowy, glutation, tokoferol, antocyjany, karotenoidy i fitohormony) oraz aktywność enzymów niwelujących szkodliwy wpływ wolnych rodników (katalaza (EC 1.11.1.6), dysmutaza ponadtlenkowa (E.C. 1.15.1.1), peroksydazy (E.C. 1.11.1.x) [148,162];
- aktywność enzymów detoksykacyjnych (np. transferaza glutationowa (EC 2.5.1.18), reduktaza glutationowa (E.C. 1.6.4.2)) [163];
- obecność związków osmoprotekcyjnych, chroniących rośliny przed stresem związanym z zasoleniem, czy suszą , takich jak: aminokwasy (asparagina, prolina, seryna), aminy (poliaminy i glicynobetaina), trzeciorzędowe związki sulfoniowe (dimetylosulfopropionian), kwas γ-amino-N-masłowy (GABA) oraz cukry rozpuszczalne (fruktoza, sacharoza, trehaloza, rafinoza i poliole (*mio*-inozytol, D-pinitol)) [164–166];
- ogólna zawartość białka.

Obecność lub brak markerów metabolicznych może odzwierciedlać stan fizjologiczny roślin i pośrednio sygnalizować skutki stresu. Jednak rzeczywisty skład metabolitów danego gatunku rośliny jest wynikiem określonego profilu ekspresji genów. Kiedy aktywowany jest dany szlak metaboliczny, prekursory i produkty pośrednie sprzyjają wytwarzaniu cząsteczki bioaktywnej, którą może być (i) przeciwutleniacz, (ii) związek sygnałowy, (iii) produkt pośredni biosyntezy struktury komórkowej, a nawet (iv) związek magazynujący. Produkcja

tych zwiazków może być z kolei regulowana miedzy innymi przez czasteczki sygnalizacyjne (takie jak hormony roślinne) niezwiązane z regulowanym szlakiem lub związki pośrednie aktywujące lub deazktywujące różne etapy procesów metabolicznych. Ponadto w warunkach stresu dochodzi do powstania metabolitów, takich jak (i) dialdehyd malonowy (MDA), (ii) nadtlenki lipidów i (iii) fragmenty DNA, powstałych w wyniku rozszczepienia oksydacyjnego lub enzymatycznego składników komórek [160]. Badanie dynamiki metabolizmu roślin – zmian w równowadze między metabolitami pierwotnymi i wtórnymi (w szczególności metabolitami obronnymi i sygnalizacyjnymi) – często wymaga połączenia funkcjonalną tradycyjnego podejścia fizjologicznego Z charakterystyką genomu z wykorzystaniem analiz "omicznych" [167,168].

2.3 Fosforomika – nowe podejście w badaniach przemian metabolicznych fosforu

"Omika" oznacza nowe, multidyscyplinarne podejście w badaniach biologicznych, którego istotą jest charakterystyka jakościowa i ilościowa puli związków chemicznych pełniących określoną rolę biologiczną. Tan szybko rozwijający się obszar badań obejmuje (i) genomikę, (ii) transkryptomikę, (iii) proteomikę i (iv) metabolomikę (Rysunek 21.) [169]. Każde z tych podjeść oferuje możliwość spojrzenia na biologię z perspektywy globalnej i zrozumienia procesów zachodzących w komórkach na wielu poziomach. Wspólnym nadrzędnym celem analiz "omicznych" jest identyfikacja, scharakteryzowanie i określenie ilościowe wszystkich cząsteczek biologicznych, które są zaangażowane w strukturę, funkcję i dynamikę komórki, tkanki lub organu [148,170,171].



Rysunek 21. Badania "omiczne" jako kluczowe działanie w zrozumieniu reakcji komórkowych roślin na stres środowiskowy.

Możliwość monitorowania pełnego zestawu metabolitów może znacznie poprawić zrozumienie wielu procesów zachodzących w roślinach. To systematyczne badanie, określane jako "metabolomika", ma na celu stworzenie zintegrowanego obrazu stanu funkcjonalnego organizmu. Metabolom reprezentuje dalszy wynik ekspresji genów i jest bliższy fenotypowi niż ekspresja transkryptu lub białka. Rozległa wiedza na temat przemian metabolicznych pozwala również na ocenę różnic genotypowych i fenotypowych między gatunkami roślin lub między genotypami wykazującymi różną tolerancję wobec określonych czynników stresu biotycznego lub abiotycznego [171,172]. Ilościowy i jakościowy pomiar metabolitów komórkowych zapewnia zatem szeroki obraz stanu biochemicznego organizmu, który można wykorzystać do monitorowania lub oceny kondycji roślin [173–175].

Obecnie, główne podejścia stosowane w badaniach metabolicznych roślin obejmują (i) tworzenie metabolicznych odcisków palca, (ii) profilowanie oraz (iii) ukierunkowaną analizę metabolitów [148,176,177]. Metaboliczne odciski palców (*ang.* metabolic fingerprints) są w dużej mierze wykorzystywane do identyfikacji markerów metabolicznych związanych z określoną reakcją na stres, bez konieczności identyfikacji i dokładnej oceny ilościowej innych metabolitów w próbce [148]. Wielkoskalowa analiza złożonych mieszanin jest możliwa poprzez zastosowanie szeregu zintegrowanych technik badawczych, takich jak (i) nieniszcząca spektrometria magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR), (ii) metody oparte na spektrometrii mas (MS), w tym chromatografia gazowa sprzężona z MS (GC-MS), chromatografia cieczowa-spektrometria mas (LC-MS) i elektroforeza kapilarna-spektrometria mas (CE-MS), (iii) cyklotronowy rezonans jonów z transformacją Fouriera (FI-ICR) oraz (iv) wysokosprawną chromatografię cienkowarstwową (HPTLC) [178]. Zastosowanie każdej z tych platform analitycznych, a w szczególności ich kombinacja, pozwala na śledzenie zmian metabolicznych na poziomie subkomórkowym i komórkowym.

Zupełnie nowym, ale jakże ciekawym podejściem w badaniach metabolomicznych jest śledzenie przemian związków fosforu. To właśnie badania w obrębie fosforomiki mogą dostarczyć wielu cennych informacji nie tylko na temat statusu metabolicznego, ale także sposobu zmian form fosforu w trakcie wzrostu i rozwoju organizmów, dostarczając tym samym nowych narzędzi w diagnostyce metabolicznej roślin.

II Cel pracy

Pomimo że fosforomika stanowi zupełnie nowe podejście w metabolomice, to w literaturze można znaleźć prace dotyczące wstępnych badań nad przemianami związków fosforu w wybranych gatunkach grzybów strzępkowych i mikroalg. Jednak liczba źródeł traktujących o śledzeniu przemian, w szczególności związków fosfoororganicznych, w komórkach i tkankach roślin, jest znikoma.

Biorąc pod uwagę kluczową rolę fosforu w metabolizmie roślin oraz brak informacji na temat zmian w fosforomie w trakcie ich rozwoju, w szczególności w warunkach stresu, celem eksperymentów, których wyniki przedstawiono w niniejszej pracy, było określenie możliwości zastosowania badań fosforomicznych w określeniu kondycji roślin. Żeby osiągnąć ten cel wyodrębniono zadania obejmujące:

- opracowanie skutecznej procedury wyodrębniania stabilnych połączeń fosforu z homogenatów roślin;
- oznaczenie połączeń fosforoorganicznych profili fosforowych w ekstraktach uzyskanych z nasion roślin, za pomocą techniki ³¹P NMR;
- oznaczenie wybranych wskaźników odpowiedzi roślin modelowych rozwijających się w warunkach optymalnych i w warunkach stresu fizjologicznego wywołanego czynnikami fizycznymi (barwa światła), bądź obecnością stresorów chemicznych (jony metali, preparaty fungicydowe);
- tworzenie profili fosforowych organizmów modelowych rozwijających się w warunkach optymalnych oraz stresowych;
- oznaczenie ufosforylowanych nukleotydów adeninowych w homogenatach wybranych roślin modelowych (za pomocą HPLC) oraz ustalenie adenylowego ładunku energetycznego (AEC);
- analiza statystyczna uzyskanego zbioru danych obejmującego dane o rozwoju testowanych organizmów w określonych warunkach wzrostu oraz intensywności działania stresorów, pod kątem zależności pomiędzy tymi grupami zmiennych.

42

III Metodyka

1 Materiał badawczy i odczynniki

Nasiona badanych roślin, należących do ośmiu różnych rodzin botanicznych: szarłatowate (*Amaranthaceae*), selerowate (*Apiaceae*), astrowate (*Asteraceae*), kapustowate (*Brassicaceae*), dyniowate (*Cucurbitaceae*), bobowate (*Fabaceae*), wiechlinowate (*Poaceae*) i psiankowate (*Solanaceae*), pozyskano z lokalnej firmy handlowo-nasiennej (PNOS Sp. z o.o., Ożarów Mazowiecki, Polska), z wyjątkiem nasion buraków i cukinii, które zakupiono w Przedsiębiorstwie Nasiennictwa Ogrodniczego i Szkółkarstwa (Torseed S.A., Toruń, Polska). Nazwy zwyczajowe i botaniczne nasion badanych roślin, ich przynależność do rodzin botanicznych oraz szacunkową liczbę nasion w jednym gramie przedstawiono w Tabeli 1. Materiał badawczy przechowywano w temperaturze pokojowej w oryginalnych, szczelnie zamkniętych opakowaniach do momentu ich wykorzystania. Przed użyciem, nasiona sterylizowano powierzchniowo 70% etanolem przez 30 s i 0,5% (v/v) roztworem podchlorynu sodu przez 15 min. Po tym czasie nasiona odsączono i przepłukano wodą destylowaną do uzyskania neutralnego pH.

Nazwa zwyczajowa	jowa Nazwa botaniczna		Rodzina	Ilość nasion/ 1 g
Burak czerwony	Beta vulgaris var. conditiva	Opolski	szarłatowate (Amaranthaceae)	40-60
Marchew	Daucus carotaDolankaApium graveolensTalar			600-700
Seler			_	2500-2700
Koper	Anethum graveolens	Szmaragd		700
Seler naciowy	Apium graveolens var. dulce	Verde Pascal	– selerowate (Apiaceae)	2500-2700
Pietruszka	Pietruszka Petroselinum crispum convar. Alba			500-600
Pasternak	Pastinaca sativa	Halflong White	_	200-220
Cykoria	Cichorium intybus var. foliosum	Palla Rossa 3	astrowate	600-800
* Słonecznik	Helianthus annuus –		(Asteraceae)	10-20
*Brokuł	Brassica olerace	_		315
Brukselka	Brassica oleracea L. var. gemmifera	Long Island	-	350-400
Kalafior	Brassica oleracea convar. botrytis	Beta	_	300-400
Kapusta pekińska	Brassica pekinensis	Bristol	kapustowate	350-400
* Rzeżucha	Lepidium sativum	_		400-420
* Jarmuż	* Jarmuż Brassica oleracea L. – * Rzodkiewka Raphanus sativus var. sativus –			250-300
* Rzodkiewka			_	55
* Czerwona kapusta	erwona kapusta Brassica oleracea var. capitata rubra		_	350
Kapusta włoska	Kapusta włoska Brassica oleracea L. var. sabauda		_	350-400

Tabela 1. Dane dotyczące materiału badawczego.

Nazwa zwyczajowa	Nazwa botaniczna	Odmiana	Rodzina	Ilość nasion/ 1 g
Brukiew	Brassica napus	Nadmorska		350
Rzepa	Brassica rapa	Di milano a collettoviola		500
Kalarepa	Brassica oleracea var. gongylodes	Wener Witte	_	300-350
Kapusta biała	Brassica oleracea var. capitata alba	Amager Polana	-	300-350
Gorczyca biała	Sinapis L.	_		150
Ogóral	Cucumia cativua	Aladyn F1	_	40-50
Ogorek	Cucumis sutivus	Izyd F1	_	40-50
		Astra Polka	dumiaruata	3-5
Dynia zwyczajna	Cucurbita pepo	Kabaczek Złoty Cepelin	(Cucurbitaceae)	3-5
		Patison Polo F1	-	6-8
Dynia olbrzymia	Cucurbita maxima	Bambino	-	2-3
* Lucerna siewna	Medicago sativa L.	_		470-500
Fasola na suche ziarno	Phaseolus vulgaris	Borlotto lingua di fuoco nano	-	2-6
Bób	Vicia faba L. –		bobowate	1
Fasola	Phaseolus vulgaris	Esterka	(Fabaceae)	2-6
* Soczewica	Lens culinaris	_		25
* Fasola mung	Vigna radiata	_		13
* Groch	Pisum sativum L.	_	-	4-5
* Kukurydza	Zea mays var. saccharata	_	wiechlinowate (Poaceae)	8-10
Bakłażan	Solanum melongena	Black Beauty		200-250
		Kasia	-	170-200
Papryka	Capsicum annuum	Ożarowska	psiankowate	170-200
		Betalux	(Solanaceae)	250-270
Pomidor	Solanum lycopersicum L.	Krakus	-	250-270
		Malinowy Olbrzym	-	250-270

* – nasiona na kiełki

Wszystkie użyte w toku badań odczynniki, z wyjątkiem zieleni malachitowej i środka powierzchniowo czynnego – 3-[(3-cholinoamidopropylo)dimetyloamino]-1-propanosulfonian (CHAPS) wykazywały czystość analityczną. Odczynniki zakupiono w przedsiębiorstwach: Avantor Performance Materials Poland S.A. (Gliwice, Polska) oraz Merck (Merck Millipore, Darmstadt, Niemcy) i użyto bez dalszego oczyszczania, natomiast wodę stosowaną we wszystkich eksperymentach uzyskano w systemie Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA).

2 Warunki prowadzenia eksperymentów

2.1 Określenie wpływu warunków oświetlenia na kiełkowanie i kondycję kiełków rzodkiewki

W eksperymencie zbadano osiem rodzajów oświetlenia, stosując 6 barw światła – białe (kontrola), zimne białe, niebieskie, czerwone, żółte, fioletowe – oraz 2 warianty oświetlenia UV o różnej intensywności – UV-3 i UV-30.

Próbkę nasion rzodkiewki o masie 1,0 ± 0,1 g moczono w 5 ml wody destylowanej przez 4 h w ciemności w temperaturze pokojowej. Po tym czasie nasiona umieszczono na szalce Petriego (\emptyset = 10 cm) wyłożonej dwoma warstwami bibuły filtracyjnej zwilżonej wodą destylowaną. Próbki hodowano w fitotronie FITO DUO (Biogenet, Polska) w ciemności (24 h), a następnie w warunkach oświetlenia w reżimie fotoperiodycznym [16 h/8 h; 25°C/20°C (dzień/noc), przy stałej wilgotności powietrza wynoszącej 70%].

Wykorzystywany fitotron wyposażony był w diody LED emitujące światło:

- białe (zimna biel (CW), 5000 K; ciepła biel (WW), 2700 K);
- niebieskie (niebieskie (B), λ = 460–480 nm; indygo (DB), λ = 430–450 nm);
- czerwone (czerwone (R), λ = 630–650 nm; głęboka czerwień (DR), λ = 650–670 nm; daleka czerwień (FR), λ = 710–740 nm);
- ultrafioletowe (UV), $\lambda = 395-400$ nm.

Każdy wariant oświetlenia testowano w pięciu powtórzeniach (piąć szalek Petriego), analizie poddając łącznie 5 g nasion. W Tabeli 2. przedstawiono wybrane wersje oświetlenia, ustalone indywidualnie do wariantu prowadzonych hodowli, z uwzględnieniem zarejestrowanego natężenia światła.

Tabela 2. Zastosowane wersje oświetlenia – kontrola, zimne białe, niebieskie, czerwone, żółte, fioletowe, UV-3, UV-30 – z podaną intensywnością (%) wybranego kanału świetlnego.

Źródła	Wersja oświetlenia							
światła	Białe (kontrola)	Zimne białe	Niebieskie	Czerwone	Żółte	Fioletowe	UV-3	UV-30
CW [%]	50	100					50	50
WW [%]	50				100		50	50
B [%]	50		100			100	50	50
DB [%]	50		100			100	50	50
R [%]	50			100		100	50	50
DR [%]	50			100		100	50	50
FR [%]	50						50	50
UV [%]							3	30
Natężenie [kLux]	5,05±0,05	4,90±0,20	3,54±0,01	4,61±0,01	4,15±0,02	4,10±0,02	5,76±0,02	6,22±0,02

Rośliny podlewano dwa razy dziennie 5 ml wody destylowanej. Eksperyment prowadzono przez pięć kolejnych dni (DAT; *ang.* day after treatment). W przypadku układu kontrolnego, próbki zbierano codziennie, rozpoczynając po etapie 24-godzinnego wzrostu w ciemności (1 DAT). W przypadku testowanych wariantów oświetlenia, próbki również zbierano każdego dnia, rozpoczynając po 24 godzinach działania światła jako czynnika różnicującego (2 DAT). Kiełkujące nasiona zbierano każdorazowo z pięciu niezależnych powtórzeń dla każdego wariantu eksperymentu. Podczas zbioru próbek liczono wykiełkowane oraz niewykiełkowane nasion. Procent kiełkowania obliczono jako liczbę wykiełkowanych nasion podzieloną przez liczbę nasion ogółem i wyrażono w procentach. Profil kiełkowania wyznaczono zestawiając procent kiełkowania z kolejnych dni rozwoju rzodkiewki.

Próbki bezpośrednio po zbiorze, zamrażano w ciekłym azocie, a następnie liofilizowano w temperaturze –50°C (liofilizator ChristAlpha 1-2 LDplus, Osterode am Harz, Niemcy). Liofilizowane próbki rozdrabniano przy użyciu młynka kriogenicznego (SPEX 6775 Freezer/Mill; SpexSamplePrep, Metuchen, NJ, USA). Młynek kriogeniczny wstępnie schładzano przez 5 min, a następnie próbki rozdrabniano za pomocą impaktora napędzanego magnetycznie z szybkością 15 CPS (cykli na sekundę). Materiał roślinny poddano dwóm 30-sekundowym cyklom rozdrabniania z zachowaniem 1 min przerwy, co zapewniło odpowiednią temperaturę próbek we wszystkich cyklach rozdrabniania. Próbki przechowywano w temperaturze –28°C do czasu dalszej analizy.

W tak pozyskanych próbkach oznaczono aktywność fitaz, zawartość: (i) fosforu nieorganicznego (Pi), (ii) białek, (iii) nukleotydów adeninowych (AMP, ADP, ATP), (iv) barwników fotosyntetycznych (chlorofil całkowity i karotenoidy), (v) związków fenolowych, (vi) flawonoidów, (vii) związków przeciwutleniających oraz ich zdolność antyoksydacyjną. Ponadto, określono również profile fosforowe ³¹P NMR i status energetyczny (AEC) oraz ich profil kiełkowania.

2.2 Ustalenie wpływu dodatku jonów metali na kiełkowanie i kondycję kiełków rzodkiewki

W eksperymencie badano wpływ jonów Cu^{2+} , Mn^{2+} oraz Zn^{2+} , podanych w formie wodnych roztworów, których stężenie wynosiło odpowiednio 0,5 µM, 5 µM lub 50 µM. Każdy wariant doświadczenia prowadzono w pięciu powtórzeniach, podobnie próbę kontrolną, którą stanowiła woda bez dodatku jonów metali.

Próbkę nasion rzodkiewki o masie $1,0 \pm 0,1$ g moczono w odpowiednich roztworach (4 h w ciemności, temperatura pokojowa) zgodnie ze schematem przedstawionym

46

na Rysunku 22. Po tym czasie nasiona wraz z właściwymi roztworami przeniesiono na szalki Petriego (\emptyset = 10 cm) wyłożone podwójną warstwą bibuły filtracyjnej.



Rysunek 22. Schemat przedstawiający poszczególne etapy prowadzenia hodowli rzodkiewki z dodatkiem wybranych wodnych roztworów jonów metali.

Eksperymenty prowadzono w pokoju hodowlanym, w stałej temperaturze ($25 \pm 1^{\circ}$ C) przez 5 dni. Przez pierwsze 24 h rośliny rozwijały się bez dostępu światła, a następnie w warunkach oświetlenia z fotoperiodem: 16 h/8 h (dzień/noc); 1,38 ± 0,02 kLux. Rośliny podlewano dwa razy dziennie; pierwsze dwa razy (po 4 i 20 h od rozpoczęcia eksperymentu) 5 ml testowanych roztworów, a następnie taką samą objętością wody destylowanej. W ten sposób kiełkujące nasiona rozwijały się w obecności odpowiednio 0,095, 0,955 i 9,550 nmoli jonów w przeliczeniu na cm² powierzchni. Próbki zbierano przez kolejne dni trwania eksperymentu (DAT), rozpoczynając po 4 godzinnym namaczaniu (0 DAT). Kiełkujące nasiona zbierano codziennie z pięciu szalek dla każdego wariantu eksperymentalnego i liczono ilość wykiełkowanych i niewykiełkowanych nasion. Próbki po zbiorze liofilizowano, mielono i przechowywano do czasu przeprowadzenia oznaczeń, analogicznie jak w punkcie 2.1.

W próbkach oznaczono aktywność fitaz, zawartość: (i) fosforu nieorganicznego (Pi), (ii) białek, (iii) nukleotydów adeninowych (AMP, ADP, ATP), (iv) pigmentów fotosyntetycznych (chlorofil całkowity i karotenoidy), (v) związków fenolowych,

47

(vi) związków przeciwutleniających oraz ich zdolność antyoksydacyjną, a także określono profile fosforowe ³¹P NMR, status energetyczny (AEC) i profil kiełkowania nasion.

2.3 Określenie wpływu preparatów fungicydowych na kiełkowanie oraz kondycję kiełków i siewek ogórka

Doświadczenie przeprowadzono w dwóch wariantach, w których badano wpływ przedsiewnego oraz dolistnego stosowania preparatów fungicydowych na rozwój i metabolizm roślin w początkowej fazie wzrostu. *Wariant 1* – przedsiewne zaprawianie nasion preparatem przeprowadzono ze względu na możliwość przenoszenia się mączniaka przez nasiona roślin [179,180] oraz ze względu na obecność pozostałości związków czynnych o działaniu fungicydowym w owocach ogórka [181,182] i jednoczesny brak danych o wpływie fungicydów na kiełkowanie nasion. *Wariant 2* – aplikacja dolistna odpowiada zaleceniom dotyczącym stosowania testowanych fungicydów. Ze względu na fakt, iż preparaty fungicydowe są często stosowane w profilaktyce mączniaka, określono ich wpływ na siewki ogórka.

W badaniach zastosowano dwa komercyjnie dostępne preparaty fungicydowe: Scorpion 325 SC (Agrecol) oraz Magnicur Finito 687,5 SC (Protect Garden, Bayern). Substancje czynne w preparacie Scorpion 325 SC stanowią azoksystrobina (200 g L⁻¹) i difenokonazol (125 g L⁻¹), natomiast w MagnicurFinito 687,5 SC chlorowodorek propamokarbu (55,31% w/w) i fluopikolid (62,5% w/w). Końcowe stężenia wykorzystywanych roztworów fungicydów były zgodne z zaleceniami producentów i wynosiły odpowiednio 0,1% i 0,3%.

Wariant 1

Próbki nasion ogórka (*Cucumis sativus* Izyd F1) o masie 1,0 \pm 0,1 g moczono przez 4 h w ciemności (21°C) w wodzie destylowanej lub roztworze odpowiedniego fungicydu zgodnie ze schematem 1. przedstawionym na Rysunku 23. Po tym czasie roztwory odrzucono, a nasiona przeniesiono na szalkę Petriego (Ø = 10 cm) wyłożoną bibułą filtracyjną. Próbki hodowano w fitotronie w ciemności (24 h), a następnie w warunkach oświetlenia (światło białe) w reżimie fotoperiodycznym (16 h/8 h dzień/noc, 25°C/20°C (dzień/noc), przy stałej wilgotności powietrza wynoszącej 70%). Rośliny podlewano dwa razy dziennie 5 ml wody destylowanej. Eksperyment prowadzono przez pięć kolejnych dni (DAT), rozpoczynając od 4-godzinnego namaczania w roztworze badanego fungicydu (0 DAT). Eksperyment prowadzono w pięciu niezależnych powtórzeniach dla każdego wariantu doświadczenia, a kiełkujące nasiona zbierano codziennie. Podczas każdego zbioru liczono ilość wykiełkowanych i niewykiełkowanych nasion. Próbki po zebraniu liofilizowano, mielono i przechowywano do czasu przeprowadzenia oznaczeń, analogicznie jak w punkcie 2.1.



Rysunek 23. Schemat przedstawiający poszczególne etapy prowadzenia hodowli ogórka traktowanych badanymi preparatami grzybobójczymi: (1) *Wariant 1* – przedsiewne zaprawianie nasiona, (2) *Wariant 2* – aplikacja dolistna.

Wariant 2

Próbki nasion ogórka (*Cucumis sativus* Izyd F1) o masie 1,0 ± 0,1 g moczono przez 4 godziny w ciemności (21°C) w wodzie destylowanej. Nasiona przeniesiono na szalki Petriego (\emptyset = 10 cm) wyłożone bibułą filtracyjną. Rośliny hodowano w fitotronie w warunkach szklarniowych (pierwsze 24 h w ciemności, a następnie stosowano fotoperiod: 16 h/8 h (światło/ciemność); 25/20°C (dzień/noc); wilgotność 70%. W ósmym dniu wzrostu liście siewek ogórka opryskano 1 ml badanego roztworu fungicydu, zgodnie ze schematem 2. przedstawionym na Rysunku 23. Po zabiegu siewki rozwijały się w optymalnych warunkach fotoperiodu. Eksperyment prowadzono w pięciu powtórzeniach dla poszczególnych warunków doświadczalnych, a próbki zbierano przez pięć kolejnych dni (DAT), rozpoczynając od siewek zebranych po dwóch godzinach po oprysku (0 DAT). Podczas zbioru siewki (n = 10) dzielono na dwie części – nadziemne (pęd zawierający dwa zielone liścienie i liście właściwe) i podziemne (korzenie). Próbki liofilizowano, mielono i przechowywano do czasu przeprowadzenia oznaczeń, analogicznie jak w punkcie 2.1.

Dla *Wariantu 1* oznaczono aktywność fitazy, zawartość: (i) kwasu fitynowego, (ii) fosforu nieorganicznego (Pi), (iii) białek, (iv) nukleotydów adeninowych (AMP, ADP i ATP), a także oznaczono profil kiełkowania, profile fosforowe ³¹P NMR i status energetyczny (AEC). Natomiast dla *Wariantu 2* oznaczono zawartość: (i) pigmentów fotosyntetycznych (chlorofilu "a", chlorofilu "b" i karotenoidy), (ii) fosforu nieorganicznego, (iii) nukleotydów adeninowych, (iv) związków fenolowych, (v) związków przeciwutleniających oraz ich zdolność antyoksydacyjną, a także określono profile fosforowe ³¹P NMR i status energetyczny (AEC).

3 Wyodrębnianie ekstrahowalnych nieorganicznych i organicznych form fosforu

Dobór metody ekstrakcji związków fosforu z materiału roślinnego

W celu ustalenia najefektywniejszej metody izolacji związków fosforu przeprowadzono różne warianty ekstrakcji w układzie ciało stałe-ciecz (Rysunek 24.). Do badań wybrano nasiona lucerny, kukurydzy, kapusty czerwonej i buraka ćwikłowego, różniące się zarówno budową, jak i wielkością. Materiał badawczy stanowiła zmielona próbka reprezentacyjna $(1,00 \pm 0.01 \text{ g}; n = 3)$. Jako ekstrahenty zastosowano odpowiednio: 35% roztwór kwasu nadchlorowego (HClO₄), wodę dejonizowaną, 0,1 M roztwór wodorotlenku potasu (KOH) oraz metanol (MeOH). Ekstrakcję związków fosforu z próbek nasion roślin prowadzono trzykrotnie przez 5 min lub 30 min, stosując różne techniki wspomagające, takie jak wytrząsanie i ultradźwięki. Ekstrakcję wspomaganą ultradźwiękami przeprowadzono w łaźni ultradźwiękowej (SonoSwiss AG SW3H, 37 kHz, 80 W; Ramsen, Szwajcaria) w temperaturze 25°C, natomiast wytrząsanie prowadzono na wytrząsarce platformowej (Heidolph Vibramax 100; Schwabach, Niemcy) przy 600 obrotów na minutę (obr/min). Na podstawie wyników zawartości ekstrahowalnych form fosforu (całkowitego, nieorganicznego i organicznego) oraz uzyskanych profili fosforowych, do dalszych badań – jako metodę izolacji związków fosforu w rozwijających się roślinach – wybrano 3-krotną ekstrakcję wspomaganą ultradźwiękami z użyciem 35% HClO₄ lub 0,1 M roztworu KOH, która dawała najlepsze rezultaty w przypadku izolowania związków fosfonowych, w których występuje bezpośrednie wiązanie C-P.



Rysunek 24 Schemat wariantów prowadzonych ekstrakcji – dobór metody ekstrakcji związków fosforu z tkanek roślinnych.

Procedura ekstrakcji związków fosforu z materiału roślinnego

Zmielony materiał roślinny (1,00 \pm 0,05 g) ekstrahowano 35% roztworem HClO₄ lub 0,1 M KOH (5 ml) przez 30 min w łaźni ultradźwiękowej. Po każdej ekstrakcji próbkę wirowano (5000 x g) przez 5 min, a supernatant zbierano. Procedurę powtórzono trzykrotnie stosując nową porcją rozpuszczalnika. Następnie nasiona przemyto 5 ml wody destylowanej i zawiesinę ponownie odwirowano. Wszystkie zebrane frakcje połączono i zobojętniono odpowiednio stałym KOH (w przypadku ekstrakcji kwasem) lub 35% HClO₄ (w przypadku ekstrakcji zasadą). pH roztworu doprowadzono do wartości 7,0 \pm 0,5 i następnie chłodzono przez 30 min w celu wytrącenia pozostałego nadchloranu potasu. Powstały osad odwirowano (5000 x g; 5 min). Klarowny roztwór zebrany znad osadu rozcieńczono wodą dejonizowaną do końcowej objętości 25 ml, a następnie przefiltrowano przez sączek Whatman nr 41. Supernatant podzielono na dwie części; 2 ml przechowywano w temperaturze -28°C do czasu oznaczenia zawartości nieorganicznego fosforanu (Pi), natomiast pozostałą część liofilizowano w temperaturze -50°C i przechowywano w -28°C do analizy techniką ³¹P NMR.

4 Określenie profili fosforowych ekstraktów roślinnych techniką ³¹P NMR

W celu określenia profili fosforowych przeprowadzono analizę spektrometryczną ³¹P NMR. Liofilizowany ekstrakt rozpuszczono w mieszaninie składającej się z 600 µl wody dejonizowanej i 400 µl roztworu 0,1 M kwasu (etylenodiamino)tetraoctowego (EDTA) w 1 M NaOH. W zależności od wariantu eksperymentu, pH badanych roztworów doprowadzono do wartości 7,0 ± 0,5 lub 13,0 ± 0,5 stosując 10 M roztwór NaOH. Próbki wirowano przez 5 min (13 000 x g), aby usunąć cząstki stałe, które mogłyby przyczynić się do zakłócenia pomiaru. Supernatant (500 μ l) umieszczono w probówce NMR (Ø = 5 mm). Jako wzorzec zastosowano 1 mM roztwór glufozynatu w D_2O (δ = 42,68 ppm) umieszczony w kapilarze. Widma ³¹P NMR rejestrowano za pomocą spektrometru Bruker Avance DRX 400 MHz (Bruker, Rheinstetten, Niemcy) pracującego przy częstotliwości 161,98 MHz. Pomiary prowadzono w temperaturze 20 ± 1°C przy użyciu impulsu 30°, czasu akwizycji 1,37 s i opóźnienia relaksacji 0,5 s. Dla wszystkich próbek stosowano szerokopasmowe odsprzeganie protonów. Liczba skanów wyniosła 2048 lub 20480, w przypadku specjacji fosforu w nasionach badanych gatunków. Zarejestrowane widma analizowano pod kątem jakościowych i ilościowych zmian sygnałów pochodzących od różnych form fosforu. Do tego celu wykorzystano oprogramowanie Bruker Topspin 3.6.2. Procentową zawartość różnych grup związków fosforoorganicznych w analizowanych ekstraktach, wyznaczono na podstawie pola powierzchni sygnałów obecnych na widmach ³¹P NMR. Przypisanie sygnałów na widmach ³¹P NMR pochodzących od różnych form fosforu dokonano w oparciu o dane literaturowe [183,184].



Rysunek 25 Znormalizowane widma ³¹P NMR ekstraktów z kiełków rzodkiewki rozwijających się w świetle UV-30 w 4 DAT. Końcowe pH ekstraktów wynosiło 7 ± 0,5 (A) oraz 13 ± 0,5 (B). W górnej części panelu przedstawiono powiększoną część widma, aby pokazać różnice w jego strukturze.

5 Oznaczenie zawartości fosforu nieorganicznego

Zawartość nieorganicznych form fosforu (Pi) oznaczono zgodnie z wcześniej opracowaną procedurą Forlani i in. [185], wprowadzając pewne modyfikacje. Do 100 µl ekstraktu dodano 1,0 ml odczynnika kolorymetrycznego (6,2 mM zieleń malachitowa : 34 mM molibdenian amonu w 4 M HCl : woda destylowana; 1:1:2). Dokładnie po 60 s do mieszaniny dodano 100 µl 34% (w/v) roztworu cytrynianu sodu. Następnie zmierzono absorbancję barwnego kompleksu za pomocą spektrofotometru UV-Vis (Rayleigh UV2601 UV/VIS, Pekin, Chiny) przy długości fali λ = 660 nm względem próby ślepej, w której ekstrakt zastąpiony został wodą destylowaną. Pomiaru dokonywano w ciągu 20 min od dodania roztworu kolorymetrycznego do próbki. Stężenie jonów ortofosforanowych obliczono na podstawie krzywej kalibracyjnej wyznaczonej dla każdego eksperymentu z osobna [przykładowe równanie: y = 5,7761x + 0,0297, R² = 0,9983], stosując diwodorofosforan potasu (KH₂PO₄) jako wzorzec. Ilość Pi wyrażono w mg PO₄³⁻ na gram suchej masy (mg g⁻¹ s.m.).

6 Pomiar całkowitej zawartości białka i aktywności enzymatycznej kwaśnej fitazy

Całkowita zawartość białka i aktywność kwaśnej fitazy – fosfohydrolazy *mio*-inozytolu heksakisfosforanu (EC 3.1.3.x) oznaczono zgodnie Z procedura zaprezentowaną w pracy Afify i in. [186] z pewnymi modyfikacjami. Surowy ekstrakt wykazujący aktywność enzymatyczną uzyskano poprzez homogenizację 150 mg materiału roślinnego w 1,2 ml buforu Tris-HCl (10 mM, pH 7,0; zawierający zredukowany glutation, 0,5 mM). Do zawieszonego w buforze materiału roślinnego dodano stały bromek cetylopirydyniowy (końcowe stężenie w próbce wynosiło 0,5% (w/v)) i delikatnie wymieszano. Mieszaninę homogenizowano dwukrotnie przez 30 s, z zachowaniem 15 s przerwy pomiedzy cyklami, stosujac homogenizator ultradźwiekowy Hielscher UP200HT (26 kHz, 200 W, Hielscher Ultrasonics GmbH, Teltow, Niemcy). Następnie surowe ekstrakty wirowano przez 30 min w obniżonej temperaturze (4°C, 13 000 x g). Osad odrzucono, a uzyskany supernatant oczyszczono dodatkowo przez filtr strzykawkowy (0,45 µm). W uzyskanych w ten sposób ekstraktach oznaczono całkowitą zawartość białek i aktywność enzymatyczną fitaz.

Stężenie rozpuszczalnego białka w ekstraktach oznaczono metodą Bradford [187]. Do 20 µl ekstraktu roślinnego, dodano 1 ml odczynnika Bradford. Próbki inkubowano w ciemności przez 10 min. Po tym czasie zmierzono ich absorbancję przy długości fali λ = 595 nm wobec wody. Stężenie rozpuszczalnego białka obliczono na podstawie krzywej kalibracyjnej (y = 0,2802x + 0,3800, R² = 0,9945), stosując albuminę bydlęcą jako wzorzec.

Aktywność enzymatyczną fitaz oznaczono mierząc zdolność uwalniania jonów fosforanowych (Pi) z fitynianu sodu. Ekstrakt roslinny (10 µl) dodano do 240 µl roztworu buforowego octanu sodu (100 mM, pH 5,0, zawierający fitynian sodu (1 mM) i CaCl₂ (1 mM)). Próbki inkubowano w 37°C, przez 60 min. Reakcję enzymatyczną zatrzymano przy użyciu 50 µl 50% roztworu kwasu trichlorooctowego. Stężenie uwolnionych jonów ortofosforanowych określono metodą kolorymetryczną. Do mieszaniny poreakcyjnej dodano 700 µl odczynnika molibdenowego (10% roztwór kwasu askorbinowego i 0,45% roztwór molibdenianu amonu w 0,5 M H₂SO₄; 1:6). Całość inkubowano w 37°C przez 10 min. Po tym czasie mieszaninę wirowano przez 5 min (13 000 x g) w celu usunięcia wytrąconego białka. Absorbancję próbki zmierzono przy długości fali λ = 820 nm względem próby odniesienia, w której enzym został inaktywowany na początku reakcji. Stężenie uwolnionych jonów fosforanowych obliczono na podstawie krzywej kalibracyjnej, stosując KH₂PO₄ jako wzorzec. Jedna jednostka aktywności kwaśnej fitazy [U] jest zdefiniowana jako ilość enzymu, która

uwalnia 1 µmol Pi z fitynianu sodu w ciągu minuty w warunkach prowadzonego eksperymentu.

7 Oznaczenie zawartości kwasu fitynowego w materiale roślinnym

Zmielony materiał roślinny (50 mg) ekstrahowano 0,4 M roztworem kwasu solnego (HCl) (1,5 ml) przez 3,5 godziny na wytrząsarce platformowej (600 obr/min). Następnie ekstrakty wirowano przez 30 min (13 000 x g). Zebrany supernatant filtrowano przez filtry strzykawkowe (0,45 µm). Zawartość kwasu fitynowego w ekstraktach oznaczono metodą Hauga i Lantzsha [188] z niewielkimi modyfikacjami. Do 0,5 ml ekstraktu dodano 1 ml roztworu zawierającego jony żelaza (III) (NH₄Fe(SO₄)₂ · 12 H₂O w 2 M HCl). Mieszaninę ogrzewano (100°C) przez 30 min w suchym bloku grzejnym (myBlock Mini Dry Bath; Benchmark, Sayreville, NJ, USA). W celu wytrącenia kompleksu żelaza z kwasem fitynowym próbki chłodzono (4°C, 30 min), a następnie wirowano przez 30 min (4°C, 13000 x g). Do 500 µl supernatantu dodano 750 µl roztworu kolorymetrycznego (1% roztwór 2,2'-bipirydyny i 1% roztwór kwasu tioglikolowego w wodzie). Absorbancję mierzono przy długości fali λ = 519 nm względem wody destylowanej. Stężenie kwasu fitynowego obliczono na podstawie krzywej kalibracyjnej [y = -0,0036 x + 0,9983, R² = 0,9986] stosując fitynian sodu jako wzorzec. Ilość kwasu fitynowego w badanej próbce wyrażono w mg kwasu fitynowego na gram suchej masy (mg g⁻¹ s.m.).

8 Określenie zawartości nukleotydów adeninowych (ATP, ADP, AMP) metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej

Do materiału roślinnego (100 mg) – zmielonego w młynie kriogenicznym dodawano 6 M roztwór HClO₄ (1 ml) i stosując homogenizator ultradźwiękowy homogenizowano dwukrotnie przez 15 s, z zachowaniem 10 s przerwy pomiędzy cyklami. Następnie mieszaninę wirowano przez 10 min (13000 x g; 4°C). Supernatant neutralizowano 10 M roztworem KOH do wartości pH = 7,0 ± 0,5. Aby zapobiec nadmiernemu ogrzewaniu próbek podczas zobojętniania, proces ten prowadzono w łaźni lodowej. Po ponownym odwirowaniu, próbki oczyszczano przez filtr strzykawkowy (0,22 μ m) i przechowywano w temperaturze -28°C do czasu analizy metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC). Próbki analizowano stosując system Dionex Ultimate® 3000 HPLC (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) wyposażony w detektor diodowy (DAD-3000RS), który monitoruje eluat przy długości fali λ = 254 nm. Rozdziały HPLC prowadzono w temperaturze 30°C, stosując fazę ruchomą złożoną odpowiednio z 5 mM buforu fosforowego (pH 7,0,

zawierającego 1% acetonitrylu (ACN)) i ACN o początkowym stosunku 100:0 (v/v) (Rysunek 26.).



Rysunek 26. Chromatogram przedstawiający rozdział nukleotydów adeninowych: 1 – ATP, 2 – ADP, 3 – AMP. Oznaczenie wykonano dla 400 µM mieszaniny wzorców. Obecność analitów monitorowano przy długości fali λ = 240 nm. Na chromatogramie zaznaczono parametry analityczne – dolna przerywana linia odnosi się do natężenia przepływu (ml min⁻¹), natomiast górna przedstawia zmianę stosunku składników stanowiących fazę ruchomą (udział procentowy składnika A:B).

W ciągu pierwszych 10 min skład fazy ruchomej nie zmieniał się, a szybkość przepływu wynosiła 0,5 ml min⁻¹. Od 10 do 15 min udział buforu fosforanowego zmniejszył się do 75%, czemu towarzyszył wzrost natężenia przepływu fazy ruchomej do 1,0 ml min⁻¹. Następnie, w czasie od 20 do 25 min analizy, skład fazy ruchomej stopniowo powracał do parametrów początkowych. Warunki te utrzymywano do 30 minuty analizy. Próbki termostatowano (8°C) w automatycznym podajniku próbek i nastrzykiwano (20 µl) na kolumnę Phenomenex Gemini 5 µm NX-C18 (250 mm × 4,6 mm; wyposażoną w prekolumnę SecurityGuardTM ULTRA). Zawartość nukleotydów adeninowych (ATP, ADP, AMP) obliczono na podstawie krzywej wzorcowej i wyrażono w µg na gram suchej masy (µg g⁻¹ s.m.). Krzywą wzorcową, zawierającą mieszaninę nukleotydów adeninowych, sporządzono w zakresie stężeń 6,25 – 500 µM. Sygnały pochodzące od poszczególnych analitów określono metodą dodatku wzorca wewnętrznego w stosunku objętościowym 3:1 próbki do wzorca (500 µM roztwór mieszaniny nukleotydów adeninowych). Adenylowany ładunek energetyczny (AEC) obliczono na podstawie wzoru: AEC = [(ATP) + 0,5 (ADP)]/[(ATP) + (ADP) + (AMP)].

9 Pomiar zawartości barwników fotosyntetycznych

Zawartość barwników fotosyntetycznych – chlorofilu a, chlorofilu b oraz karotenoidów – oznaczono spektrofotometrycznie zgodnie z Złotek i in. [189], wzprowadzając niewielkie modyfikacje. Próbkę (50 mg) zmieszano z 25 mg tlenku magnezu (MgO), aby zapobiec

tworzeniu się feofityny, a następnie ekstrahowano 2 ml 80% (v/v) roztworu acetonu przez 2 godziny na wytrząsarce platformowej (600 obr/min), chroniąc próbki przed dostępem światła. Po zakończonym procesie ekstrakcji, próbki wirowano (13 000 x g; 5 min). Absorbancję zebranych ekstraktów zmierzono przy trzech długościach fali λ = 470, λ = 645 i λ = 663 nm, względem 80% (v/v) roztworu acetonu. Całkowita zawartość chlorofilu została obliczona według wzoru: chlorofil całkowity = chlorofil a + chlorofil b = (12,72 A₆₆₃ – 2,59 A₆₄₅) + (22,88 A₆₄₅ – 4,67 A₆₆₃), natomiast zawartość karotenoidów na podstawie wzoru: karotenoidy = (1000 A₄₇₀ – 3,27 × chlorofil a - 104 × chlorofil b)/229. Wyniki wyrażono w mg na gram suchej masy (mg g⁻¹ s.m.).

10 Określenie zawartości antyoksydantów (w tym związków fenolowych i flawonoidów) oraz aktywności przeciwutleniającej ekstraktów z materiału roślinnego

10.1 Przygotowanie wodnych ekstraktów z materiału roślinnego

Próbkę (100 mg) ekstrahowano 2 ml wody destylowanej przez godzinę na wytrząsarce platformowej (600 obr/min). Następnie ekstrakcję kontynuowano w łaźni ultradźwiękowej w temperaturze pokojowej przez 20 min. Podczas ekstrakcji próbkę chroniono przed dostępem światła. W kolejnym etapie ekstrakty filtrowano za pomocą filtrów strzykawkowych (membrana nylonowa, wielkość porów 0,45 μm) i przechowywano w temperaturze –28°C do czasu dalszej analizy.

10.2 Pomiar całkowitej zawartości związków fenolowych

Całkowitą zawartość związków fenolowych (TPC) oznaczono na podstawie z Vale i in. [190]. Do wodnego ekstraktu badanego materiału roślinnego (50 µl) dodawano 2,5 ml odczynnika Folina-Ciocalteu (rozcieńczonego wodą w stosunku 1:10), a następnie 2 ml roztworu węglanu sodu (Na₂CO₃) (7,5%, w/v). Mieszaninę inkubowano w temperaturze 45°C przez 15 min. Po tym czasie zmierzono absorbancję przy długości fali λ = 765 nm. Zawartość związków fenolowych obliczono na podstawie krzywej wzorcowej, przygotowanej z użyciem kwasu galusowego (GAE) jako wzorca [y = 0,0012 GAE (µg ml⁻¹) - 0,0182, R² = 0,9982]. TPC wyrażono jako mg równoważnika kwasu galusowego na gram suchej masy (mg GAE g⁻¹ s.m.).

10.3 Pomiar całkowitej zawartości flawonoidów

Całkowitą zawartość flawonoidów (TFC) określono metodą z chlorkiem glinu (AlCl₃) zgodnie z procedurą opracowaną przez Zhishen i in. [191]. Do 100 µl wodnych ekstraktów dodano 300 µl wody destylowanej, a następnie 30 µl roztworu azotanu(III) sodu (NaNO₂)

(5%). Tak przygotowane próbki inkubowano 5 min w 25°C. Następnie dodano do nich 30 µl AlCl₃ (10%) i pozostawiono na kolejne 5 min. W kolejnym etapie do mieszaniny reakcyjnej dodano 200 µl roztworu NaOH (1 mM) i uzupełniono wodą destylowaną do objętości 1 ml. Następnie zmierzono absorbancję przy długości fali λ = 510 nm. Zawartość flawonoidów obliczono na podstawie krzywej wzorcowej, stosując kwercetynę (Q) jako wzorzec [y = 0,00053 Q (µg ml⁻¹) + 0,00196, R² = 0,9991]. Wyniki wyrażono jako równoważnik kwercetyny na gram suchej masy (mg Q g⁻¹).

10.4 Pomiar ogólnej zawartości związków przeciwutleniających

Do oznaczenia zawartości związków przeciwutleniających zaadaptowano metodę opisaną przez Korzeniowska i in. [192]. Roztwór roboczy ABTS⁺⁺ przygotowano przez zmieszanie 1 ml roztworu kwasu 2,2'-azyno-bis(3-etylobenzotiazolino-6-sulfonowego (ABTS) (14 mM) z 1 ml roztworu nadsiarczanu potasu ($K_2S_2O_8$) (5 mM) i inkubowano przez 20 h w ciemności w 4°C. Następnie mieszaninę rozcieńczono wodą w taki sposób, aby przy długości fali λ = 734 nm uzyskać absorbancję wynoszącą 0,750 ± 0,050. Do 100 µl ekstraktów wodnych dodano 1 ml roztworu roboczego ABTS⁺⁺ i inkubowano przez 6 min. Po tym czasie mierzono absorbancję przy długości fali λ = 734 nm względem wody. Całkowitą zawartość związków przeciwutleniających obliczono na podstawie krzywej wzorcowej [y = - 0,0105 x + 0,7047, R² = 0,9988], stosując kwas 6-hydrohy-2,5,7,8-tetrametylchromano-2-karboksylowy (Troloks) jako wzorzec. Wyniki wyrażono jako mg Troloksu na gram suchej masy (mg Troloksu g⁻¹ s.m.).

10.5 Pomiar aktywności przeciwutleniającej wodnych ekstraktów

Zdolność antyoksydacyjną wodnych ekstraktów mierzono metodą z rodnikiem 2,2-difenylo-1-pikrylohydrazylu (DPPH*) zgodnie z Korzeniowska i in. [192], z niewielkimi modyfikacjami. W początkowej fazie analizy przygotowano metanolowy roztwór DPPH* (0,04 mg ml⁻¹) i pozostawiono na 30 min w temperaturze pokojowej w ciemności. Do 50 µl wodnego ekstraktu dodano roztwór DPPH* (1,95 ml), próbki inkubowano w ciemności przez 30 min. Następnie zmierzono absorbancję przy długości fali $\lambda = 517$ nm wobec metanolu. Dodatkowo zmierzono absorbancję tak zwanej próbki tła, na którą składało się 50 µl ekstraktu i 1,95 ml metanolu. Aktywność przeciwutleniającą wyrażono jako ilość wygaszonych rodników DPPH – % RSA (*ang.* radical scavenging activity) i obliczono przy użyciu następującego wzoru: RSA (%) = [(A_{kontrola} - (A_{próbka} - A_{tto}))/A_{kontrola}] · 100 %, gdzie A_{kontrola} – absorbancja roztworu DPPH, A_{próbka} – absorbancja próbki, A_{tto} – absorbancja próbki z metanolem.

Analiza statystyczna

Dane wyrażono jako średnią \pm SD z co najmniej trzech powtórzeń. Wykresy i analizę statystyczną wykonano w oprogramowaniu OriginPro w wersji 2022 (OriginLab, Orthampton, MA, USA). Dane analizowano w oparciu o jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA oraz testowano pod kątem istotnych (p \leq 0,05) różnic testem Tukeya. Macierzową analizę skupień hierarchicznych (MHCA), przedstawioną w postaci mapy cieplnej z dendrogramami, wykonano w programie Permut Matrix [193]. Analizę i grupowanie przeprowadzono korzystając z algorytmu wykorzystującego miarę odległości euklidesowej i metodę całkowitego połączenia.

IV Omówienie i dyskusja wyników

1 Charakterystyka fosforomu nasion badanych roślin

Zapotrzebowanie roślin na fosfor jest największe w początkowej fazie rozwoju – kiełkowania i tworzenia siewek, dlatego też nasiona roślin gromadzą i magazynują fosfor niezbędny do początkowego wzrostu siewek. Odpowiednia zawartość fosforu nie tylko zwiększa odsetek kiełkujących nasion, ale także skraca czas kiełkowania i wzrostu kiełków. Ze względu na fakt, iż fosfor jest jednym z kluczowych pierwiastków niemetalicznych niezbędnych do życia, badania w obrębie fosforomiki, powinny koncentrować się na specjacji fosforu w tkankach roślin. Z tego też powodu w pierwszej kolejności zostały określone profile fosforowe w nasionach roślin należących do różnych taksonów w oparciu o ekstrahowalne nieorganiczne i organiczne formy fosforu.

Ilościową (zawartość Pi) oraz jakościową (profile fosforowe) analizę fosforomiczną nasion roślin przeprowadzono mierząc zawartości stosownych form fosforu w ekstraktach z nasion. Ekstrakty uzyskano wspomagając ten proces ultradźwiękami (30 min x 3), stosując 0,1 M roztwór KOH jako rozpuszczalnik.

1.1 Zawartość nieorganicznych form fosforu w nasionach wybranych roślin

Zawartość fosforanów (Pi) w ekstraktach z nasion roślin (Wykres 1.) wahała się w zakresie od 0,6 do 3,4 mg Pi g⁻¹ nasion. Najniższą zawartość odnotowano w nasionach kopru "Szmaragd", pietruszki "Alba" i rzeżuchy, natomiast najwyższą w nasionach papryki "Kasia".

Wyniki te są zgodne z danymi literaturowymi uzyskanymi dla nasion kminku, kopru włoskiego, lnu, gorczycy, maku i sezamu, w których zawartość Pi wahała się od 1,1 mg g⁻¹ do 2,8 mg g⁻¹ [194]. Ponadto z obliczonego rozkładu częstotliwości wynika, że większość badanych nasion zawierała nie więcej niż 2 mg Pi w 1 g nasion.



Wykres 1. Zawartość fosforu nieorganicznego w nasionach testowanych gatunków roślin. Wyniki przedstawiono malejąco w obrębie każdej z rodziny taksonomicznej; kolorowe słupki po lewej stronie osi rzędnej oznaczają odrębne rodziny taksonomiczne (AMA – szarłatowate, API – selerowate, AST – astrowate, BRA – kapustowate, CUC – dyniowate, FAB – bobowate, POA – wiechlinowate, SOL - psiankowate).

1.2 Analiza specjacyjna fosforu w badanych nasionach roślin

Charakterystykę związków fosforu, w szczególności organicznych połączeń fosforu obecnych w nasionach roślin przeprowadzono techniką ³¹P NMR. Analizy tą techniką dostarczają szczegółowych informacji na temat różnych oznaczalnychform fosforu, zarówno nieorganicznych, jak i organicznych, obecnych w badanych próbkach. Procentową zawartość poszczególnych grup związków P obliczono na podstawie powierzchni sygnałów (nazwanych zwyczajowo pikami) zarejestrowanych na widmach ³¹P NMR.

Sygnały obecne w zakresie przesunięć chemicznych od -20 do 25 ppm, odpowiadają różnym grupom związków fosforu. Grupy te zidentyfikowano na podstawie przewidywanej wartości przesunięcia chemicznego dla poszczególnych form P, w środowisku o odczynie obojętnym (pH = 7,0 ± 0,5) [184]. Sumę powierzchni pików występujących w analizowanym zakresie widm ³¹P NMR, podzielono na obszary P1–P5 (Rysunek 27.), które odpowiadają pasmom pochodzącym od: P1 – polifosforany/difosforany [(-15) – (-3,5) ppm],

P2 – fosfodiestry [(-1) – 1,5 ppm]; P3 – fityniany/ortofosforany [1,5 – 3,7 ppm]; P4 – inne fosfomonoestry [3,7 – 6 ppm]; P5 – naturalne fosfoniany [15 – 23 ppm]. Pasma fosfodiestrowe obejmują reszty kwasów nukleinowych (głównie DNA), charakteryzujące się szerokim sygnałem w pobliżu 0 ppm oraz nienaruszone fosfolipidy. Natomiast sygnały rezonansowe pochodnych kwasu fitynowego [1,5 – 3,7 ppm] występują na widmie jako charakterystyczny zestaw pików obrazujący obecność form izomerycznych fosforowych pochodnych kwasu fitynowego o różnej liczbie różnie podstawionych grup fosforanowych związanych z pierścieniem inozytolu.



Rysunek 27. Zestawienie widm ³¹P NMR ekstraktów wybranych nasion marchwi 'Dolanka' (A), soczewicy (B), brokuła (C) i słonecznika (D), ze wskazaniem wartości zakresów przesunięć dla form fosforu P1-P4. Obszary P1–P5 odpowiadają pasmom pochodzącym od: P1 – polifosforany/difosforany [(-15) – (-3,5) ppm], P2 – fosfodiestry [(-1) –1,5 ppm]; P3 – fityniany/ortofosforany [1,5 – 3,7 ppm]; P4 – inne fosfomonoestry [3,7 – 6 ppm]; P5 – naturalne fosfoniany [15 – 23 ppm].

Względną zawartość procentową poszczególnych form P w nasionach wybranych gatunków roślin przedstawiono w Tabeli 3., przeliczając udział poszczególnych form w relacji do całkowitej powierzchni sygnałów zarejestrowanych na widmach ³¹P NMR.

Tabela 3. Względne ilości (%) form fosforu obecnych w zneutralizowanych ekstraktach nasion badanych roślin.

Symbol	Nazwa zwyczajowa; odmiana	P1 (%)	P2 (%)	P3 (%)	P4 (%)	Р5 (%)
AMA1	Burak czerwony "Opolski"	_	10,7	83,3	5,9	0,1
API1	Marchew "Dolanka	-	38,6	19,6	32,1	9,7
API2	Seler "Talar"	-	42,2	14,0	35,9	7,9
API3	Koper "Szmaragd"	-	39,5	23,1	31,7	5,7

Symbol	Nazwa zwyczajowa; odmiana	P1 (%)	P2 (%)	P3 (%)	P4 (%)	P5 (%)
API4	Seler naciowy "Verde Pascal"	0,7	35,6	18,0	38,1	7,6
API5	Pietruszka "Alba"	0,2	38,7	11,4	44,8	4,9
API6	Pasternak "Halflong White"	_	26,6	39,9	27,3	6,2
AST1	Cykoria "Palla Rossa 3"	-	68,9	20,9	8,9	1,3
AST2	Słonecznik	-	65,6	16,7	15,9	1,8
BRA1	Brokuł	-	34,8	51,8	8,3	5,1
BRA2	Brukselka "Long Island"	-	30,7	55,1	13,0	1,2
BRA3	Kalafior "Beta"	-	37,3	48,8	13,1	0,8
BRA4	Kapusta pekińska "Bristol"	0,8	23,8	57,3	17,4	0,7
BRA5	Rzeżucha	0,1	33,7	52,1	9,6	4,5
BRA6	Jarmuż	-	51,0	33,3	13,4	2,3
BRA7	Rzodkiewka	0,4	36,6	50,6	11,1	1,3
BRA8	Czerwona kapusta	0,1	43,8	44,7	9,9	1,5
BRA9	Kapusta włoska "Langedijska"	-	46,2	42,1	9,8	1,9
BRA10	Brukiew "Nadmorska"	0,3	35,8	46,5	12,8	4,6
BRA11	Rzepa "Di milano a collettoviola"	-	56,8	22,0	18,3	2,9
BRA12	Kalarepa "Wener Witte"	0,4	35,5	48,3	13,8	2,0
BRA13	Kapusta biała "Amager Polana"		30,0	45,6	22,8	1,5
BRA14	Gorczyca biała	-	48,0	21,1	23,5	7,4
CUC1	Ogórek "Aladyn F1"	2,0	10,3	76,3	9,4	2,0
CUC2	Dynia zwyczajna "Astra Polka"	-	7,6	86,5	5,8	0,1
CUC3	Dynia olbrzymia "Bambino"	-	4,4	92,3	3,1	0,2
CUC4	Dynia zwyczajna "Kabaczek Złoty Cepelin"	0,6	8,2	90,7	0,2	0,3
CUC5	Dynia zwyczajna "Patison Polo F1"	-	3,3	93,0	3,4	0,3
FAB1	Lucerna siewna	-	3,3	11,3	85,4	-
FAB2	Fasola "Borlotto lingua di fuoco nano"	1,3	86,3	12,5	-	-
FAB3	Bób	1,0	7,5	85,5	6,0	-
FAB3	Fasola "Esterka"	2,1	23,8	54,8	19,3	-
FAB5	Soczewica	0,8	8,8	79,4	10,7	0,3
FAB6	Fasola mung	0,8	39,9	41,1	17,7	0,5
FAB7	Groch	1,8	14,8	73,6	9,2	0,6
POA1	Kukurydza	-	10,9	84,0	3,6	1,5
SOL1	Bakłażan "Black Beauty"	-	13,3	82,8	3,9	-
SOL2	Papryka "Kasia"	-	3,9	88,9	6,2	1,0
SOL3	Papryka "Ożarowska"	_	6,7	72,2	21,1	-
SOL4	Pomidor "Betalux"	0,3	9,2	85,2	4,9	0,4
SOL5	Pomidor "Krakus"	4,0	12,2	72,7	11,1	-
SOL6	Pomidor "Malinowy Olbrzym"	0,2	9,0	81,3	9,5	0,3

Zakres przesunięć chemicznych (ppm) poszczególnych form fosforu zarejestrowanych na widmach ³¹P NMR zneutralizowanego ekstraktu badanych próbek: P1 – polifosforany/difosforany ((-15) – (-3,5) ppm); P2 – fosfodiestry ((-1) – ,5 ppm); P3 – fityniany/ortofosforany (1,5 – 3,7 ppm); P4 – inne monoestry (3,7 – 6 ppm); P5 – fosfoniany (15 – 23 ppm). "–" – nie oznaczono. Błąd standardowy nie przekraczał 10% wartości podanych w tabeli.

Specjacja fosforu techniką ³¹P NMR wykazała, że P występuje w większości nasion w formie fitynianów oraz jonów ortofosforanowych (pasmo P3), których zawartość w zneutralizowanych ekstraktach mieściła się w przedziale od 41,1% dla nasion FAB6 do 92,3 % dla nasion CUC3 wszystkich oznaczonych w ten sposób form fosforu. Kolejne najliczniejsze grupy związków fosforu, stanowiły fosfodiestry (P2) (od 38,6% dla API1 do 86,3% dla FAB2) oraz inne monoestry (P4) (od 27,3% dla API6 do 85,4% dla FAB1). Natomiast względna ilość form fosforu zarejestrowanych w obszarze P1 nie przekracza 4% (dla SOL5) sumy powierzchni wszystkich sygnałów zarejestrowanych na widmach ³¹P NMR. Ze względu na znikome informacje na temat obecności związków fosfonowych w tkankach roślin, szczególnie interesująca jest obecność sygnałów zarejestrowanych w zakresie 15 – 23 ppm (P5), które odpowiadają obecności tego rodzaju połączeń. Zawartość fosfonianów w zobojętnionych ekstraktach nasion roślin wahała się w zakresie od 0,1% do 9,7% wszystkich form P oznaczonych techniką ³¹P NMR.

Podsumowując i pokazując możliwe korelacje dotyczące form fosforu w badanych nasionach roślin, przeprowadzono macierzową analizę skupień hierarchicznych (MHCA) dla nasion należących do 42 wybranych gatunków roślin na podstawie zawartości poszczególnych form fosforu (P1 – P5) i przedstawiono w postaci mapy cieplnej z dendrogramami (Rysunek 28.). Dla wszystkich zmiennych zastosowano transformację wskaźnika *Z-score* oraz procedurę grupowania obiektów i cech posługując się algorytmem wykorzystującym miarę odległości euklidesowej i metodę całkowitego połączenia. Kolorem jasnozielonym oznaczono formy fosforu (P1 – P5), których udział procentowy w profilach fosforowych jest stosunkowo niski. Natomiast kolorem jasnoczerwonym oznaczono formy fosforu, których udział jest stosunkowo wysoki.

Z analizy dendrogramu wynika, że badane nasiona można podzielić na cztery główne klastry. Pierwszy klaster (C1) stanowią nasiona sześciu gatunków roślin należących do tej samej rodziny – selerowatych (API), z wyjątkiem lucerny siewnej (FAB1) należącej do bobowatych. Profil fosforowy nasion występujących w klastrze C1 składał się głównie z fosfodiestrów (P2) i innych monoestrów (P4), stanowiących od 32% do 45%. Wyniki badań wskazują również, że fityniany i ortofosforany (P3) nie były dominującymi formami fosforu, a polifosforany/difosforany (P1), których udział procentowy był znikomy (0,2 – 0,7%), wykryto jedynie w nasionach API4 i API5. Warte uwagi jest występowanie fosfonianów, których największą zawartość stwierdzono w nasionach pietruszki 'Alba' (API5) (9,7%), a najmniejszą w nasionach marchwi 'Dolanka' (API1) (4,9%). Największy klaster (C2), obejmuje wszystkie nasiona należące do rodziny szarłatowatych (AMA), dyniowatych

(CUC), wiechlinowatych (POA) i psiankowatych (SOL) oraz większość nasion roślin należących do rodziny strączkowych (FAB).



Rysunek 28. MHCA profili fosforowych nasion badanych roślin. Nasiona pokazane jako przypisania/symbole są wskazane po prawej stronie. Kolorowe słupki (skupiska C1–C4) po prawej stronie mapy cieplnej oznaczają odrębne główne gałęzie drzewa skupiającego, grupującego nasiona o podobnych wzorach ekspresji. Skala kolorów wskazuje wartość procentową (jasnoczerwony oznacza wyższą wartość procentową, jasnozielony oznacza niższe wartości form fosforu). Na podstawie [6].

W profilach fosforowych nasion w klastrze 2 dominowały fityniany i ortofosforany (P3), które stanowiły 72,2% dla nasion SOL3 i 93,0% w przypadku nasion CUC5 (średnio 83%). Ponadto udziały form P2 i P4 w profilu fosforu nasion z tego klastra (C2) były znacznie niższe od udziału tych form fosforu w nasionach roślin prezentowanych w klastrze 1 (C1) zawartość P2 wahała się od 3,3% dla CUC5 do 14,8% dla FAB7, a udział procentowy P4 mieścił się w zakresie od 0,2% dla CUC4 do 21,1% dla SOL3. Dla większości badanych gatunków roślin przypisanych do klastra 2 nie oznaczono formy P1. Najwyższą zawartość P1 stwierdzono w nasionach SOL5 (4,0%), a najniższy wykrywalny udział tych form

stwierdzono w nasionach SOL6 (0,2% całkowitego zneutralizowanego ekstrahowanego P). Z kolei zawartość procentową fosfonianów w nasionach AMA1 i CUC2 ustalono na 0,1%, a w nasionach CUC1 na poziomie 2,0%.

Do klastra 3 (C3) zakwalifikowana została większość nasion z rodziny krzyżowych (BRA) oraz pojedynczy przedstawiciele z rodzin selerowatych (API) i bobowatych (FAB). Dominującą formą fosforu we wszystkich nasionach w tym klastrze były fityniany/ortofosforany, a ich zawartość wahała się w zakresie od 39,9% do 57,3% w odniesieniu do całkowitego ekstrahowanego fosforu. Drugą najliczniejszą formę stanowiły fosfodiestry (P2), a ich ilość oznaczono na poziomie od 23,8% dla nasion BRA4 i FAB4 do 37,3% dla nasion BRA3. Znaczący udział w profilu fosforu miały inne monoestry (P4), które występowały w zakresie od 8,3% do 27,3% wszystkich oznaczonych form fosforu, natomiast P1 były obecne jedynie w śladowych ilościach. Porównując z C2 odnotowano istotną różnicę w zawartościach fosfonianów w nasionach zakwalifikowanych do C3. Udział procentowych tych form fosforu był zdecydowanie wyższy, wahał się od 0,8% dla BRA3 do 6,2% dla API6.

Ostatni klaster (C4) obejmuje nasiona roślin należących do rodziny astrowatych (AST) oraz nasiona niektórych gatunków z rodzin dyniowatych (CUC) i bobowatych (FAB). W przypadku większości gatunków roślin w tym klastrze dominującą formą fosforu w nasionach były P2 (od 39,9% do 86,3%). Drugą pod względem liczności były fityniany/ortofosforany (12,5% do 44,7%), natomiast udział procentowy fosfonianów w profilach nasion reprezentujących klaster 4, był podobny do gatunków grupowanych w klastrze C3 i wahał się od 0,5% (dla FAB6) do 7,4% dla (BRA14).

Pomimo iż badane nasiona charakteryzują się zróżnicowanym profilem, to można zauważyć pewne podobieństwa. Mapa cieplna z dendrogramami, stworzona na podstawie pomiarów ³¹P NMR wskazuje możliwe korelacje w występowaniu form fosforu w nasionach badanych roślin. W większości przypadków do jednego klastra przypisano nasiona należące do tej samej rodziny botanicznej. Wyjątek stanowią nasiona roślin z rodziny bobowatych. Charakteryzują się one najbardziej zróżnicowanym profilem fosforu, którego nie da się jednoznacznie przypisać do konkretnego klastra. Chociaż udziały procentowe poszczególnych form fosforu były stosunkowo zróżnicowane, i w pewnych zakresach się pokrywały, to jednak statystyczne podejście do analizy profili fosforu badanych nasion potwierdziło, że zaobserwowane różnice są istotne i charakteryzują odpowiednie grupy nasion roślin. Dlatego też obecność określonych form fosforu w odpowiednich proporcjach może stanowić ważną cechę chemotaksonomiczną roślin.

1.3 Naturalne fosfoniany obecne w nasionach roślin

W trakcie przeprowadzonych badań szczególną uwagę poświęcono naturalnie występującym fosfonianom, których obecność w nasionach zaprezentowano w poszczególnych profilach fosforowych nasion. Porównanie rozstępu międzykwartylowego i średniej zawartości fosfonianów, oznaczonych techniką ³¹P NMR, w nasionach testowanych gatunków roślin przedstawiono na Wykresie 2. Do pokazania zależności pomiędzy procentową zawartością fosfonianów w profilu fosforowym nasion a ich przynależnością do danej rodziny roślin, wykorzystano wykres pudełkowy.



Wykres 2. Wykres pudełkowy przedstawiający rozkład zawartości procentowej fosfonianów w nasionach roślin należących do różnych rodzin. Ze względu na zbyt małą liczbę analizowanych gatunków na wykresie nie uwzględniono roślin należących do rodziny szarłatowatych (Amaranthaceae) i wiechlinowatych (Poaceae). Pola wskazują medianę i jej granice ufności; wąsy wskazują zakres danych mieszczący się w przedziale międzykwartylowym ±1,5; "*" oznaczono nasiona skrajnie odstające.

Nasiona roślin należących do rodziny selerowatych zawierały największą względną zawartość fosfonianów spośród badanych gatunków roślin. Udział fosfonianów w profilu fosforowym nasion rodziny API wahał się od 4,9% dla pietruszki "Alba" (API5) do 9,7% dla marchwi "Dolanka" (API1). W przypadku nasion roślin z rodziny BRA fosfoniany występowały w ilościach od 0,7% (kapusta pekińska "Bristol"; BRA4) do 7,4% (gorczyca biała; BRA14) spośród wszystkich zarejestrowanych form fosforu. Natomiast w profilach fosforowych nasion roślin z rodzin AST i POA fosfoniany oznaczono na poziomie 1,3–1,8%. Ilość związków fosfonowych oznaczonych w nasionach z rodzin AMA, CUC, FAB i SOL nie przekraczała 1%, z wyjątkiem nasion ogórka "Aladyn F1" z rodziny CUC (2,0%). Przedstawione wyniki potwierdzają, że obecność fosfonianów nie jest jedynie cechą indywidualną niektórych gatunków roślin, ale że te formy fosforu są rozpowszechnione

w królestwie roślin. Jest to prawdopodobnie konsekwencją powszechnego występowania tych związków w sinicach. Warto w tym miejscu przypomnieć o teorii endosymbiozy, zgodnie z którą sinice przyczyniły się do powstawania pierwotnych plastydów roślin [141], co w połączeniu z naturalnym występowaniem i zdolnością biosyntezy fosfonianów przez sinice [195] może sugerować, że rośliny również potrafią syntetyzować fosfoniany. Hipotezę tę potwierdziły przedstawione wyniki badań [6]. Potwierdzona obecność tych substancji w nasionach roślin może przyczynić się do poszerzenia wiedzy na temat ich funkcji biologicznych. Obecnie istnieje kilka teorii dotyczących roli fosfonianów w organizmach żywych. Według jednej z nich obecność fosfonianów w zewnętrznych błonach komórkowych stanowi barierę ochronną podczas kontaktu z pasożytami [196]. Może to być spowodowane opornością wiązania C-P na degradację enzymatyczną. Ponadto rozmieszczenie fosfonianów tkankach nerwowych bezkregowców morskich sugeruje, że biora one udział w w przekazywaniu impulsów nerwowych [136]. Uważa się również, że ze względu na podobieństwo chemiczne grupy -PO₃H₂ do grupy karboksylowej, biorąc pod uwagę tetraedryczny charakter pośredni tej ostatniej, fosfoniany mogą działać jako antymetabolity przeciwko organizmom połączonym bezpośrednimi oddziaływaniami troficznymi lub w stosunku do organizmów konkurujących o zasoby środowiska. Istnieją także hipotezy sugerujące, że fosfoniany stanowią dodatkową formę magazynowania fosforu w komórkach organizmów żywych [136,196].

1.4 Podsumowanie

Rola fosfonianów w tkankach i narządach roślin jest wciąż przedmiotem dyskusji, a przeprowadzone badania, które jednoznacznie potwierdziły obecność fosfonianów wśród naturalnych składników występujących w nasionach roślin, mogą tę dyskusją wzbogacić. Co więcej, badania profili fosforowych nasion roślin reprezentujących różne rodziny botaniczne wykazały, że profile te różnią się u poszczególnych przedstawicieli i są w pewnym zakresie specyficzne. Zjawisko to może stanowić dodatkową cechę chemotaksonomiczną, która z kolei może znacząco wzbogacić klasyfikację roślin opartą nie tylko na morfologii i anatomii nasion, np. kształtach, powierzchniach, barwie, wielkości, obecności śluzu, skrzydlastych wyrostkach, obecności hilium i fałdowaniu zarodków, ale także na zweryfikowaniu profilu fosforowego nasion [197]. Klasyfikacja roślin pod kątem profili fosforu, w tym obecności fosfonianów, może stanowić nowe podejście o szczególnej wartości w zakresie rozstrzygania wątpliwości taksonomicznych. Należy jednak pamiętać, że dopiero analiza nasion większej liczby gatunków z kilku, bądź kilkunastu rodzin roślin pozwoli na zweryfikowanie znaczenia fosfonianów w chemotaksonomii.

2 Kondycja roślin rozwijających się w optymalnych warunkach wzrostu

Na podstawie przeprowadzonych badań wstępnych nad specjacją fosforu w nasionach roślin należących do różnych rodzin taksonomicznych, do dalszych badań jako gatunki roślin modelowych wybrano rzodkiewkę i ogórka. Pomimo że, rzodkiewnik pospolity (*Arabidopsis thaliana*) jest standardową rośliną modelową, wciąż istnieje potrzeba walidacji i potwierdzenia mechanizmów fizjologicznych i molekularnych u innych gatunków roślin [198]. Rzodkiewka charakteryzuje się odpowiednim stosunkiem tempa wzrostu do masy nasion, co umożliwia analizę zmian zachodzących w czasie kiełkowania – od momentu imbibicji do uzyskania kiełków – w relatywnie krótkim czasie. Standardowym parametrem w ocenie jakości nasion jest energia kiełkowania (czyli udział procentowy nasion, wykiełkowanych w najkrótszym możliwym czasie), którą w przypadku rzodkiewki określa się w 4 dobie hodowli. Natomiast ze względu na zwiększoną podatność roślin dyniowatych na infekcje prowadzące do zamierania całej rośliny wywołane mączniakami (mączniakiem rzekomym i mączniakiem prawdziwym) oraz brakiem szczegółowych badań na temat wpływu komercyjnie dostępnych preparatów fungicydowych jako drugą roślinę modelową wybrano ogórka.

Ze względu na różne partie nasion oraz różny czas prowadzenia poszczególnych eksperymentów, dla każdego układu przeprowadzono równolegle hodowle kontrolne, w których rośliny rozwijały się w optymalnych warunkach wzrostu. Ponadto by ułatwić określenie wybranych stresorów środowiskowych wyniki w dalszej części pracy zostały przedstawione względem układu odniesienia. Wartości te zostały znormalizowane, przyjmując kontrolę jako 100%. Dlatego też ta część pracy zawiera dane bezwzględne, uzyskane dla poszczególnych układów kontrolnych oznaczonych odpowiednio: (i) K (światło) – kontrola dla kiełkujących nasion rzodkiewki rozwijających się w świetle czerwonym, niebieskim, żółtym, fioletowym i białym o zimnej barwie, (ii) K (UV-3) i K (UV-30) – kontrola dla kiełków rzodkiewki poddanych działaniu światła ultrafioletowego, (iii) K (Cu) – kontrola dla kiełków rzodkiewki poddanych działaniu jonów Cu²⁺, (iv) K (Mn/Zn) – kontrola dla kiełków rzodkiewki poddanych działaniu odpowiednio jonów Mn²⁺ oraz Zn²⁺, (v) K (nasiona) – kontrola dla kiełkujących nasion ogórka zaprawianych preparatami grzybobójczymi, (vi) K (łodyga/korzeń) – kontrola dla łodygi lub korzenia siewek ogórka opryskiwanych testowanymi fungicydami.

2.1 Profile fosforowe roślin rozwijających się w optymalnych warunkach wzrostu

Ilościową ocenę poszczególnych grup związków fosforu przeprowadzono w oparciu o analizy NMR (przesunięcia chemiczne i pola powierzchni poszczególnych pików obecnych na widmach). Ze względu na różnice w przygotowaniu próbek do pomiarów techniką ³¹P NMR (końcowe pH ekstraktów), zawartości poszczególnych oznaczonych form fosforu przedstawiono w dalszej części pracy, wraz z wynikami odpowiednich warunków eksperymentalnych. Takie zestawienie ponadto umożliwi lepsze porównanie wpływu badanego czynnika na przemiany form fosforu w trakcie rozwoju badanych gatunków roślin.

2.2 Zmiany zawartości Pi, kwasu fitynowego, aktywności enzymatycznej fitaz oraz zawartości białka w badanych gatunkach roślin rozwijających się w warunkach optymalnych

Fosfor obecny w nasionach roślin magazynowany jest głównie w postaci kompleksów fitynianowych kwasu fitynowego z jonami metali [199]. We wczesnym etapie kiełkowania fitazy katalizują enzymatyczną hydrolizę kwasu fitynowego do inozytolu z uwolnieniem jonów ortofosforanowych [29,200]. Dlatego też postanowiono sprawdzić nie tylko zmiany zawartości fosforu nieorganicznego w czasie kiełkowania i rozwoju siewek, ale także zmiany aktywności enzymatycznej fitaz oraz zawartości kwasu fitynowego. Zastosowana metoda stosowana w oznaczaniu zawartości kwasu fitynowego okazała się nieskuteczna dla kiełkujących nasion rzodkiewki. Prawdopodobnie było to spowodowane zbyt niskim stężeniem kwasu fitynowego (poniżej poziomu oznaczalności metodą spektrofotometryczną) w analizowanych próbkach.

Na Wykresie 3. A i B przedstawiono zmiany zawartości Pi w kiełkach rzodkiewki, natomiast na Wykresie 3. C zestawiono zmiany zawartości Pi i kwasu fitynowego w kiełkujących nasionach ogórka.

69



Wykres 3. Zawartość fosforu nieorganicznego (Pi) w kiełkach rzodkiewki rozwijających się w optymalnych warunkach wzrostu (A i B) oraz zawartości Pi i kwasu fitynowego w kiełkujących nasionach ogórka rozwijających się w optymalnych warunkach wzrostu (C).

Zawartość fosforu nieorganicznego wzrastała w czasie trwania hodowli, a dynamika wzrostu różniła się w zależności od gatunku rośliny oraz partii nasion. Średnia zawartość Pi w kiełkach rzodkiewki w kolejnych dniach wynosiła odpowiednio 1,34 (0 DAT), 1,76 (2 DAT), 2,57 (3 DAT), 3,08 (4 DAT) i 5,05 (4 DAT) mg g⁻¹ s.m. Najniższą zawartość (0,99 mg g⁻¹ s.m.) Pi w kiełkach rzodkiewki odnotowano dla K (Mn/Zn) w 1 DAT, natomiast najwyższą (7,14 mg g⁻¹ s.m.) dla K (Cu) w 4 DAT. W przypadku kiełkujących nasion ogórka zawartość Pi w pierwszych dniach hodowli utrzymywała się na stałym poziomie 1,54 ± 0,08 mg g⁻¹ s.m. (0 – 3 DAT) i wzrosła do 5,21 ± 0,20 mg g⁻¹ s.m. w 7 DAT. Zmiana zawartości Pi była skorelowana ze zmianą zawartość kwasu fitynowego w kiełkujących nasionach ogórka. Zawartość kwasu fitynowego malała w czasie trwania hodowli od 5,25 ± 0,15 mg g⁻¹ s.m. do 4,33 ± 0,08 mg g⁻¹ s.m.. Zmiany zawartości Pi w większości przypadków były również skorelowane ze zmianą i aktywności enzymatycznej fitaz (Wykres 4.).



Wykres 4. Aktywność enzymatyczna fitaz w kiełkach rzodkiewki (A i B) oraz w kiełkujących nasionach ogórka rozwijających się w optymalnych warunkach wzrostu (C).

Aktywność fitaz w kiełkach rzodkiewki wzrastała w czasie i mieściła się w zakresie 0,17 – 3,51 U g⁻¹ s.m. dla K (światło); 0,21 – 0,88 U g⁻¹ s.m. dla K (UV-3); 0,19 – 0,85 U g⁻¹ s.m. dla K (UV-30); 0,32 – 2,74 U g⁻¹ s.m. dla K (Cu) oraz 0,12 – 2,05 U g⁻¹ s.m. dla K(Mn/Zn). Natomiast aktywność fitaz w kiełkujących nasionach ogórka wzrastała od 18,24 ± 0,50 mU g⁻¹ s.m. do 183,41 ± 29,46 mU g⁻¹ s.m. w 0 – 4 DAT. Po 4 DAT zauważalny był spadek aktywności enzymatycznej do 102,19 ± 4,17 mU g⁻¹ s.m. Różnica rzędu wielkości pomiędzy aktywnością fitaz rzodkiewki i ogórka może tłumaczyć niewykonalność oznaczeń kwasu fitynowego w kiełkach rzodkiewki → ze względu na większą aktywność fitaz nie można było oznaczyć zawartości Pi i kwasu fitynowego nie korelowały w prosty sposób z aktywnością fitazy. Jednakże zaobserwowany wzrost aktywności fitazy w kiełkujących nasionach ogórka w 3 i 4 DAT może być powiązany ze wzrostem zawartości białka (Tabela 4.) w trakcie kiełkowania.

Tabela 4. Zawartość białka w rzodkiewce i ogórku rozwijających się w warunkach optymalnych.

Układ kontrolny –	DAT							
	0	1 2 3		3	4	7		
K (światło)		$5,24 \pm 0,18$	$5,52 \pm 0,11$	8,87 ± 1,09	$5{,}62\pm0{,}14$			
Liklad kontrolmy	DAT							
------------------	-------------	---------------------	--------------------	--------------------	--------------------	--------------	--	--
Okiau kontrolliy	0	1	2	3	4	7		
K (UV-3)		$14,\!39\pm0,\!52$	$14{,}78\pm0{,}33$	$13,\!41\pm0,\!09$	$15{,}08\pm0{,}18$			
K (UV-30)		$13,33\pm0,05$	$15{,}28\pm0{,}30$	$14,\!89\pm0,\!28$	$13{,}53\pm0{,}09$			
K (Cu)	7,93 ± 0,39	$7{,}68 \pm 0{,}61$	$7,\!68\pm0,\!61$	$8,\!29\pm0,\!79$	$8,\!63\pm0,\!42$			
K (Mn/Zn)	7,02 ± 0,9	$8,\!12\pm0,\!64$	$6,\!69\pm0,\!87$	7,87 ± 0,67	$8,\!28\pm0,\!57$			
K (nasiona)	8,14 ± 0,51	6,88 ± 1,25	$8,\!37\pm0,\!59$	$8,\!07\pm0,\!40$	9,60 ± 1,11	12,47 ± 0,41		

Najniższa zawartość białka wyniosła 6,88 ± 1,25 mg g⁻¹ s.m. (1 DAT), a najwyższa 12,47 ± 0,41 mg g⁻¹ s.m. (7 DAT). Natomiast w kiełkach rzodkiewki wartości te wynosiły odpowiednio 5,24 ± 0,18 mg g⁻¹ s.m. (1 DAT dla K (światło)) oraz 15,08 ± 0,18 mg g⁻¹ s.m. (4 DAT dla K(UV-3)).

2.3 Zmiany w zawartości nukleotydów adeninowych w roślinach rozwijających się w optymalnych warunkach wzrostu

Zawartości nukleotydów adeninowych w poszczególnych dniach rozwoju rzodkiewki przedstawiono na Wykresie 5. Trend zmian zawartości AMP jest różny w zależności od zastosowanej partii nasion. Najniższą zawartość (94,55 ± 7,85 µg g⁻¹ s.m.) odnotowano dla K(Cu) w 0 DAT, natomiast najwyższą (360,48 ± 17,28 µg g⁻¹ s.m.) dla K(Mn/Zn) również w 0 DAT.



Wykres 5. Zmiany zawartości nukleotydów adeninowych w kiełkach rzodkiewki rozwijających się w warunkach kontrolnych: A – K (światło); B – K(UV-3); C – K(UV-30); D – K(Cu); E – K(Mn/Zn).

Zawartość ADP w każdym przypadku wzrasta w czasie trwania hodowli, natomiast zmiany w zawartości ATP fluktuują, nie wykazując żadnej tendencji. Wyjątek stanowi K (światło) i K (UV-30), dla których zaobserwowano spadek zawartości adenozyno-5'-trifosforanu w kolejnych dniach eksperymentu.

W Tabeli 5. zestawiono zmiany zawartości nukleotydów adeninowych w kiełkujących nasionach ogórka (Wariant 1) oraz łodydze i korzeniach siewek ogórka (Wariant 2). Analizując przedstawione dane można zauważyć, że zawartości AMP, ADP i ATP w kiełkujących nasionach zwiększa się wraz z czasem kiełkowania. W przypadku siewek, w roślinach prowadzących już proces fotosyntezy, zmiany w zawartości ADP miały tendencje spadkową, zarówno w łodydze, jak i korzeniach. Jednocześnie, adenozyno-5'-difosforan miał największy udział spośród wszystkich nukleotydów adeninowych. Natomiast, najniższy udział miał adenozyno-5'-trifosforan w obu badanych częściach roślin ogórka. Zawartość ATP w częściach nadziemnych pozostawała stała i wahała się w granicach 31,05 – 57,39 μ g g⁻¹ s.m.. Podobne wahania odnotowano w przypadku AMP, którego zawartość kształtowała się na poziomie 66,44 – 114,86 μ g g⁻¹ s.m..

Tabela 5. Zawartości nukleotydów adeninowych (μ g g⁻¹ s.m.) oraz wartości adenylowanego ładunku energetycznego w kiełkujących nasionach (Wariant 1) oraz łodydze i korzeniu (Wariant 2) ogórka rozwijającego się w warunkach optymalnych. Dla Wariantu 1 próbki pobierano przez 6 dni od momentu imbibicji, natomiast dla Wariantu 2 próbki zbierano prze 5 kolejnych dni.

Deveryoter	C-síá málim	DAT					
Parametr	Częsc rosiin	0	1	2	3	4	7
	Kiełkujące nasiona	18,85 ±0,35	25,45±2,03	37,23±3,56	55,92±10,10	50,98±0,18	115,19±9,30
AMP -	Łodyga	108,93±5,93	99,47±1,77	78,46±4,84	69,11±2,67	91,65±3,56	
	Korzeń	207,40±12,23	136,97±2,84	156,23±5,88	152,27±20,92	128,42±19,46	
ADP -	Kiełkujące nasiona	149,65±1,61	155,65±6,47	168,10±11,74	254,67±38,29	297,58±43,43	599,51±11,91
	Łodyga	579,77±28,01	471,74±23,26	356,78±21,04	331,32±40,45	400,86±27,34	
	Korzeń	824,21±52,79	463,19±805	659,40±38,99	731,60±74,69	569,53±89,44	
	Kiełkujące nasiona	44,91±4,73	65,92±2,83	75,60±4,15	83,47±8,66	87,82±15,20	53,32±2,29
ATP -	Łodyga	51,95±5,44	48,08±9,89	33,88±2,83	38,58±4,96	37,78±6,43	
	Korzeń	47,84±1,84	33,52±1,82	96,32±5,11	105,00±15,44	59,14±3,81	

Adenylowy ładunek energetyczny przedstawia charakter przemian metabolicznych zachodzących w organizmach żywych. Wartości parametru AEC powyżej 0,5 informują o przewadze procesów anabolicznych, natomiast poniżej 0,5 świadczą o przewadze procesów katabolicznych. W Tabeli 6. zestawiono wartości parametru AEC kiełków rzodkiewki, kiełkujących nasion ogórka oraz siewek ogórka w poszczególnych dniach hodowli. Wartości parametru AEC w kiełkach rzodkiewki rozwijających się w optymalnych warunkach wzrostu

i oznaczonych K (światło), K (UV-3) i K (UV-30) były na stałym poziomie i mieściły się w zakresie 0,41 – 0,47; dla K(Mn/Zn) wzrastały w czasie od 0,33 do 0,48. Natomiast w przypadku K (Cu) wartość parametru AEC oscylowała w zakresie 0,56 – 0,61, co świadczy o przewadze procesów anabolicznych.

Ulilad kontuoluu	DAT							
	0	1	2	3	4	7		
K (światło)		$0,\!46\pm0,\!02$	$0,\!44\pm0,\!01$	$0,\!46\pm0,\!00$	$0,\!47\pm0,\!00$			
K (UV-3)		$0,\!46\pm0,\!01$	$0,\!41\pm0,\!01$	$0,\!46\pm0,\!01$	$0,\!48\pm0,\!02$			
K (UV-30)		$\textbf{0,}42 \pm \textbf{0,}01$	$0,\!44\pm0,\!00$	$0,\!43\pm0,\!01$	$0,\!45\pm0,\!01$			
K (Cu)	$0,\!60\pm0,\!01$	$0{,}58\pm0{,}01$	$0,\!56\pm0,\!00$	$0,\!60\pm0,\!01$	$0,\!58\pm0,\!01$			
K (Mn/Zn)	$0,\!34\pm0,\!01$	$\textbf{0,}42\pm\textbf{0,}01$	$0,\!43\pm0,\!01$	$0,\!44\pm0,\!01$	$0,\!47\pm0,\!01$			
K (nasiona)	$0,\!56\pm0,\!01$	$0{,}58\pm0{,}00$	$0,\!57\pm0,\!01$	$0{,}54\pm0{,}01$	$0,\!54\pm0,\!02$	$0,\!46\pm0,\!00$		
K (łodyga)	$0,\!46\pm0,\!01$	$0,\!48\pm0,\!03$	$0,\!45\pm0,\!03$	$0,\!49\pm0,\!04$	$0,\!45\pm0,\!01$			
K (korzeń)	0,42 ± 0,02	0,42 ± 0,00	0,47 ± 0,01	0,47 ± 0,00	0,45 ± 0,01			

Tabela 6. Wartości parametru AEC w kiełkach rzodkiewki, kiełkujących nasionach ogórka oraz łodydze i korzeniach siewek ogórka rozwijających się w optymalnych warunkach wzrostu.

W przypadku nasion ogórka, wartość parametru AEC maleje w trakcie kiełkowania. Jednocześnie zmianom ulega charakter przemian metabolicznych – w początkowym etapie kiełkowania przeważają reakcje anaboliczne (0 – 4 DAT), które po 4 DAT ustępują procesom katabolicznym. Natomiast w siewkach ogórka wartości parametru AEC utrzymują się na stałym poziomie (K (łodyga)) lub nieznacznie fluktuują (K (korzeń)), jednak charakter zachodzących przemian metabolicznych świadczy o przewadze procesów katabolicznych.

2.4 Profile wzrostu

Proces kiełkowania składa się z trzech etapów: (i) wchłaniania wody, (ii) aktywacji i (iii) wzrostu wewnątrz-nasiennego zakończonego wysunięciem zarodka. Jednak, ze względu na stopniowe przemiany metaboliczne zachodzące w wielokomórkowej i złożonej tkance nasion trudno jest ustalić początek i koniec każdego z poszczególnych procesów [201]. Dlatego też kryterium makroskopowe – wysunięcie zarodka – jest jednym z jakościowych atrybutów w ocenie zdolności kiełkowania. Ponadto, zastosowanie odpowiedzi binarnej (kiełkujące/niekiełkujące), jest najprostszą metodą oznaczania jakości nasion i może być przeliczane na atrybut ilościowy, zwykle procentowy [202].

Procent wykiełkowanych nasion przedstawiono na Wykresie 6. Liczba wykiełkowanych nasion wzrastała w czasie trwania hodowli. Największe zmiany zaobserwowano pomiędzy 1 DAT i 2 DAT w przypadku rzodkiewki oraz 2 DAT i 3 DAT w przypadku ogórka. Następnie doszło do wyrównania kiełkowania, a tempo kiełkowania zmalało. Maksymalny procent wykiełkowanych nasion rzodkiewki był na poziomie 85 – 95% (K (światło), K (Cu),

K (Mn/Zn)) oraz 55 – 70% (K (UV-3), K (UV-30)). Natomiast najwyższy procent wykiełkowanych nasion ogórka wynosił 89%.



Wykres 6. Dynamika kiełkowania nasion rzodkiewki (A, B) oraz ogórka (C) wyrażona w procentach jako stosunek całkowitej liczby badanych nasion.

2.5 Zawartość barwników fotosyntetycznych w kiełkach rzodkiewki i siewkach ogórka rozwijających się w optymalnych warunkach wzrostu

Zawartość chlorofilu całkowitego (Tabeli 7.) do 2 DAT była poniżej poziomu oznaczalności. Najwyższą zawartości w 4 DAT odnotowano dla K (Cu) (1,31 ± 0,09 mg g⁻¹ s.m.), natomiast najniższą dla K (UV-30) (0,18 ± 0,03 mg g⁻¹ s.m.). Zawartość karotenoidów mieściła się w zakresie 0,01 – 0,35 mg g⁻¹ s.m. i wzrastała w czasie trwania hodowli. Jej najwyższą wartość odnotowano dla K (światło) w 4 DAT.

Tabela 7. Zawartość barwników fotosyntetycznych (chlorofilu całkowitego i karotenoidów) w kiełkach rzodkiewki rozwijających się w optymalnych warunkach wzrostu.

Barwnik	Illilad kontrolary	DAT						
fotosyntetyczny	Układ kontrolny	0	1	2	3	4		
chlorofil całkowity	K (światło)		n.s.	n.s.	$0,\!23\pm0,\!01$	$1,\!12\pm0,\!07$		
	K (UV-3)		n.s.	n.s.	0,07 ± 0,01	$0,\!38\pm0,\!08$		
	K(UV-30)		n.s.	n.s.	$0,\!03\pm0,\!00$	$0,\!18\pm0,\!03$		
	K (Cu)	n.s.	n.s.	n.s.	$0,\!21\pm0,\!01$	$1,\!31\pm0,\!09$		

Barwnik	Illihad kontrolmu	DAT					
fotosyntetyczny	Układ kontrolny	0	1	2	3	4	
	K (Mn/Zn)	n.s.	n.s.	n.s.	$0,\!15\pm0,\!00$	$1,12\pm0,07$	
karotenoidy	K (światło)		$0,\!04\pm0,\!01$	$0,\!02\pm0,\!00$	$0,\!09\pm0,\!32$	$0,\!32\pm0,\!03$	
	K (UV-3)		$0,\!02\pm0,\!00$	$0,\!02\pm0,\!00$	$0,\!04\pm0,\!00$	$0,\!09\pm0,\!00$	
	K(UV-30)		$0,\!02\pm0,\!00$	$0,\!02\pm0,\!00$	$0,\!03\pm0,\!00$	$0,05\pm0,01$	
	K (Cu)	0,03 ± 0,00	0,02 ± 0,00	$0,03\pm0,00$	$0,\!07\pm0,\!00$	$0,24\pm0,00$	
	K (Mn/Zn)	$0,\!01\pm0,\!00$	$0,\!01\pm0,\!00$	$0,\!02\pm0,\!00$	$0,\!05\pm0,\!00$	$0,\!13\pm0,\!01$	

Wartości wyrażono w mg g^{-1} s.m. ± SD; n.s. - nie stwierdzono.

Zawartość barwników fotosyntetycznych w nadziemnych częściach siewek ogórka (pęd zawierający dwa zielone liścienie i liście prawdziwe) przedstawiono w Tabeli 8. Stężenie chlorofilu całkowitego wahało się w granicach 7,10 – 10,69 mg g⁻¹ s.m.. Maksymalny wzrost chlorofilu stwierdzono w 2 DAT. Zmiany te odpowiadają zmianom zawartości chlorofilu a. Natomiast zawartość chlorofilu b w czasie trwania doświadczenia utrzymywała się na stałym poziomie i wahała się w granicach 1,77 – 2,66 mg g⁻¹ s.m.. Największą wartość chlorofilu b zaobserwowano w 2 DAT i wyniosła 2,38 ± 0,28 mg g⁻¹ s.m.. Zmiany zawartości karotenoidów w siewkach ogórka były podobne jak w przypadku chlorofilu "b" i mieściły się w zakresie 0,57 – 1,07 mg g⁻¹ s.m.. Najwyższą zawartość karotenoidów (0,95 ± 0,12 mg g⁻¹ s.m.) odnotowano w 2 DAT, po którym zaobserwowano spadek zawartości barwnika fotosyntetycznego.

Tabela 8. Zawartość barwników fotosyntetycznych (chlorofilu a, chlorofilu b, chlorofilu całkowitego oraz karotenoidów) w nadziemnych częściach (łodygach) siewek ogórka.

Barwnik			DAT		
fotosyntetyczny	0	1	2	3	4
chlorofil a	$6,62 \pm 0,56$	$6{,}68 \pm 0{,}50$	$7,\!36\pm0,\!74$	$6{,}41 \pm 1{,}08$	$5{,}94\pm0{,}70$
chlorofil b	2,23 ± 0,21	$2,\!15\pm0,\!21$	$2,\!38\pm0,\!28$	$2,\!26\pm0,\!33$	$2,\!12\pm0,\!35$
chlorofil całkowity	$8,\!85\pm0,\!71$	$8,83\pm0,66$	$9,74\pm0,95$	8,66 ± 1,31	$8,06\pm0,96$
karotenoidy	$0,\!80\pm0,\!09$	$0,74\pm0,05$	$0,95\pm0,12$	$0,\!69\pm0,\!04$	$0,\!65\pm0,\!08$

Wartości wyrażono w mg g⁻¹ s.m. \pm SD.

2.6 Zmiany aktywności przeciwutleniającej i zawartości antyoksydantów, w tym związków fenolowych i flawonoidów w kiełkach rzodkiewki oraz siewkach ogórka rozwijających się w warunkach optymalnych

Aktywność przeciwutleniającą, wyrażoną jako zdolność zmiatania wolnych rodników (RSA), przedstawiono na Wykresie 7. Natomiast w Tabeli 9. zestawiono zawartości antyoksydantów, związków fenolowych oraz flawonoidów.

Wartość RSA w kiełkach rzodkiewki wzrastała w czasie kiełkowania i mieściła się w granicach od 48,9% \pm 11,5% (K (UV-30), 2 DAT) do 82,5 \pm 0,8% (K (Cu), 2 DAT). Natomiast aktywność przeciwutleniająca w łodygach siewek ogórka była znacznie niższa i wahała się w zakresie 6,0 – 10,4%. Mniejsze różnice wartości RSA w poszczególnych dniach rozwoju siewek ogórka – roślin zawierających zielone liścienie i liście prawdziwe – świadczy o większej równowadze metabolicznej w porównaniu z dopiero kiełkującymi nasionami rzodkiewki, w których zachodzą dynamiczne przemiany metaboliczne.

Zawartość antyoksydantów w siewkach ogórka mieściła się w zakresie od 2,42 do 3,46 mg Troloksu g⁻¹ s.m. i utrzymywała się na stałym poziomie, z niewielkim spadkiem wartości w 2 i 3 DAT. Natomiast zawartość antyoksydantów w kiełkach rzodkiewki różniła się znacząco w zależności od partii nasion i zawarta była w zakresie od 1,64 ± 0,21 (K (światło), 1 DAT) do 10,89 ± 0,20 mg Troloksu g⁻¹ s.m. (K (Cu), 4 DAT).



Wykres 7. Aktywność przeciwutleniająca, wyrażona jako procent wychwytywania wolnych rodników [RSA], w kiełkach rzodkiewki (A, B) oraz siewkach ogórka (C) rozwijających się w warunkach optymalnych.

Zawartość związków fenolowych w kiełkach rzodkiewki wzrastała w czasie trwania hodowli i mieściła się w zakresie od 7,91 \pm 0,05 do 15,27 \pm 1,07 mg GAE g⁻¹ s.m., przy czym najniższą wartość odnotowano dla K (UV-30) w 1 DAT, a najwyższą dla K (światło)

w 4 DAT. Natomiast zawartość związków fenolowych w siewkach ogórka, podobnie jak w przypadku antyoksydantów, utrzymywała się na stałym poziomie i mieściła się w zakresie 5,89 – 7,78 mg GAE g⁻¹ s.m.. Zawartość flawonoidów wahała się od 3,58 ± 0,24 do 5,35 ± 1,16 mg Q g⁻¹ s.m.. Najwyższą wartość odnotowano dla K (UV-3) w 2 DAT, natomiast najniższą w 4 DAT.

Devenue	Układ	DAT					
Parametr	kontrolny	0	1	2	3	4	
	K (światło)		$1{,}64 \pm 0{,}21$	$5{,}51\pm0{,}99$	$\textbf{4,}12 \pm \textbf{0,}34$	7,82 ± 0,65	
	K (UV-3)		9,48 ± 0,51	$10,\!40\pm0,\!51$	$10,12\pm0,75$	$10,\!82\pm0,\!18$	
Antyoksydanty	K(UV-30)		$\textbf{8,07} \pm \textbf{0,42}$	9,15 ± 0,41	9,81 ± 0,41	$10,44 \pm 0,39$	
(mg Troloksu g ⁻¹ s.m.)	K (Cu)	$9,18\pm0,38$	$7,91 \pm 0,96$	$10,66 \pm 0,47$	$10,\!60\pm0,\!05$	10,89 ± 0,20	
	K (Mn/Zn)	$6{,}26\pm0{,}39$	4,82 ± 0,22	5,40 ± 1,00	6,98 ± 0,23	$6,57\pm0,65$	
	K (łodyga)	3,02 ± 0,16	3,28 ± 0,18	2,62 ± 0,20	2,70 ± 0,11	3,03 ± 0,08	
	K (światło)		11,94 ± 0,36	$11,\!74\pm0,\!89$	$13,03 \pm 0,66$	15,27 ± 1,07	
	K (UV-3)		$9,18\pm0,19$	$10,\!28\pm0,\!32$	$10,72 \pm 1,17$	$12,58 \pm 0,23$	
Związki fenolowe	K(UV-30)		$7,\!91\pm0,\!05$	9,35 ± 0,00	$10,31 \pm 0,44$	$11{,}59\pm0{,}70$	
(mg GAE g^{-1} s.m.)	K (Cu)	10,77 ± 0,01	$10,19\pm0,19$	$11{,}59\pm0{,}08$	$12,26 \pm 0,07$	13,35 ± 0,05	
	K (Mn/Zn)	8,51 ± 1,38	8,56 ± 1,25	$10{,}53\pm0{,}42$	$11,65 \pm 1,21$	13,08 ± 0,36	
	K (łodyga)	$6{,}68 \pm 0{,}28$	$6,23 \pm 0,34$	7,41 ± 0,37	$7{,}26\pm0{,}19$	$6,65 \pm 0,14$	
	K (światło)		4,96 ± 0,54	4,57 ± 0,49	$4,\!39\pm0,\!48$	5,39 ± 0,31	
Flawonoidy (mg O g ⁻¹ s.m.)	K (UV-3)		$3,74\pm0,74$	5,35 ± 1,16	$5,04 \pm 0,33$	$3,58\pm0,24$	
(mg Q g 3.m.)	K(UV-30)		4,03 ± 0,35	3,76 ± 0,33	$3,92 \pm 0,60$	$3,\!81\pm0,\!16$	

Tabela 9. Zawartości związków o działaniu przeciwutleniającym w kiełkach rzodkiewki oraz łodygach siewek ogórka rozwijających się w optymalnych warunkach wzrostu.

3 Wpływ warunków oświetlenia na kiełkowanie i kondycję kiełków rzodkiewki

Przez cały cykl życia rośliny są narażone na wiele czynników środowiskowych, takich jak nadmierna intensywność światła, zasadowość lub kwasowość gleby, zbyt wysokie lub niskie temperatury, uszkodzenia oksydacyjne, czy niedobór bądź nadmiar wody. Działanie tych bodźców wywołuje odpowiednie zmiany biochemiczne, fizjologiczne, morfologiczne i molekularne [203,204]. Zachodzące w komórkach zmiany stanowią swoiste sygnały umożliwiające roślinom przystosowanie się do panujących warunków środowiska. Ponieważ kiełkowanie nasion jest jednym z kluczowych etapów w cyklu życiowym roślin, nasiona w procesie ewolucji wykształciły różne mechanizmy służące do wykrywania warunków środowiskowych sprzyjających kiełkowaniu. Jednym z najważniejszych czynników kontrolujących nie tylko kiełkowanie, ale także inne aspekty wzrostu i rozwoju roślin, jest światło [205–207]. Wykazano, że na kiełkowanie, wzrost i produktywność roślin wpływają różne cechy światła: (i) skład widmowy, (ii) intensywność oraz (iii) czas trwania ekspozycji na światło [208–210].

W zależności od gatunku, rośliny wykazują różną wrażliwość na światło w trakcie kiełkowania nasion [211]. Podczas gdy nasiona wielu roślin są obojętne na warunki świetlne, istnieją gatunki, których kiełkowanie rozpoczyna się tylko w warunkach oświetlenia, tylko w ciemności, lub przy odpowiednim udziale światła i ciemności w trakcie doby [212]. Promocja kiełkowania przez światło jest konsekwencją powstawania aktywnej formy fitochromów – Pfr (absorbująca światło dalekiej czerwieni (FR) forma fitochromu), głównie fitochromu A (phyA), fitochromu B (phyB) i fitochromu E (phyE) [213,214]. W promowaniu kiełkowania przez formę Pfr stabilnych fitochromów główne znaczenie mają gibereliny (GA) i kwas abscysynowy (ABA). Dowiedziono, że Pfr wpływa na syntezę i katabolizm GA, zmiany wrażliwości komórek na obecność GA, a także na metabolizm ABA – fitohormonów regulujących proces kiełkowania [215]. Natomiast w przypadku nasion gatunków roślin kiełkujących w ciemności, u których Pfr utworzył się podczas dojrzewania owoców [206], kiełkowanie może zostać zahamowane poprzez krótką ekspozycję na światło, prowadzącą do przekształceń aktywnej formy fitochromów Pfr do form nieaktywnych lub poprzez przedłużoną ekspozycję na FR, w wyniku której dochodzi do regulacji metabolizmu przez phyA [216]. Ponadto wykazano, że intensywność i czas naświetlenia stosowanego podczas kiełkowania, nie tylko reguluje proces kiełkowania, ale także silnie wpływa na mechanizmy biosyntezy flawonoidów i antocyjanów [217].

Reakcje na światło zależą nie tylko od gatunku, ale także od etapu wzrostu – fazy rozwojowej roślin [218,219]. Światło, odgrywa kluczową rolę także w innych niż kiełkowanie procesach rozwojowych, takich jak: (i) fotosynteza, (ii) wzrost komórek i narządów, (iii) biosynteza jednostek budulcowych niezbędnych do wzrostu, (iv) wytwarzanie metabolitów pierwotnych i wtórnych. W ten sposób oddziałuje na cechy morfologiczne, anatomiczne i fizjologiczne organizmów roślinnych [218]. Wpływ światła na wyżej wymienione procesy oraz parametry biochemiczne jest ściśle uwarunkowany długością fali [209]. Chociaż zakres światła widzialnego (400 – 700 nm) jest uważany za najważniejszy w procesie fotosyntezy, rośliny wyższe dynamicznie reagują na zakres widma fal elektromagnetycznych od UV-C (260 nm) do dalekiej czerwieni (720 – 780 nm) [220]. Udowodniono, że istnieją znaczące różnice w zawartości chlorofilu i RuBisCO, cechach fotosyntetycznych i zdolnościach wychwytywania reaktywnych form tlenu u roślin rozwijających się przy różnych barwach światła [221]. Na przykład ekspozycja roślin na światło niebieskie prowadzi do akumulacji karotenoidów i antocyjanów [205,218] oraz zwiększa zawartość barwników fotosyntetycznych w liściach [222], poprawia przewodnictwo szparkowe [223,224], reguluje fototropizm i fotomorfogenezę [198], ograniczając wydłużanie łodygi i indukując ekspansję liści [205,225]. Światło zielone poprawia wzrost i tempo fotosyntezy netto (Pn) [226] oraz sprzyja wydłużaniu hipokotylu na wczesnym etapie rozwoju [227]. Natomiast światło żółte zwiększa zawartość izoflawonów w kiełkach [228]. Ekspozycja roślin na światło czerwone prowadzi do zwiększenia zawartości związków fenolowych, a połączenie energii czerwonej i niebieskiej prowadzi do akumulacji azotu w liściach [224,229] oraz zwiększa tempo fotosyntezy [230]. Natomiast światło UV prowadzi do akumulacji karotenoidów i antocyjanów w liściach [205,218].

Aby określić wpływ widma światła na wzrost roślin oraz wybrane aspekty ich metabolizmu, kiełki rzodkiewki – rośliny modelowej w tego typu badaniach hodowano w siedmiu różnych warunkach oświetlenia, w tym czerwonym, niebieskim, żółtym, fioletowym, białym o zimnej barwie oraz z dodatkiem promieniowania ultrafioletowego o różnej intensywności (UV-3 i UV-30).

3.1 Profile fosforowe kiełków rzodkiewki rozwijających się w różnych warunkach oświetlenia

Ilościową ocenę poszczególnych grup związków fosforu przeprowadzono w oparciu o wartości przesunięcia chemicznego i pola powierzchni odpowiednich pików występujących na widmach ³¹P NMR. Formy P występujące w zneutralizowanych ekstraktach (35% HClO₄; 3 x 30 min; UAE) z kiełków rzodkiewki oraz względny procent zawartości poszczególnych form P (P1 – polifosforany/difosforany [(-5) – (-3,5) ppm]; P2 – fosfodiestry [(-1) – 1,5 ppm]; P3 – fityniany/ortofosforany [1,5 – 3,7 ppm]; P4 – inne monoestry [3,7 – 6 ppm]) w przeliczeniu na całkowitą powierzchnię NMR przedstawiono w Tabeli 10. Dodatkowo, w celu ułatwienia określenia wpływu światła na rozwój kiełków rzodkiewki, w tabeli zawarto także względne ilości (%) poszczególnych form fosforu oznaczonych w ekstraktach kiełków rzodkiewki rozwijających się w optymalnych warunkach wzrostu.

DAT	Wersja oświetlenia	P1 (%)	P2 (%)	РЗ (%)	P4 (%)
	Kontrola	-	0,7	40,5	58,8
	Czerwone	-	1,4	40,8	57,8
	Niebieskie	-	1,1	40,1	58,8
2	Żółte	-	1,0	41,9	57,1
2	Fioletowe	-	1,5	37,1	61,4
	Zimne białe	-	1,1	31,7	67,2
	UV-3	-	3,8	47,6	48,6
	UV-30	-	P1 P2 P3 P3 P4 $(\%)$ $(\%)$ $(\%)$ $(\%)$ $(\%)$ - $0,7$ $40,5$ 58 - $1,4$ $40,8$ 57 - $1,1$ $40,1$ 58 - $1,1$ $40,1$ 58 - $1,1$ $40,1$ 58 - $1,5$ $37,1$ 61 - $1,5$ $37,1$ 61 - $1,3$ $51,5$ 47 - $1,3$ $51,5$ 47 - $0,6$ $37,1$ 62 - $0,6$ $37,1$ 62 - $0,6$ $37,1$ 62 - $0,6$ $37,1$ 62 - $0,7$ $37,2$ 62 - $0,7$ $37,2$ 62 - $0,7$ $37,2$ 62 - $0,7$ $37,2$ 62 - $1,7$ $27,5$ 70 <td< td=""><td>44,4</td></td<>	44,4	
	Kontrola	_	1,3	51,5	47,2
	Czerwone	-	P1P2P3P4(%)(%)(%)(%) $ 0,7$ $40,5$ $58,8$ $ 1,4$ $40,8$ $57,8$ $ 1,1$ $40,1$ $58,8$ $ 1,0$ $41,9$ $57,1$ $ 1,5$ $37,1$ $61,4$ $ 1,1$ $31,7$ $67,2$ $ 3,8$ $47,6$ $48,6$ $ 1,2$ $54,4$ $44,4$ $ 1,3$ $51,5$ $47,2$ $ 0,6$ $37,1$ $62,3$ $ 0,6$ $37,1$ $62,3$ $ 0,6$ $37,1$ $62,3$ $ 0,7$ $37,2$ $62,1$ $ 0,8$ $36,5$ $62,7$ $ 1,2$ $33,4$ $65,4$ $ 2,0$ $49,9$ $48,1$ $ 1,7$ $27,5$ $70,8$ $ 1,8$ $30,0$ $68,2$ $ 0,4$ $34,6$ $65,0$ $ 0,6$ $35,3$ $64,1$ $ 0,5$ $33,6$ $65,9$ $ 0,8$ $27,1$ $72,1$ $ 1,3$ $69,0$ $29,7$		
	Niebieskie	-			
2	Żółte	-	0,7	(%)(%) $40,5$ $58,8$ $40,8$ $57,8$ $40,1$ $58,8$ $41,9$ $57,1$ $37,1$ $61,4$ $31,7$ $67,2$ $47,6$ $48,6$ $54,4$ $44,4$ $51,5$ $47,2$ $41,9$ $57,5$ $37,1$ $62,3$ $37,2$ $62,1$ $36,5$ $62,7$ $33,4$ $65,4$ $49,9$ $48,1$ $40,7$ $54,4$ $27,5$ $70,8$ $30,0$ $68,2$ $34,6$ $65,0$ $35,3$ $64,1$ $33,6$ $65,9$ $27,1$ $72,1$ $69,0$ $29,7$ $62,4$ $35,9$	
3	Fioletowe	-	0,8	36,5	62,7
	Zimne białe	-	1,2	33,4	65,4
	UV-3	-	2,0	49,9	48,1
	UV-30	-	4,9	40,7	54,4
	Kontrola	_	1,7	27,5	70,8
	Czerwone	-	1,8	30,0	68,2
	Niebieskie	-	0,4	34,6	65,0
4	Żółte	-	0,6	35,3	64,1
4	Fioletowe	-	0,5	33,6	65,9
	Zimne białe	_	- 0,7 40,5 58,8 - 1,4 40,8 57,8 - 1,1 40,1 58,8 - 1,0 41,9 57,1 - 1,5 37,1 61,4 - 1,1 31,7 67,2 - 3,8 47,6 48,6 - 1,2 54,4 44,4 - 1,3 51,5 47,2 - 0,6 37,1 62,3 - 0,6 37,1 62,3 - 0,6 37,1 62,3 - 0,6 37,1 62,3 - 0,6 37,1 62,3 - 0,6 37,1 62,3 - 0,7 37,2 62,1 - 1,2 33,4 65,4 - 1,2 33,4 65,4 - 1,7 27,5 70,8 - 1,8 30,0 68,2		
	UV-3	_	1,3	69,0	29,7
	UV-30	_	1,7	62,4	35,9

Tabela 10. Względne zawartości (%) oznaczonych form fosforu obecnych w zneutralizowanych ekstraktach kiełków rzodkiewki rozwijających się w różnych warunkach oświetlenia.

Zakres przesunięć chemicznych (ppm) poszczególnych form fosforu zarejestrowanych na widmach ³¹P NMR zneutralizowanego ekstraktu badanych próbek: P1 – polifosforany/difosforany ((-15) – (-3,5) ppm); P2 – fosfodiestry ((-1) – 1,5 ppm); P3 – fityniany/ortofosforany (1,5 – 3,7 ppm); P4 – inne monoestry (3,7 – 6 ppm); "–" – nie oznaczono. Błąd standardowy nie przekraczał 10% wartości podanych w tabeli.

Uzyskane wyniki odzwierciedlają wpływ barwy światła na względny ilościowy udział form fosforu w kiełkach rzodkiewki. Jak wynika z danych przedstawionych w Tabeli 10., w rzodkiewce w fazie kiełkowania zawartość poszczególnych form fosforu zmienia się w czasie trwania eksperymentu. W 2 DAT fosfor występuje w formie innych monoestrów (P4), których zawartość w zneutralizowanych ekstraktach mieściła się w przedziale od 48,6 dla UV-3 do 67,2 dla światła białego o zimnej barwie. Wyjątek stanowi UV-30, dla którego przeważającą formą P były fityniany oraz ortofosforany (P3). W czasie trwania eksperymentu relacja formy P3 i P4 uległa zmianie. Warto wrócić uwagę na wpływ światła UV-30, dla którego w 3 DAT relacje te się odwróciły, a w 4 DAT udział formy P3 był dwukrotnie większy od udziału formy P4. Podobne zależności odnotowano dla UV-3, jednak dopiero w 4 DAT. Taki wynik może świadczyć o uwolnieniu jonów ortofosforanowych z fosfomonoestrów w wyniku hydrolizy np. pochodnych cukrowych. W przypadku pozostałych wariantów eksperymentu, dla których odnotowano wzrost udziału P4 nad P3, najprawdopodobniej doszło do hydrolizy wiązań estrowych w cząsteczkach kwasu fitynowego, a uwolnione jony Pi zostały od razu włączone w procesy syntezy fosfomonoestrów. Na Rysunku 29. zestawiono przykładowe widma ³¹P NMR uzyskane dla ekstraktów z kiełków rzodkiewki rozwijających się 4 dni w warunkach kontrolnych oraz w świetle białym o zimnej temperaturze barwowej. Największe różnice w kształcie sygnałów można zauważyć w przedziale P4, odpowiadającym fosfomonoestrom.



Rysunek 29. Porównanie widm ³¹P NMR ekstraktów z kiełków rzodkiewki (4 DAT) rozwijających się w warunkach kontrolnych (A) oraz świetle białym o zimnej temperaturze barwowej (B). Pomiary

przeprowadzono dla próbek o odczynie obojętnym (pH=7), kolorowymi polami zakreślono sygnały na widmie należące do poszczególnych form P – P2 – fosfodiestry [-1 – 1,5 ppm]; P3 – fityniany/ortofosforany [1,5 – 3,7 ppm]; P4 – inne monoestry [3,7 – 6 ppm].

3.2 Zmiany zawartości Pi, aktywności enzymatycznej fitaz oraz zawartości białka w kiełkach rzodkiewki

W celu określenia wpływu wybranych wariantów oświetleniowych na przemiany związków fosforu analizie poddano również zmiany zawartości fosforu nieorganicznego, białka oraz aktywności enzymatycznej fitaz w próbkach z roślin rzodkiewki (Wykres 8.). Stwierdzono, że zawartość Pi w kiełkach rzodkiewki wzrastała w czasie kiełkowania. Średnia wartość w poszczególnych dniach rozwoju wynosiła kolejno: 2,45; 3,48 i 4,64 mg g⁻¹ s.m. (2 DAT, 3 DAT, 4 DAT). Przy czym najmniejszą zawartość (1,35 ± 0,17 mg g⁻¹ s.m.) odnotowano w 2 DAT dla światła fioletowego, natomiast największą (6,75 ± 0,24 mg g⁻¹ s.m.) dla światła niebieskiego w ostatnim dniu eksperymentu. Różnice istotne statystycznie ($p \le 0,05$) w zawartości Pi w odniesieniu do kontroli odnotowano w 2, 3 i 4 DAT dla wszystkich badanych wariantów oświetlenia. Wyjątek stanowiło światło czerwone, UV-3 i UV-30 w 2 DAT. Zawartość Pi była istotnie wyższa w 3 DAT (200% kontroli) i 4 DAT (172% kontroli) odpowiednio dla UV-3 i UV-30, co potwierdza wcześniej sformułowaną hipotezę na temat zachodzących przemian poszczególnych form fosforu. Natomiast istotnie niższą zawartość Pi (50%; 60% i 53% kontroli) stwierdzono odpowiednio dla światła fioletowego i żółtego w 2 DAT oraz żółtego w 3 DAT.



Wykres 8. Średni współczynnik zawartość Pi (A), aktywności enzymatycznej fitaz (B) oraz zawartości białka (C) w kiełkach rzodkiewki rozwijającej się w testowanych warunkach świetlnych. Wartości dla odpowiednich hodowli kontrolnych przyjęto w każdym przypadku jako 100%, "*" oznaczono różnice istotne statystycznie ($p \le 0,05$)w odniesieniu do kontroli.

Zmiany zawartości Pi w czasie kiełkowania nasion wynikają z różnic w przemianach metabolicznych. Jedną z istotniejszych reakcji zachodzących w rozwijających się kiełkach jest hydroliza wiązań estrowych w cząsteczkach fitynianów, w wyniku której zmagazynowany w zarodku fosfor zostaje uwolniony. Reakcje te są katalizowane przez fitazy. Aktywność enzymatyczna fitaz, podobnie jak zawartość Pi, wzrastała w czasie trwania ekspervmentu. Średnia aktywność oznaczona w poszczególnych dniach wynosiła: 0,67; 1,15 i 1,78 U g⁻¹ s.m. Najwyższą aktywność badanych enzymów odnotowano dla światła czerwonego w 4 DAT (3,07 \pm 0,43 U g⁻¹ s.m.), a najniższą dla światła UV-3 w 2 DAT (0,30 \pm 0,04 U g⁻¹ s.m.). Szczególnie interesująca wydaje się być dynamika wzrostu aktywności enzymatycznej, która była mniejsza w przypadku UV-3 i UV-30 w porównaniu do pozostałych testowanych warunków świetlnych. Analizując dane przedstawione na Wykresie 8. B, można określić wpływ poszczególnych barw światła na aktywność enzymatyczną fitaz. Najmniejsze oddziaływanie posiadało światło żółte oraz UV-3. Zastosowanie UV-30 prowadziło do istotnego zwiększenia aktywności fitaz w 3 DAT (140% kontroli) i gwałtownego istotnego zmniejszenia w 4 DAT (75% kontroli). Różnice istotne statystycznie odnotowano również dla światła czerwonego (2 i 3 DAT), niebieskiego (2 DAT),

fioletowego (2 i 4 DAT) oraz białego o zimnej temperaturze barwowej (2 i 4 DAT). Światło fioletowe i zimne białe powodowało obniżenie aktywności enzymatycznej fitaz od 2 do 4 DAT. Również, światło czerwone i niebieskie w pierwszych dniach rozwoju rzodkiewki prowadziło do zmniejszenia aktywności enzymatycznej fitaz, odpowiednio o 34% i 42% w 2 DAT w porównaniu do warunków kontrolnych. Do tej pory nie zostały przeprowadzone badania określające wpływ barwy światła na aktywność enzymatyczną fitaz w kiełkach roślinnych. Natomiast dane literaturowe wskazują, że zawartość kwasu fitynowego w ciecierzycy pospolitej była istotnie niższa w 2 i 3 dobie kiełkowania w świetle czerwonym lub niebieskim oraz w 3 dobie w przypadku zastosowania światła żółtego, co sugeruje zwiększoną aktywność enzymatyczną fitaz [231]. Niestety, uzyskanych wyników nie można bezpośrednio porównać z wcześniej opublikowanymi, ponieważ aktywność enzymatyczna fitaz jest zależna od gatunku, a nawet odmiany rośliny oraz procedur analitycznych stosowanych w oznaczaniu aktywności hydrolitycznej fitaz [232].

Stężenie białek w komórkach roślinnych zależy od równowagi pomiędzy proteoliza białek gromadzonych w komórkach magazynujących, a biosyntezą polipeptydów w toku translacji w procesie kiełkowania [233]. Zawartość białek w poszczególnych próbkach w czasie kiełkowania utrzymywała się na względnie stałym poziomie. Jej średnia wartość mieściła się w zakresie od 9,10 do 9,53 mg g⁻¹ s.m.. Najniższą zawartość białek oznaczono dla światła czerwonego (5,34 \pm 0,10 mg g⁻¹ s.m.) i fioletowego (5,04 \pm 0,06 mg g⁻¹ s.m.) w 3 DAT, natomiast najwyższa (14,86 \pm 0,12 mg g⁻¹ s.m.) dla UV-3 w 4 DAT. Statystycznie istotne zmiany w zawartości białek w odniesieniu do kontroli odnotowano dla światła czerwonego, żółtego i białego o zimnej barwie w 2 DAT oraz światła żółtego i UV-30 w 4 DAT. Co ciekawe, w 3 DAT zawartość białek dla wszystkich warunków świetlnych (z wyjątkiem UV) była 1,5-krotnie niższa niż dla warunków kontrolnych. Różnica ta wynika ze wzrostu zawartości białka dla warunków kontrolnych z 5,52 \pm 0,11 mg g⁻¹ s.m. w 2 DAT do 8,87 \pm 1,09 mg g⁻¹ s.m. w 3 DAT. Taka zmiana może być spowodowana uwolnieniem większej ilości białek z materiału zapasowego (np. albuminy lub fitynianów) lub białek związanych z błoną komórkową, które następnie uległy proteolizie (5,62 mg g⁻¹ s.m. w 4 DAT).

3.3 Zmiany w zawartości nukleotydów adeninowych i status metaboliczny kiełków rzodkiewki rozwijających się w różnych warunkach oświetlenia

Wyniki eksperymentu dowiodły, że barwa światła ma wpływ także na status energetyczny komórek roślinnych. Nukleotydy adeninowe – AMP, ADP i ATP – ulegają dynamicznym

przemianom na skutek zachodzących procesów metabolicznych, a zmiany ich zawartości oraz ich wzajemny stosunek ilościowy mogą dostarczyć informacji o energetyce procesów metabolicznych zachodzących w roślinach.

Spośród wszystkich oznaczanych form nukleotydów adeninowych w najwyższym stężeniu oznaczono ADP (Wykres 9.), którego średnia zawartość w kiełkach rzodkiewki w kolejnych dniach wzrostu wynosiła odpowiednio: 466,48; 552,06 i 748,91 µg g⁻¹ s.m. (2 DAT; 3 DAT i 4 DAT). Najniższą zawartość (101,89 \pm 15,45 µg g⁻¹ s.m.) odnotowano dla światła białego o zimnej barwie w 3 DAT, natomiast najwyższa (1052,16 \pm 138,47 µg g⁻¹ s.m.) w 4 DAT. Analizując przedstawione wyniki można zauważyć pewne podobieństwa w zmianach zawartości ADP w czasie trwania hodowli. W kiełkach traktowanych odpowiednio światłem czerwonym, niebieskim, żółtym lub fioletowym odnotowano regularny wzrost zawartość ADP w kolejnych dniach rozwoju. Przy naświetlaniu światłem UV wartości utrzymywały się na względnie stałym poziomie. Natomiast w przypadku kiełków rozwijających się w świetle biały o zimnej barwie, zawartość ADP zmalała z 513,00 \pm 69,83 µg g⁻¹ s.m. do 101,89 \pm 15,45 µg g⁻¹ s.m. i następnie wzrosła do 1052,16 \pm 138,47 µg g⁻¹ s.m.. Odmienny trend zmian zawartości zaobserwowano w przypadku monofosforanu (AMP) i trifosforanu (ATP) adenozyny. Najniższą zawartość AMP oznaczono dla UV-3 w 3 DAT (81,02 \pm 13,21 µg g⁻¹ s.m.), a najwyższą dla światła niebieskiego w 2 DAT $(254 \pm 8,24 \ \mu g \ g^{-1} \ s.m.)$. U roślin rozwijających się w świetle czerwonym, żółtym, zimnym białym lub UV-3 odnotowano jednodniowe zmniejszenie zawartości AMP w 3 DAT. W przypadku zastosowania świtała niebieskiego ilość AMP zmniejszyła się w czasie trwania hodowli, podobnie jak ATP, którego zawartość zmalała od 195,33 \pm 6,57 do 89,09 \pm 12,88 µg g^{-1} s.m. i UV-30 (z 75,64 ± 14,10 do 39,51 ± 1,35 µg g^{-1} s.m.). W kiełkach rzodkiewki rozwijających się w świetle czerwonym i UV-3 zawartość trifosforanu adenozyny utrzymywała się na względnie stałym poziomie, natomiast w przypadku światła żółtego i białego o zimnej barwie zawartości ATP obniżyła się w 3 DAT. Skorelowane zmniejszenie zawartości AMP i ATP ze zwiększeniem zawartości ADP w przypadku światła niebieskiego (2 – 4 DAT) oraz fioletowego (3 – 4 DAT) może być związane ze wzrostem aktywności enzymatycznej kinazy adenylanowej (E.C. 2.7.4.3.), która katalizuje odwracalne przeniesienie grupy y-fosforanowej z ATP do AMP, uwalniając 2 cząsteczki ADP [234]. Pomimo, że niektóre kinazy adenylowe mogą katalizować transfosforylację innych cząsteczek, preferowanym substratem wszystkich izoform tych enzymów jest AMP, a głównym donorem fosforanu jest ATP. Dodatkowo roślinne kinazy adenylowe są związane wyłącznie z chloroplastami i mitochondriami, a ponad 90% całkowitego poziomu aktywności

enzymatycznej wykazują te znajdujące się w chloroplastach mezofilu [234,235]. Ponadto, zwiększone zużycie ATP przez komórki roślin rozwijających się w świetle niebieskim i fioletowym, może być związane z ruchem chloroplastów. U roślin okrytonasiennych w ruchu chloroplastów wywołanym światłem pośredniczy fototropina 1 i fototropina 2 [236–238]. Fotoreceptory te monitorują intensywność światła niebieskiego, a przy zbyt wysokim współczynniku fluorescencji, chloroplasty zmieniają swoje położenie wzdłuż powierzchni komórki przylegającej do ściany komórkowej. Takie zmiany lokalizacji pozwalają na uniknięcie uszkodzeń chloroplastów indukowanych zbyt intensywnym naświetlaniem [237].



Wykres 9. Zmiany zawartości nukleotydów adeninowych: AMP (A), ADP (B), ATP (C) w kiełkach rzodkiewki poddanych działaniu różnych warunków oświetleniowych, w kolejnych (2 – 4) dniach wzrostu.

Analizując średnie współczynniki zawartości nukleotydów adeninowych można stwierdzić, że barwa światła ma największy wpływ na zawartość 5'-monofosforanu adenozyny (Wykres 10. A). Szczególnie ciekawe wydają się być wyniki uzyskane dla światła niebieskiego, żółtego oraz białego o zimnej barwie, które wywarły istotny wpływ na zawartość AMP w każdym dniu wzrostu rzodkiewki (wyjątek stanowi 2 DAT dla światła żółtego). Światło niebieskie powodowało zwiększenie zawartości AMP średnio o 70% w odniesieniu do kontroli. W przypadku światła żółtego wzrost ten był prawie 1,5-krotnie

większy w 2 i 3 DAT oraz ponad 2-kronie większy w 4 DAT. Natomiast w przypadku światła białego o zimnej barwie w 2 DAT zawartość AMP była 1,5-krotnie wyższa w odniesieniu do warunków kontrolnych, następnie w 3 DAT drastycznie spadła, a w 4 DAT była wyższa ponad 2-krotnie w porównaniu do kontroli. Podobny efekt odnotowano dla światła fioletowego, które w 3 DAT spowodowało istotny wzrost zawartości AMP odpowiednio o 100% i o 50% w 4 DAT w odniesieniu do kontroli. Z kolei analizując wpływ promieniowania UV na zawartość AMP wykazano, że zmiany te są zależne od natężenia światła w zakresie 395 – 400 nm. Przeprowadzone badania wskazują, że w przypadku UV-3 zawartość AMP była niższa w 2 i 3 DAT w porównaniu do kontroli, natomiast w przypadku UV-30 zawartość ta była wyższa. Taki wynik wskazuje na występowanie zwiększonego zapotrzebowania na energię u roślin rozwijających się w UV-30 w porównaniu do roślin rozwijających się w UV-3. Ponadto, zwiększenie zawartości AMP z 2 na 3 DAT u roślin UV-30 przy jednoczesnym zmniejszeniu zawartości ATP, traktowanvch świadczv hydrolizie wiązań bezwodnikowych pomiędzy resztami fosforowymi o zachodzącej w cząsteczkach ATP.



Wykres 10. Średni współczynnik zawartości AMP (A), ADP (B), ATP (C) oraz wartości współczynnika AEC (D) w kiełkach rzodkiewki rozwijającej się w testowanych warunkach świetlnych, w relacji do kontroli. Wartości dla hodowli kontrolnych przyjęto w każdym przypadku jako 100%, "*" oznaczono różnice istotne statystycznie ($p \le 0,05$) w odniesieniu do odpowiednich kontroli.

Dużo mniejszy wpływ światła na zawartość nukleotydów adeninowych zaobserwowano dla ADP i ATP (Wykres 10. B i C). Dla każdego z warunków oświetleniowych zawartość ADP w 3 DAT była niższa w porównaniu do kontroli, wyjątek stanowiło światło niebieskie i UV-30. Warto zwrócić uwagę także na fakt, że stosunek zawartości ADP dla UV-30 do zawartości ADP dla kontroli w kolejnych dniach rozwoju kiełków rzodkiewki jest taki sam jak stosunek zawartości AMP w tych układach. Podobnie jak w przypadku zmian zawartości AMP, światło niebieskie, w porównaniu do kontroli, istotnie zwiększyło zawartość ATP w 2 i 3 DAT. Natomiast działanie światła białego o zimnej barwie doprowadziło do znaczącego zmniejszenia zawartości ATP w odniesieniu do kontroli odnotowano także dla światła czerwonego, fioletowego i UV-3 w 2 DAT oraz dla UV-30 w 4 DAT.

Dokładniejsze określenie wpływu barwy światła na metabolizm kiełków rzodkiewki było możliwe na podstawie wartości adenylowego ładunku energetycznego (AEC). Wartości parametru AEC wahały się w zakresie od 0,40 (dla światła białego o zimnej barwie w 2 DAT) do 0,50 (dla UV-3 w 4 DAT). Istotny statystycznie wpływ na status energetyczny kiełków rzodkiewki określono dla światła żółtego oraz białego o zimnej barwie w każdym dniu prowadzenia hodowli. Ponadto dla światła fioletowego w 3 DAT, UV-3 i UV-30 w 2 i 3 DAT, a także dla światła czerwonego i niebieskiego w 4 DAT. Jednocześnie wartość parametru AEC w poszczególnych dniach utrzymywała się na względnie stałym poziomie (SD≤0,06) dla wszystkich wariantów eksperymentu. Na tej podstawie stwierdzono, że w roślinach poddanych tego rodzaju stresowi utrzymuje się stan homeostazy, z niewielką tendencją do przewagi procesów katabolicznych. Najbardziej prawdopodobne wyjaśnienie tego zjawiska związane jest ze zwiększonym zapotrzebowaniem na produkty rozkładu złożonych związków, stanowiących substancje zapasowe w nasionach. Ponadto u roślin rozwijających się w warunkach stresowych dochodzi do zaburzeń procesów metabolicznych. Aby je zniwelować aktywowane są inne ścieżki biochemiczne, w których wytwarzana energia, pierwotnie zmagazynowana w ATP, jest zużywana na bieżąco. W takich przemianach, w wyniku hydrolizy wysokoenergetycznych wiązań w ATP, powstają cząsteczki AMP, co wyjaśnia zwiększoną zawartość tego nukleotydu adeninowego w komórkach roślin wzrastających w nieoptymalnych warunkach oświetleniowych.

3.4 Profil wzrostu

Ocena zdolności kiełkowania jest jednym z podstawowych testów przeprowadzanych nie tylko w celu określenia jakości nasion, ale także wpływu warunków zewnętrznych na proces kiełkowania. W przypadku rzodkiewki (*Raphanus sativus* L.) badanie nasion przeprowadza się na bibule filtracyjnej (zgodnie z zaleceniami ISTA, 2018) [211], co oznacza, że nasiona są bezpośrednio wystawione na działanie światła w inkubatorze, w którym są testowane. Profil wzrostu kiełków rzodkiewki przedstawiono na Wykresie 11. i uwzględniono w nim ostatnią fazę kiełkowania (1 DAT), kiedy zauważono pojawienie się korzonka zarodkowego, aż do zakończenia hodowli (4 DAT).

Analizując uzyskane wyniki można stwierdzić, że więcej wykiełkowanych nasion odnotowano jedynie dla UV-30 w 2 DAT oraz UV-3 w 3 DAT, a różnice wynosiły odpowiednio 22% i 14% względem kontroli. Jednak różnice te były istotne statystycznie jedynie dla UV-3. Uzyskane wyniki są zbieżne z wcześniejszymi pracami, w których dwudziestogodzinna ekspozycja kiełkujących nasion fasoli na światło UV-C zwiększała procent wykiełkowanych nasion o 24% [239]. Niemniej jednak, hodowla rzodkiewki w UV-30 spowodowała istotne zmniejszenie liczby wykiełkowanych nasion w 3 DAT. Pomimo udowodnionego pozytywnego wpływu światła czerwonego oraz negatywnego wpływu świtała niebieskiego na kiełkowanie nasion rzepaku [198], uzyskane wyniki wskazują, że różnice dla tych wariantów oświetlenia nie przekraczają 4%. Niestety, w danych literaturowych występują pewne rozbieżności dotyczące wpływu światła na kiełkowanie rzodkiewki. Podczas gdy niektóre źródła wskazują brak fotoinhibicyjnego wpływu światła na kiełkowanie rzodkiewki [212], inni autorzy donoszą o znaczącym wpływie światła na kiełkowanie różnych odmian rzodkiewki [211,240]. Na podstawie przedstawionych wyników można stwierdzić, że światło w pewnym zakresie wpływa na kiełkowanie nasion rzodkiewki. Może się to wiązać z syntezą i przemianami giberelin – hormonów promujących kiełkowanie, na skutek aktywacji fitochromów (Pfr) [241–244].



Wykres 11. Dynamika kiełkowania nasion rzodkiewki rozwijających się w różnych warunkach oświetlenia wyrażona w procentach jako stosunek całkowitej liczby badanych nasion. "*" oznaczono różnice istotne statystycznie ($p \le 0,05$) w odniesieniu do kontroli.

Warto wyjaśnić, że niższy odsetek wykiełkowanych nasion w świetle z dodatkiem UV nie jest konsekwencją wpływu badanego czynnika oświetlenia, lecz wynika jedynie z różnic w jakości partii nasion. Świadczy o tym także niższa energia kiełkowania, która była na poziomie 95 – 96% dla świata czerwonego, niebieskiego, żółtego, fioletowego i białego o zimnej barwie, 70% dla UV-3 oraz 56% dla UV-30. Pomimo niższej wartości, energia kiełkowania dla tych warunków oświetlenia była zbieżna z wynikami uzyskanymi dla warunków kontrolnych.

3.5 Zawartość barwników fotosyntetycznych

Proces kiełkowania nasion oraz początkowego wzrostu kiełków jest krótkotrwałym etapem rozwoju roślin przebiegającym bez zachodzenia fotosyntezy, dlatego też stanowi krytyczną fazę wzrostu roślin, wrażliwych wtedy wyjątkowo na działanie niekorzystnych czynników zewnętrznych [245]. Śledzenie aktywacji procesu fotosyntezy na tak wczesnym etapie rozwoju roślin, jest możliwe między innymi poprzez określenie zawartości barwników fotosyntetycznych – związków odpowiedzialnych za pochłanianie energii świetlnej. Na Wykresie 12. przedstawiono zmiany średniego współczynnika zawartość karotenoidów i chlorofilu całkowitego w czasie trwania eksperymentu.



Wykres 12. Średni współczynnik zawartości karotenoidów (A) oraz chlorofilu całkowitego (B) w kiełkach rzodkiewki rozwijającej się w testowanych warunkach świetlnych. Wartości dla odpowiednich hodowli kontrolnych przyjęto w każdym przypadku jako 100%, "*" oznaczono różnice istotne statystycznie ($p \le 0,05$) w odniesieniu do kontroli.

Średnia zawartość karotenoidów naturalnie występujących w nasionach rzodkiewki [246], mieściła się w zakresie od 0,02 do 0,16 mg g¹ s.m. i wzrastała w czasie. Największą zawartość (0,26 mg g⁻¹ s.m.) oznaczono w 4 DAT dla światła czerwonego i niebieskiego, natomiast najmniejszą (0,01 mg g⁻¹ s.m.) dla światła fioletowego w 2 DAT. Ponadto w początkowych dniach hodowli (2 DAT) dla światła niebieskiego zawartość karotenoidów była poniżej poziomu oznaczalności. Dane źródłowe wskazują, że światło

niebieskie, w przeciwieństwie do czerwonego, ma istotny wpływ na ekspresję genów związanych z metabolizmem karotenoidów i ich zawartość w cytrusach [247] oraz reguluje mechanizm biosyntezy i prowadzi do akumulacji karotenoidów w kiełkach kukurydzy [248]. Przeprowadzone badania jednak nie wykazują takiej zależności – zawartość karotenoidów w kiełkach rzodkiewki traktowanych światłem czerwonym jest wyższa niż w przypadku światła niebieskiego. Różnice te mogą wynikać z faktu, że zwiększona zawartość karotenoidów w kiełkach kukurydzy poddanych działaniu światła niebieskiego była porównana do kiełków rozwijających się w ciemności, a nie w światle białym, a tymczasem udowodniono zwiększoną akumulację karotenoidów w gryce [249] pod wpływem światła białego. Wykazano również, że zastosowanie różnych długości fal światła, wpływa nie tylko na całkowitą zawartość karotenoidów, ale także ich skład jakościowy – naświetlanie światłem czerwonym powodowało istotnie wyższą zawartość β-karotenu w sadzonkach grochu [250] i luteiny w jarmużu [251], natomiast zawartość β-karotenu w jarmużu była najwyższa przy zastosowaniu światła fioletowego [251]. Jednak, w doświadczeniach przeprowadzonych w ramach niniejszej pracy zawartość karotenoidów była znacząco niższa w próbkach wzrastających w warunkach stresowych w porównaniu do warunków kontrolnych. Wyjątek stanowi światło UV-30 w 2 i 4 DAT oraz światło czerwone w 2 i 3 DAT, gdzie zawartość ta była wyższa lub równa. Największy negatywny wpływ światła na zawartość karotenoidów oznaczono dla światła fioletowego i białego o zimnej barwie, dla których różnice były niższe w odniesieniu do warunków kontrolnych odpowiednio o 80% w 3 DAT dla światła fioletowego oraz o 60% w 2 i 4 DAT dla światła białego o zimnej barwie.

Zawartość chlorofilu całkowitego była oznaczalna dopiero od 3 DAT (z wyjątkiem światła fioletowego), a średnia zawartość mieściła się w zakresie 0,10 – 0,64 mg g⁻¹ s.m.. Pomimo że światło czerwone, nie wpłynęło na szybkość kiełkowania, przyczyniło się do zwiększenia zawartości chlorofilu w 3 DAT o 13%. Natomiast negatywny wpływ oświetlania na zawartość chlorofilu odnotowano dla światła niebieskiego i UV-3 w 3 DAT (średnio o 75%) oraz światła żółtego i białego o zimnej barwie w 3 i 4 DAT (odpowiednio o ok. 55% i ok. 40%). Na podstawie omawianych wyników można jednoznacznie stwierdzić, że warunki oświetleniowe na początkowym etapie rozwoju rzodkiewki znacząco wpływają na zawartość barwników fotosyntetycznych i mogą prowadzić do zaburzeń procesu fotosyntezy w rozwijających się kiełkach rzodkiewki.

92

3.6 Zmiany aktywności przeciwutleniającej i zawartości antyoksydantów, w tym związków fenolowych i flawonoidów, w kiełkach rozwijających się w różnych warunkach oświetlenia

Stres środowiskowy prowadzi do uruchomienia systemów obronnych roślin, między innymi indukowana jest synteza metabolitów wtórnych wykazujących aktywność przeciwutleniającą [252,253]. Na Wykresie 13. przedstawiono zmiany średniego współczynnika aktywności przeciwutleniającej (A) oraz zawartości związków wykazujących taką właśnie cechę (B-D).

Średnia aktywność przeciwutleniająca (RSA) kiełków rzodkiewki wahała się od 62 do 73%. Najmniejszą wartość RSA odnotowano dla kiełków rozwijających się w świetle białym o zimnej barwie (52,7%) i fioletowym (54,7%) w 3 DAT, natomiast największą w świetle niebieskim (79,7% i białym o zimnej barwie (79,3%) w 4 DAT. Wyniki badań własnych wskazują, że kiełki rzodkiewki w początkowym etapie wzrostu (2 DAT) w świetle żółtym charakteryzują się większymi zdolnościami antyoksydacyjnymi (o 12%) niż w układzie kontrolnym. Natomiast w przypadku zastosowania światła białego o zimnej barwie różnice te były widoczne jedynie w 2 DAT i były o 27% wyższe w porównaniu do kontroli. Istotny wpływ oświetlenia na aktywność przeciwutleniającą odnotowano dla świtała UV-30, które w 2 DAT spowodowało wzrost wartości RSA o 23%, a w 3 i 4 DAT spadek odpowiednio o 5% i 25% względem układu kontrolnego. Zastosowanie światła fioletowego, białego o zimnej barwie i UV-3 przyczyniło się do zmniejszenia aktywność przeciwutleniającej w 3 DAT średnio o 26% w porównaniu do kontroli.

Aktywność przeciwutleniająca odzwierciedla się w synergicznym działaniu wielu przeciwutleniaczy, w tym związków fenolowych, kwasu askorbinowego oraz charakterystycznych dla roślin krzyżowych – glukozynolanów [254]. Warunki oświetlenia w pewnym zakresie wpłynęły także na całkowitą zawartość antyoksydantów (Wykres 13. B). Analizując przedstawione wyniki można zauważyć, że światło białe o zimnej barwie spowodowało istotne zwiększenie zawartości antyoksydantów w 2 i 3 DAT (odpowiednio o 30% i 85%). Natomiast w 4 DAT odnotowano istotne zmniejszenie zawartości antyoksydantów dla światła czerwonego (o 48%), niebieskiego (o 22%), białego o zimnej barwie (o 18%) i UV-30 (o 18%). Ponadto całkowita zawartość antyoksydantów była istotnie niższa w każdym dniu rozwoju w przypadku zastosowania światła UV-3.

93



Wykres 13. Średni współczynnik aktywności przeciwutleniającej (A) oraz zawartości antyoksydantów (B), związków fenolowych (C) i flawonoidów (D) w kiełkach rzodkiewki rozwijającej się w testowanych warunkach świetlnych. Wartości dla odpowiednich hodowli kontrolnych przyjęto w każdym przypadku jako 100%, "*" oznaczono różnice istotne statystycznie ($p \le 0,05$) w odniesieniu do kontroli.

Podczas kiełkowania, w nasionach naturalnie powstają reaktywne formy tlenu (ROS), które jednocześnie stanowią cząsteczki sygnalizacyjne informujące o zakończeniu fazy spoczynku i rozpoczęciu procesu kiełkowaniu nasion [255]. Ważne jest jednak utrzymanie zawartości ROS w tkankach poniżej stężeń toksycznych dla roślin, które ewolucyjnie wykształciły różne mechanizmy detoksykacji, w tym wytwarzanie związków o działaniu przeciwutleniającym [239]. Istotnie niższe zawartości antyoksydantów w porównaniu z warunkami kontrolnymi, sugerują wykorzystania ich w procesach detoksykacji roślin, o ile całkowita zawartość antyoksydantów jest skorelowana z aktywnością przeciwutleniającą kiełków rzodkiewki. Uzyskane wyniki nie wykazują takiej zależności. Odnotowane zróżnicowanie wpływu warunków oświetlenia na aktywność przeciwutleniającą i zawartość antyoksydantów wynika przede wszystkim z różnic w zastosowanych metodach analitycznych. Aktywność antyoksydacyjną oznaczono metodą z rodnikiem DPPH, który reaguje wyłącznie z antyoksydantami lipofilowymi, podczas gdy rodnik ABTS (zastosowany w oznaczaniu całkowitej zawartości antyoksydantów) reaguje zarówno z antyoksydantami lipofilowymi i hydrofilowymi [256]. Należy również zwrócić uwagę na fakt, iż metoda

z rodnikiem DPPH nie jest w pełni wystandaryzowana – warianty metod różnią się warunkami takimi jak czas inkubacji próbki i/lub stężenie roztworów, co często uniemożliwia porównanie z danymi literaturowymi [257].

Średnia zawartość związków fenolowych wzrastała w poszczególnych dniach rozwoju rzodkiewki i mieściła się w zakresie 11,0 – 13,5 mg GAE g⁻¹ s.m., przy czym najniższą zawartość (8,69 mg GAE g⁻¹ s.m.) odnotowano dla UV-30 w 2 DAT, a najwyższą (16,1 mg GAE g⁻¹ s.m.) dla światła czerwonego i białego o zimnej barwie w 4 DAT. Dane źródłowe wskazują, że w zależności od odmiany, zawartość związków fenolowych w nasionach rzodkiewki jest na poziomie 6,1 – 14,5 mg GAE g⁻¹ s.m. [246]. Uzyskane wartości są zbieżne z opublikowanymi wcześniej wynikami. Określając wpływ oświetlenia na rozwój rzodkiewki można stwierdzić, że zastosowanie światła czerwonego spowodowało istotny wzrost zawartości zwiazków fenolowych o 22% (2 DAT) oraz 8% (3 DAT). Porównywalny efekt uzyskano dla światła żółtego w 3 DAT (wzrost zawartości o 8%). Natomiast istotne statystycznie obniżenie zawartości związków fenolowych odnotowano dla światła fioletowego w 4 DAT (o 18%), UV-3 w 2 DAT (o 3%) i 4 DAT (o 11%) oraz UV-30 w 4 DAT (o 27%). Dane literaturowe wskazują, że wpływ barwy światła na zawartość związków fenolowych zależy od gatunków badanych roślin [254,258]. Zaobserwowany wpływ światła czerwonego na zawartość związków fenolowych w kiełkach rzodkiewki jest zgodny z wcześniej uzyskanymi wynikami, jednak w przypadku światła niebieskiego nie uzyskano takiego samego efektu [259].

Spośród wszystkich związków fenolowych obecnych w tkankach roślin, największą grupę stanowią flawonoidy. Ich rodzaj i lokalizacja zależy od gatunku rośliny i etapu rozwoju, a zmiany zawartości mogą być modulowane przez sygnały środowiskowe [260]. Związki te są powszechnymi składnikami nasion i ziaren większości roślin, pełniąc określone role w fazie spoczynku i w kiełkowaniu nasion. Udowodniono, że flawonoidy odpowiadają za (i) utrzymanie fazy spoczynku, między innymi poprzez zakłócanie pobierania wody, zakłócenie wymiany gazowej (tlenu i dwutlenku węgla), zapobieganie wycieku inhibitora z zarodka, (ii) filtrację światła, chroniąc tym samym przed szkodliwym wpływem promieniowania UV oraz (iii) trwałość nasion podczas przechowywania [261]. Dodatkowo, odgrywają one zróżnicowane role w interakcjach pomiędzy roślinami a drobnoustrojami, między innymi chroniąc nasiona i siewki przed patogennymi mikroorganizmami [262,263], a także stymulując kiełkowanie spor arbuskularnych grzybów mikoryzowych, istotnych na początkowym etapie wzrostu symbiotycznego u roślin motylkowych [264,265].

W roślinach dwuliściennych, do których należy rzodkiewka, flawonoidy znajduja sie w łupinie nasion, podczas gdy w roślinach jednoliściennych związki te znajdują się w warstwie aleuronowej oraz owocni [266]. Średnia zawartość flawonoidów w kiełkach rzodkiewki mieściła się w zakresie 4,1 – 4,8 mg Q g⁻¹ s.m.. Najmniejszą zawartość (2,7 mg Q g⁻¹ s.m.) oznaczono w 3 DAT dla UV-3, natomiast największą (5,5 mg Q g⁻¹ s.m.) w 4 DAT dla światła czerwonego. Zwiększoną zawartość flawonoidów u roślin rzodkiewki oznaczono dla światła czerwonego w 2 DAT oraz żółtego w 3 DAT, przy czym jedynie dla światła żółtego wzrost ten był istotny statystycznie. Natomiast istotnie niższa zawartość flawonoidów odnotowano dla światła fioletowego w 4 DAT (o 30%), białego o zimnej barwie w 2 DAT (o 30%) oraz UV-3 w 2 DAT (o 34%), 3 DAT (o 46%) i 4 DAT (o 20%). Dane literaturowe wskazują, że w siewkach i sadzonkach wielu roślin dochodzi do przejściowej akumulacji flawonoidów [262]. Udowodniono także, że promieniowanie ultrafioletowe oraz światło niebieskie przyczyniało się do zwiększenia zawartości flawonoidów w kiełkach gryki tatarki [267] oraz rzodkiewnika pospolitego [262]. Brak zależności pomiędzy uzyskanymi wynikami a danymi literaturowymi wynika z różnic w warunkach kontrolnych w przytoczonych przykładach, kontrole stanowiły kiełki rozwijające się w ciemności, a nie w świetle białym. Inne badania wskazują, że promieniowanie UV-B znacząco indukuje biosyntezę flawonoidów, w tym kemferolu, izolikwirytygeniny, apigeniny i daidzeiny [268] w kiełkach lucerny siewnej. Jednak uzyskane wyniki również nie znajdują potwierdzenia w tych danych źródłowych. Zmiany morfologiczne i odpowiedź fizykochemiczna roślin zachodzące na skutek działania promieniowania ultrafioletowego często zależą od intensywności naświetlania, czasu trwania ekspozycji oraz obszaru widmowego promieniowania UV [269,270]. W zakresie promieniowania UV wydzielone są trzy obszary: UV-A (315 – 400 nm), UV-B (280 – 315 nm) oraz UV-C (100 – 280 nm) [271]. Przyjmuje się, że promieniowanie UV stanowi około 5% światła słonecznego docierającego do powierzchni ziemi, przy czym pozbawione jest ono promieniowania z obszaru UV-C [271,272]. Natomiast w świetle słonecznym promieniowanie z obszaru UV-A jest od 500 do 1000 razy większe niż UVB. Pomimo większego udziału UV-A, uważa się, że jest ono mniej szkodliwe niż UV-B [273]. Rozbieżności pomiędzy przytoczonymi danymi literaturowymi, a badaniami własnymi wynikają przede wszystkim z różnic takich jak czas ekspozycji i zakres zastosowanego promieniowania ultrafioletowego. Jednak, interesujące wydają się być eksperymenty przeprowadzone na komosie ryżowej [270]. W badaniach tych wykazano, że zawartość flawonoidów w liściach narażonych na 30-minutowe promieniowanie UV-B nie uległa zmianie w porównaniu do warunków kontrolnych, natomiast 60-minutowe naświetlanie przyczyniło się do znacznego obniżenia zawartości tych związków. Odpowiedź roślin na warunki oświetlenia prawdopodobnie, jak w przypadku związków fenolowych, jest zależna od gatunku. Opublikowane wcześniej wyniki wskazują na brak różnic w zawartości antocyjanin (jednej z klas flawonoidów) w 5-dniowych kiełkach rzodkiewki rozwijających się w świetle czerwonym i niebieskim w porównaniu do zawartości tych substancji w kiełkach rozwijających się w świetle białym [207].

Uważa się powszechnie, że oświetlenie wywiera istotny wpływ na syntezę metabolitów wtórnych (m. in. związków fenolowych). Wyniki przeprowadzonych doświadczeń wskazują, że poprzez stosowanie różnych barw światła można wpływać nie tylko na zawartość związków fenolowych, ale także innych antyoksydantów obecnych w kiełkach rzodkiewki, jednocześnie zwiększając ich potencjał przeciwutleniający. Jednak potrzebne jest przeprowadzenie pogłębionych badań w tym zakresie, w celu szczegółowej analizy poszczególnych związków o działaniu przeciwutleniającym, np. z grupy glukozynolanów, powszechnie występujących w częściach rzodkiewki.

3.7 Podsumowanie

Wyniki dotyczące wpływu oświetlenia na kiełkowanie nasion rzodkiewki, jako rośliny modelowej jednoznacznie wskazują, że zastosowanie tylko powszechnie akceptowanych parametrów charakteryzujących kondycją roślin, jak energia kiełkowania i profil wzrostu nie dostarcza miarodajnych informacji na temat wpływu barwy światła, na proces kiełkowania i rozwój kiełków rzodkiewki. Dużo istotniejsze okazało się na przykład oznaczanie barwników fotosyntetycznych, mimo że w pierwszym etapie wzrostu, zawartość chlorofilu była nieoznaczalna. Dlatego też, dążąc do uzyskania bardziej spójnego obrazu wpływu testowanych warunków oświetlenia na poszczególne parametry biochemiczne określające kondycję roślin, przeprowadzono macierzową analizę skupień hierarchicznych (MHCA), którą przedstawiono w postaci mapy cieplnej z dendrogramami (Rysunek 30.). Wszystkie zmienne zostały znormalizowane względem kontroli. Kolorem jasnozielonym oznaczono markery biochemiczne, których intensywność zmniejszała się pod wpływem badanych czynników, natomiast kolor jasnoczerwony zastosowano dla tych markerów, które uległy zintensyfikowaniu. W przypadku braku zmian, pola mapy zostały zaznaczone na czarno. Kolorem szarym zostały oznaczone parametry, których nie wykryto.

97



Rysunek 30. MHCA oznaczanych markerów biochemicznych. Eksperymentalne warunki hodowli są wskazane po prawej stronie (CZ – czerwone, F – fioletowe, N – niebieskie, Z – żółte, UV-3, UV-30, ZB – zimne białe). Kolorowe słupki (skupiska C1 – C3) po prawej stronie mapy cieplnej oznaczają odrębne główne gałęzie drzewa skupiającego, grupującego parametry biochemiczne o podobnych wzorach wrażliwości na czynniki stresowe. Skala kolorów wskazuje wielkość różnic między wartościami parametrów biochemicznych kiełków rzodkiewki rozwijającej się w warunkach kontrolnych i eksperymentalnych (jasnoczerwony oznacza wartość dodatnią, jasnozielony oznacza wartość ujemną).

Z analizy dendrogramu wynika, że odpowiedzi roślin na testowane warunki oświetlenia w poszczególnych dniach hodowli można podzielić na cztery główne klastry. Największy klaster stanowi klaster 1 (C1), do którego zakwalifikowane zostało światło fioletowe (2 – 4 DAT), niebieskie i żółte (2 – 3 DAT), białe o zimnej barwie (2 DAT) oraz czerwone (4 DAT). Klaster ten wyróżnia silny wzrost zawartości AMP oraz niewielki wzrost zawartości ATP, białka i antyoksydanów, przy jednoczesnym obniżeniu zawartości Pi i barwników fotosyntetycznych w porównaniu do warunków kontrolnych. Natomiast najmniejszą zmianę w tym klastrze uzyskano dla aktywności enzymatycznej fitaz oraz zawartości związków fenolowych i flawonoidów. Do klastra 2 zakwalifikowane zostało światło żółte, zimne białe i niebieskie (4 DAT) oraz UV-30 (3 DAT). W tym klastrze, warunki wzrostu najbardziej wpływały na fosforom kiełków rzodkiewki, powodując zwiększenie zawartości nukleotydów adeninowych oraz białka, jednocześnie nie wpływając na zawartość związków fenolowych i flawonoidów w porównaniu do warunków kontrolnych. Klaster 3 (C3) obejmuje efekty

działania światła z dodatkiem promieniowania ultrafioletowego (2 i 4 DAT) oraz światło czerwone (2 i 3 DAT). Warto zwrócić uwage, że światło UV-30 (2 i 4 DAT) zgrupowane wraz z światłem UV-3 (4 DAT) powodowało nieznaczne zwiększenie zawartości nukleotydów adeninowych oraz nieznaczne zmniejszenie związków o aktywności przeciwutleniającej. Natomiast druga podgrupa – światło UV-3 (4 DAT) oraz światło czerwone – miało efekt odwrotny. Pomimo wskazanych różnic, na podstawie przeprowadzonej macierzowej analizy skupień hierarchicznych można stwierdzić, że działanie światła czerwonego oraz ultrafioletowego w pewnym zakresie jest zbieżne. Dodatkowo, analizując dane przedstawione na mapie cieplnej, można zauważyć, że pomimo zakwalifikowania do innych klastrów – zastosowanie światła niebieskiego (4 DAT) oraz UV-30 (2 – 4 DAT) prowadzi do wystąpienia stresu metabolicznego, ujawniającego się zaburzeniami funkcjonowania fosforomu (wzrost zawartości Pi, bardziej intensywna sygnalizacja wewnątrzkomórkowa AMP i tendencja do zużywania ATP). Występujące różnice w klasyfikacji potwierdzają konieczność oznaczania szerokiego wachlarza parametrów biochemicznych, Z uwzględnieniem badań fosforomicznych, w oznaczaniu kondycji roślin. Sugeruje to, że badania koncentrujące się na określeniu jedynie wybranych, standardowo stosowanych, markerów wzrostu, np. siła i energia kiełkowania, pokrój rośliny, zawartość barwników fotosyntetycznych jest niewystarczająca i nie dostarcza pełnego obrazu zachodzących przemian w trakcie rozwoju roślin w wyniku działania czynników stresowych. Warunki oświetlenia zaklasyfikowane w klastrze 4 – światło UV-3 (3 DAT) oraz światło białe o zimnej barwie (3 DAT) – w większości przypadków nieznacznie obniżały lub nie wpływały na zawartości poszczególnych markerów biochemicznych. Jedynie, zwiekszenie zawartości Pi odnotowano dla UV-3 oraz zawartości antyoksydantów dla światła białego o zimnej barwie w 3 DAT.

Dotychczasowe badania nad wpływem światła na kiełkowanie nasion i początkowym rozwojem roślin skupiają się głównie na świetle niebieskim, czerwonym lub ultrafioletowym (UV-B, UV-C). Przeprowadzone badania wskazują, że barwa światła wpływa nie tylko na powszechnie oceniane parametry biochemiczne, takie jak związki antyoksydacyjne, ale także przemiany związków fosforu. Światło, powoduje zmiany w aktywności fitaz – enzymów kluczowych w procesie kiełkowania, wpływając tym samym na zawartość wolnego fosforu (Pi). Ponadto, jak wykazano w poprzednich podrozdziałach, w zależności od długości fali, światło prowadzi do zmiany charakteru zachodzących procesów metabolicznych i wpływa na status energetyczny komórek roślinnych.

4 Wpływ jonów metali na kiełkowanie i kondycję kiełków rzodkiewki

Wśród czynników środowiskowych mających znaczący wpływ na prawidłowy rozwój roślin, wyróżnia się dostępność makro- i mikroelementów w glebie. Szczególną rolę w tej grupie substancji przypisuje się jonom metali przejściowych, które przedostają się do gleby w sposób niekontrolowany ze względu na rozwój gałęzi gospodarki wykorzystujących materiały metaliczne. Obecne w glebie metale ciężkie można podzielić na dwie grupy [274,275]:

- mikroelementy i pierwiastki śladowe niezbędne do prawidłowego wzrostu i rozwoju organizmów, do których zalicza się cynk, mangan, miedź, molibden, nikiel i żelazo;
- pierwiastki nieistotne lub o nieznanej funkcji biologicznej i fizjologicznej, do których należy między innymi: arsen, chrom, kadm, kobalt, czy ołów.

Mikroelementy i pierwiastki śladowe mają kluczowe znaczenie w różnych procesach fizjologicznych i biochemicznych zachodzących w roślinach (Rysunek 31.), pod warunkiem, że ich stężenie w środowisku nie przekracza wartości granicznych. W wyższych stężeniach, określanych jako stężenia toksyczne, obecność jonów metali ciężkich prowadzi do zaburzenia wielu procesów metabolicznych.



Rysunek 31. Rola mikroelementów, na przykładzie wybranych pierwiastków, w prawidłowym rozwoju roślin.

Toksyczność metali wynika z trzech głównych typów oddziaływań: (i) bezpośredniej interakcji metali z białkami, wynikającej z ich powinowactwa do grup tiolowych, histydynowych i karboksylowych w białkach strukturalnych, katalitycznych i transportowych komórek, (ii) stymulowania wytwarzania reaktywnych form tlenu (ROS), które zaburzają mechanizmy obrony antyoksydacyjnej i wywołują stres oksydacyjny lub (iii) wypierania

kationów z centrum cząsteczki, np. białka lub chlorofilu, co prowadzi do utraty pełnionych przez nie funkcji [274,276,277]. Ze względu na właściwości utleniająco-redukujące, w literaturze można znaleźć alternatywną klasyfikację metali ciężkich. I tak, do metali o aktywności redoks zalicza się chrom, kobalt, miedź, żelazo. Natomiast jako metale nieposiadające właściwości utleniająco-redukujących klasyfikuje się między innymi kadm, ołów, cynk, nikiel, czy glin [278–280]. Metale o aktywności redoks generują reaktywne formy tlenu bezpośrednio poprzez reakcję Habera-Weissa i Fentona. W przypadku metali nieposiadających tych właściwości, toksyczność jest wywoływana między innymi przez (i) zwiększenie zawartości reaktywnych form tlenu w komórkach w wyniku redukcji puli przeciwutleniaczy (np. glutationu), (ii) zwiększenia aktywności oksydazy NADPH (E.C. 1.6.3.1), oraz (iii) zaburzenie aktywności enzymatycznej na skutek wypierania kationów z połączeń w metaloenzymach [278].

Miedź jest przykładem metalu o właściwościach utleniająco-redukujących, a w układach biologicznych może występować w postaci jonów jednowartościowych (Cu⁺) oraz dwuwartościowych (Cu²⁺). W komórkach roślin, miedź bierze udział w podstawowych procesach metabolicznych, takich jak oddychanie mitochondrialne, odgrywając kluczową rolę w produkcji ATP. Natomiast w procesie fotosyntezy odpowiada za asymilację dwutlenku węgla oraz transport elektronów [281]. Miedź, jako kofaktor enzymów, np. oksydazy polifenolowej i fenolazy, bierze udział w syntezie lignin, tym samym odpowiadając za tworzenie ścian komórkowych i odporność roślin na czynniki patogenne. Ponadto, jako pierwiastek o aktywności redoks, pełni kluczową rolę w odpowiedzi na stres oksydacyjny [282]. Cynk i mangan przez rośliny sa pobierane głównie w postaci wolnych jonów dwuwartościowych lub chelatów organicznych. Cynk jako kofaktor wielu enzymów odpowiada między innymi za prawidłowy wzrost wydłużeniowy [283]. Jego niedobór doprowadza do zahamowania wzrostu lub powstawania wad morfologicznych, przejawiających się głównie deformacją korzeni i liści [284]. Istotne znaczenie we wzroście elongacyjnym przypisuje się także manganowi. Pierwiastek ten, odgrywa zasadniczą rolę w strukturyzacji fotosyntetycznych białek i enzymów oraz wpływa na ekspresję genów [285]. Zaburzenie procesów metabolicznych spowodowane zbyt dużym stężeniem jonów poszczególnych mikroelementów może doprowadzać nawet do śmierci roślin. Fitotoksyczny efekt, nadmiaru zarówno cynku, jak i manganu objawia się przede wszystkim zmianami chlorotycznymi i nekrotycznymi liści, prowadzącymi do ograniczenia procesów fotosyntetycznych. Natomiast, zbyt wysokie stężenie miedzi w komórkach roślin może

objawiać się zaburzeniami wzrostu i zawartości barwników fotosyntetycznych, a także utratą aktywności niektórych enzymów [286].

Ocena wpływu substancji zanieczyszczających, w tym metali ciężkich, coraz częściej opiera się na śledzeniu zawartość biomarkerów w komórkach organizmów żywych. Takie podejście pozwala uzyskać nie tylko wgląd w fizjologiczną, ale także biochemiczną reakcję organizmów na czynnik stresowy. Efekt toksyczny na poziomie komórkowym i subkomórkowym pojawia się dużo wcześniej niż na wyższych poziomach organizacji biologicznej organizmu. Dlatego też, wyniki pomiaru zmian zawartości odpowiednich biomarkerów mogą być interpretowane jako wczesne sygnały odpowiedzi roślin na stres środowiskowy [287]. Aby zweryfikować tę tezę, zbadano wpływ różnych jonów – cynku(II), miedzi(II) i manganu(II) – na wybrane parametry biochemiczne kiełkujących nasion rzodkiewki.

4.1 Profile fosforowe kiełków rzodkiewki rozwijających się w podłożu z dodatkiem wybranych jonów metali

W celu scharakteryzowania wszystkich form fosforu w ekstraktach (35% HClO₄; 3 x 30 min; UAE) z kiełków rzodkiewki wykorzystano metodę ³¹P NMR. Względne ilości (%) poszczególnych form P w przeliczeniu na całkowitą powierzchnię sygnałów zarejestrowanych na widmach NMR przedstawiono w Tabeli 11. Grupy fosforu zdefiniowano na podstawie charakterystycznych przesunięć chemicznych przy pH zasadowym [288]. Dla wszystkich analizowanych próbek sygnały na widmach obecne były w zakresie przesunięć chemicznych od -0,2 do 7,0 ppm, które odpowiadają pasmom pochodzącym od: P1 – polifosforany/difosforany [(-23) – (-3,5) ppm], P2 – inne fosfodiestry [(-2) – 1,5 ppm], P3 – fosfolipidy [1,5 – 3 ppm]; P4 – fosfomonoestry [3,0 – 5,5 ppm]; P5 – ortofosforany [5,5 – 7,0 ppm] oraz P6 – fosfoniany [15 – 20 ppm].

Uzyskane wyniki odzwierciedlają wpływ stężenia badanych jonów metali na względny ilościowy udział form fosforu w kiełkach rzodkiewki. Jak wynika z danych przedstawionych w Tabeli 11., w rzodkiewce w fazie kiełkowania udział poszczególnych form fosforu zmienia się w czasie trwania eksperymentu. Już 4-godzinne namaczanie nasion w wodnych roztworach zawierających jony metali, spowodowało zmiany w profilach fosforowych kiełkujących nasion rzodkiewki. Największe zmiany odnotowano dla 5 µM Mn²⁺ i 50 µM Mn²⁺ i 50 µM Zn²⁺, które spowodowały obniżenie udziału procentowego P2 i P3 oraz zwiększenie P4. W przypadku Zn również odnotowano zwiększenie udziału P5. Natomiast jony miedzi nie wpływały znacząco na zawartości poszczególnych form fosforu.

DAT	Warunki wzrostu	P1 (%)	P2 (%)	P3 (%)	P4 (%)	P5 (%)	P6 (%)
	Kontrola	_	0,9	0,4	61,8	36,9	_
	0,5 μM Cu	_	0,8	0,5	56,4	42,3	_
	5 μM Cu	_	1,3	0,8	59,1	38,8	_
	50 μM Cu	-	2,0	0,9	60,3	36,8	-
·	Kontrola	_	5,6	3,1	60,0	31,0	0,3
0	0,5 μM Mn	-	4,6	2,0	55,9	37,4	-
0	5 μM Mn	-	1,5	0,6	68,5	29,4	-
	50 μM Mn	-	1,5	0,6	68,5	29,4	-
	Kontrola	_	5,6	3,1	60,0	31,0	0,3
	0,5 µM Zn	_	6,0	2,8	58,8	31,9	0,5
	5 μM Zn	-	1,5	0,7	73,3	24,5	_
	50 µM Zn	-	1,6	0,7	69,6	28,0	_
	Kontrola	_	0,6	0,9	58,7	39,8	_
	0,5 µM Cu	-	0,4	0,3	51,8	47,5	_
	5 μM Cu	_	1,6	0,6	56,0	41,8	_
	50 μM Cu	_	0,4	0,5	51,0	48,1	_
	Kontrola	_	2,5	1,0	55,3	41,3	_
2	0,5 μM Mn	_	2,6	1,4	55,5	40,6	_
2	5 μM Mn	_	1,2	0,2	70,0	28,0	_
	50 μM Mn	_	2,6	1,3	59,6	35,8	_
	Kontrola	_	2,5	1,0	55,3	41,3	_
	0,5 µM Zn	_	1,8	0,4	54,0	43,8	_
	5 μM Zn	_	3,4	1,9	49,9	44,9	_
	50 µM Zn	_	3,0	1,9	55,1	40,0	_
	Kontrola	_	1,0	0,1	34,2	64,6	_
	0,5 µM Cu	_	0,7	0,1	28,6	70,6	_
	5 µM Cu	_	0,9	0,0	30,3	68,9	_
	50 μM Cu	_	0,8	0,3	31,3	67,6	_
	Kontrola	_	1,0	0,1	34,2	64,6	_
	0,5 μM Mn	_	1,5	0,5	40,8	57,2	_
4	5 μM Mn	_	0,8	0,7	42,7	54,8	_
	50 μM Mn	_	1,6	0,6	36,8	60,9	_
	Kontrola	_	1,1	0,4	41,1	57,4	_
	0,5 µM Zn	_	1,2	0,5	35,8	62,5	_
	5 µM Zn	_	2,4	1,0	43,2	53,4	_
	50 µM Zn	_	1,4	0,4	43,2	55,0	_

Tabela 11. Względne ilości (%) form fosforu zarejestrowanych na widmach ³¹P NMR ekstraktów z kiełków rzodkiewki rozwijających się z dodatkiem jonów metali.

Zakres przesunięć chemicznych (ppm) poszczególnych form fosforu zarejestrowanych na widmach ³¹P NMR ekstraktu badanych próbek o odczynie zasadowym: P1 – polifosforany/difosforany ((-23) – (-3,5) ppm); P2 – inne fosfodiestry ((-2) – 1,5 ppm); P3 – fosfolipidy (1,5 – 3 ppm); P4 – fosfomonoestry (3,0 – 5,5 ppm); P5 – ortofosforany (5,5 – 7,0 ppm); P6 – fosfoniany (15 – 20 ppm); "–" – nie oznaczono. Błąd standardowy nie przekraczał 10% wartości podanych w tabeli.

Największe zmiany udziału poszczególnych form fosforu zanotowano w 2 i 4 DAT. W 2 DAT zachodzące zmiany były zależne od rodzaju kationów metali (Rysunek 32.), a także od zastosowana stężenia. Ponadto, analizując zestawione widma, można zauważyć, że największe różnice w kształcie sygnałów pochodzących od różnych monoestrów fosforanowych, można zauważyć w przedziale P4, które świadczą o odmiennym składzie związków fosforoorganicznych w kiełkach rzodkiewki.



Rysunek 32. Porównanie widm ³¹P NMR ekstraktów z kiełków rzodkiewki (2 DAT) rozwijających się z dodatkiem roztworów (5 μ M) zawierających jony Cu²⁺ (A), Mn²⁺ (B) i Zn²⁺ (C).

Jednak w 4 DAT zmiany udziału poszczególnych form fosforu w przypadku Cu i Mn nie zależały od zastosowanego stężenia. Jony miedzi(II) spowodowały zmniejszenie udziału P4 oraz zwiększenie P5. Zmiany form P w kiełkach rzodkiewki rozwijających się z dodatkiem jonów manganu(II) były odwrotne niż w przypadku dodatku jonów miedzi(II). Natomiast zastosowanie 0,5 µM roztworu zawierającego jony cynku(II) przyczyniło się do obniżenia zawartości P4, przy jednoczesnym zwiększeniu ilości P5; w przypadku 5 µM roztworu obniżeniu uległy ilość P2, a zwiększeniu P3; natomiast dla 50 µM Zn²⁺ nie odnotowano znaczących zmian w profilach ³¹P NMR kiełków rzodkiewki.

Warto zaznaczyć, że wyniki przeprowadzonych pomiarów ³¹P NMR ekstraktów uzyskanych w toku tego eksperymentu wykazały obecność fosfonianów w rzodkiewce rozwijającej się w optymalnych warunkach wzrostu oraz w kiełkujących nasionach rzodkiewki traktowanej 0,5 μ M roztworem jonów Zn²⁺ w 0 DAT.

4.2 Aktywność fitaz i zmiany zawartości Pi w kiełkach rzodkiewki

Analizując wpływ dodatku jonów metali na proces kiełkowania określono aktywność enzymatyczną fitaz i wynikającą z niej zawartość jonów fosforanowych oraz zawartość białka. Zawartość fosforu nieorganicznego w kiełkach rzodkiewki wzrastała wraz z czasem rozwoju roślin, a średnie wartości w kolejnych dniach wynosiły odpowiednio: 1,30 mg g⁻¹ s.m. (0 DAT), 1,17 mg g⁻¹ s.m. (1 DAT), 2,13 mg g⁻¹ s.m. (2 DAT), 5,39 mg g⁻¹ s.m. (3 DAT) i 5,52 mg g⁻¹ s.m. (4 DAT). Najmniejszą zawartość Pi (0,84 ± 0,09 mg g⁻¹ s.m.) oznaczono w 1 DAT dla 50 μ M Mn²⁺, natomiast największą (7,75 ± 0,10 mg g⁻¹ s.m.) w 4 DAT dla 0,5 μ M Zn²⁺. Analizując średni współczynnik zawartości Pi (Wykres 14. A) można zawartość fosforu w kiełkujących nasionach i kiełkach rzodkiewki.



Wykres 14. Średni współczynnik zawartości Pi (A) i białka (C) oraz aktywności enzymatycznej fitaz (B) w kiełkach rzodkiewki rozwijającej się w podłożu zawierającym dodatek jonów Cu(II), Mn(II) i Zn(II). Wartości dla odpowiednich hodowli kontrolnych przyjęto w każdym przypadku jako 100%, "*" oznaczono różnice istotne statystycznie (p≤0,05) w odniesieniu do kontroli.

Obecność jonów miedzi w podłożu hodowlanym przyczyniła się do istotnego zwiększenia zawartości Pi w kiełkach rzodkiewki po 2 DAT niezależnie od zastosowanego stężenia. Wyjątek stanowią rośliny traktowane 0,5 µM roztworem zawierającym Cu²⁺, dla którego średni współczynnik zawartości Pi wynosił 126% już po 4 godzinach namaczania. Największy wzrost w zawartości Pi względem kontroli odnotowano w 3 DAT dla roztworów: 0,5 µM Cu²⁺ (150%), 5 µM Cu²⁺ (163%) i 50 µM Cu²⁺ (178%). Natomiast w przypadku dodatku jonów cynku do podłoża, indukowane zmiany średniego współczynnika zawartości Pi były zależne od zastosowanego stężenia oraz czasu narażenia na badany stresor. Po 4-godzinnym namaczaniu nasion w 0,5 µM roztworze Zn²⁺ doszło do obniżenia średniego współczynnika zawartości Pi w kiełkujących nasionach rzodkiewki. Natomiast od 1 DAT zawartość Pi była wyższa w porównaniu z kontrolą, odpowiednio o 52% (1 DAT), 19% (2 DAT), 58% (3 DAT) i 8% (4 DAT). Przy zastosowaniu stężenia 5 µM Zn²⁺ wyższy współczynnik zawartości Pi, na poziomie 128,5 ± 0,5%, odnotowano jedynie w 1 i 2 DAT; w 3 i 4 DAT wartość tego współczynnika wynosiła odpowiednio 74% i 83%. Warto zwrócić uwagę, że wpływ roztworu Zn^{2+} o stężeniu 50 µM był zauważalny dopiero w 3 DAT, kiedy to zawartość Pi wzrosła o 29% w porównaniu do kontroli. Jednak w 4 DAT odnotowano spadek w zawartości Pi o 21% względem kontroli. Również w przypadku zastosowania jonów manganu(II) jako stresora chemicznego nie można zauważyć relacji w zmianach zawartości Pi – wpływ zależy od stężenia Mn²⁺ oraz czasu narażenia. Do istotnego obniżenia średniego współczynnika zawartości Pi doszło w 0 DAT (o 26% i 13%) oraz w 2 DAT (o 12% i 26%) w rzodkiewce traktowanej odpowiednio 5 i 50 μ M roztworem Mn²⁺, a także w 4 DAT w roślinach traktowanych roztworem jonów Mn^{2+} o steżeniu 0,5 µM (o 36%), 5 µM (o 54%) i 50 µM (o 34%). Natomiast zwiększenie zwartości Pi odnotowano jedynie w przypadku rzodkiewki traktowanej 0,5 µM roztworem Mn²⁺ w 1 i 2 DAT. U roślin narażonych na działanie metali ciężkich dochodzi do zmian w metabolizmie oraz upośledzenia organizacji komórek, m.in. zmiany w składzie kwasów tłuszczowych w błonie komórkowej [289]. Udowodniono, że jony Cu²⁺ przyczyniają się do zwiększenia zawartości Pi w korzeniach pszenicy, jednak nie wpływają na zawartość fosforu w pędach [290]. Wzrost średniego współczynnika zawartości Pi w kiełkach rzodkiewki rozwijających się z dodatkiem jonów miedzi(II) może wynikać ze wzrostu aktywności V-ATPaz lub zmniejszenia zawartości fosfolipidów. Dane literaturowe wskazują, że podczas stresu wywołanego jonami miedzi(II), ich nadmiar jest transportowany i magazynowany w wakuolach. Transport ten odbywa się wskutek aktywności V-ATPaz, podczas którego dochodzi do hydrolizy ATP i uwolnienia Pi[291]. Ponadto dowiedziono, że stres wywołany jonami miedzi(II) prowadzi do zmniejszenia zawartości fosfolipidów, co także pośrednio wpływa na steżenie jonów fosforanowych w roślinach [289]. Natomiast u roślin narażonych na działanie jonów cynku(II), dochodzi do zwiększenia syntezy fosfolipidów. W przypadku zwiększonej biosyntezy fosfolipidów, stężenie jonów fosforanowych powinno ulegać zmniejszeniu. Jednak uzyskane wyniki nie pokrywają się z danymi źródłowymi – nie świadczą o tym. Ponadto, mechanizm sekwestracji jonów cynku w wakuoli zachodzi przede wszystkim poprzez MTP (ang. metal transporter protein) [292]. Transport ten odbywa się na zasadzie dyfuzji wspomaganej, w której jednocześnie jony wodorowe są transportowane w przeciwnym kierunku (z wakuoli do cytoplazmy) [293,294], a nie jak w przypadku jonów Cu²⁺ wskutek aktywności ATPaz. Wyższe zawartości fosforu nieorganicznego mogą być związane z aktywności enzymatyczną fitaz – uwalniających zmagazynowany fosfor z cząsteczek fitynianów lub ze zwiększeniem aktywności enzymów metalozależnych. Przykładem takich enzymów są fosfataza alkaliczna (AP), fosfolipaza C (PLC) lub rybonukleazy (RNAzy, np. P1 nukleaza), których aktywność zależy od dostępności cynku w podłożu [295]. Jednocześnie, enzymy te katalizują reakcję hydrolizy wiązań estrowych z uwolnieniem jonów fosforanowych. Udowodniono, że w przypadku niektórych roślin ekspresja RNAz występuje we wczesnych stadiach rozwoju, co świadczy o udziale niektórych RNAz w kontrolowaniu procesów wzrostu i rozwoju [296]. Zwiększenie średniego współczynnika zawartość Pi może również wynikać z aktywności fosfataz. Dowiedziono, że dodatek jonów Zn²⁺ zwiększał aktywność enzymatyczna kwaśnej fosfatazy w kiełkach grochu o 40% [297], co potwierdza wcześniej postawioną hipotezę.

Aktywność enzymatyczna fitaz w kiełkach rzodkiewki traktowanej wybranymi jonami metalu wzrasta prawidłowo w czasie trwania hodowli. W przypadku zastosowania 5 μ M roztworu zawierającego Zn²⁺ wzrost aktywności enzymatycznej fitaz był obserwowany do 3 DAT, osiągając maksymalną wartość na poziomie 1,48 ± 0,24 U g⁻¹ s.m.). Natomiast w przypadku zastosowania 5 μ M roztworu zawierającego Mn²⁺, aktywność enzymatyczna fitaz wzrastała do 2 DAT (0,66 ± 0,07 U g⁻¹ s.m.), utrzymując się na tym poziomie w 3 DAT (0,69 ± 0,09 U g⁻¹ s.m.). Jednakże w 4 DAT ponownie odnotowano wzrost aktywności badanych enzymów (1,21 ± 0,19 U g⁻¹ s.m.). Warto zwrócić uwagę także na fakt, iż największy wzrost aktywności enzymatycznej fitaz (prawie dwukrotny) odnotowano z 3 DAT na 4 DAT również w przypadku zastosowania 50 μ M Cu²⁺ (z 1,56 ± 0,01 na 2,82 ± 0,10 U g⁻¹ s.m.) oraz 50 μ M Zn²⁺ (z 1,20 ± 0,09 na 2,16 ± 0,05 U g⁻¹ s.m.). Analizując wpływ dodatku jonów metali na zmiany aktywności enzymatycznej fitaz w kiełkach rzodkiewki można zauważyć, że jedynie jony miedzi zwiększały aktywność tych enzymów. Istotne
zmiany odnotowano w 1 i 2 DAT (o 33 – 49% względem kontroli). Natomiast jony cynku i manganu przyczyniły się do obniżenia średniego współczynnika aktywności fitaz. Wyjątek stanowi jedvnie 0,5 µM Zn²⁺ w 2 DAT, dla którego aktywność enzymatyczna fitaz była istotnie wyższa (o 72%) względem kontroli. W przypadku jonów manganu, niezależnie od zastosowanego stężenia oraz czasu ekspozycji, dochodziło do obniżenia aktywności fitaz w kiełkach rzodkiewki. Nieznaczne zwiększenie odnotowano jedynie w 0 i 2 DAT, jednak wartości te nie były istotnie statystycznie. Udowodniono, że kationy metali moga wpływać stymulującą bądź hamująco na aktywność enzymatyczną fitaz [298]. Efekt ich działania zależy nie tylko od charakteru jonu, ale także od źródła pochodzenia enzymu, które determinuje stabilność, optymalne pH i temperaturę oraz sposób działania [298,299]. Wykazano, że jony metali m. in. Cu²⁺, Fe²⁺, Mn²⁺, Mg²⁺ i Zn²⁺ wykazywały negatywny wpływ na aktywność enzymatyczna fitaz izolowanych z *Bacillus subtilis* [300], natomiast zwiekszały względna aktywność fitaz pochodzących z Schizophyllum commune [301]. Podobne efekt wykazano dla jonów Co²⁺ i Mn²⁺ na aktywność fitaz z *Aspergillus ficuum*, podczas gdy jony Cu²⁺ działały hamująco [300,302]. Jednak mało znany jest wpływ kationów metali na aktywność roślinnych fitaz. Dostępne dane wskazują, że jony metali hamowały lub nie zmieniały aktywności enzymatycznej fitaz wyizolowanych z soi, a jony Ca²⁺ stymulowały aktywność enzymatyczną fitazy kukurydzy i pałki szerokolistnej [300]. Dowiedziono również, że inkubacja otrębów pszennych w roztworach zawierających kationy sodu, potasu, wapnia lub magnezu negatywnie wpływa na aktywność endogennej fitazy [303]. Analizując wyniki przeprowadzonych doświadczeń, można również zauważyć brak korelacji pomiedzy średnimi współczynnikami aktywności enzymatycznej fitaz a zawartości Pi. Takie wyniki sugerują, że wzrost zawartości Pi wynikał z (i) obecności innych enzymów hydrolizujących wiązania fosfoestrowe, (ii) nieenzymatycznej hydrolizy związków zawierających w swojej strukturze grupę fosforanową lub (iii) zmniejszonej aktywności enzymów katalizujących reakcję fosforylacji. Dane literaturowe, zestawione z wynikami uzyskanymi w toku realizacji pracy doktorskiej, wskazują, że zagadnienia dotyczące aktywności fitaz w kiełkach roślin są wciąż mało poznane. Jednocześnie, aktywność enzymatyczna fitaz może stanowić dodatkowy parametr biochemiczny w ocenie kondycji rozwijających się roślin.

Zawartość białek mieściła się w zakresie od 5,93 do 13,45 mg g⁻¹ s.m., przy czym najniższą wartość odnotowano w kiełkach rzodkiewki traktowanych 5 μ M Zn²⁺ w 2 i 3 DAT, natomiast najwyższą wartość oznaczono w kiełkach rzodkiewki traktowanych 0,5 μ M Mn²⁺ w 3 DAT. Jednocześnie, istotny wpływ jonów metali na zawartość białek zaobserwowano

108

jedynie dla 0,5 μM Mn²⁺ w 2 i 3 DAT, 50 μM Mn²⁺ w 3 DAT, 50 μM Cu²⁺ w 1 i 2 DAT oraz 0,5 i 5 μM Cu²⁺ w 3 DAT. Dane literaturowe wskazują, że nadmiar miedzi wzmaga syntezę specyficznego białka, prawie identycznego z plastocyjaniną, co jest pomocne w ochronie rośliny przed nadmiarem Cu [304]. Dane źródłowe wskazują także, że jony manganu prowadzą do zmian w ekspresji wielu białek na początkowym etapie wzrostu roślin[305–307], a charakter tych zmian jest zależny od rodzaju białka i jego funkcji w komórkach roślinnych.

4.3 Zmiany w zawartości nukleotydów adeninowych i status metaboliczny kiełków rzodkiewki rozwijających się w różnych warunkach oświetlenia

Rozpatrując wpływ jonów metali na kondycję roślin, jeden z kluczowych markerów biochemicznych stanowi adenylowany ładunek energetyczny, wyrażony jako stosunek nukleotydów adeninowych zawierających wysokoenergetyczne wiązania ([ATP] + ½ [AMP]) do sumy wszystkich nukleotydów adeninowych, określający status energetyczny roślin [104]. Spośród wszystkich oznaczonych nukleotydów adeninowych największą pulę stanowił adenozyno-5'-difosforan (ADP), którego średnia zawartość wzrastała w czasie trwania hodowli z 396,36 µg g⁻¹ s.m. w 0 DAT do 871,19 µg g⁻¹ s.m. w 4 DAT (Wykres 15.). Najniższą zawartość (251,47 \pm 0,70 µg g⁻¹ s.m.) odnotowano dla kiełków rzodkiewki traktowanych 5 μ M Mn²⁺, natomiast najwyższą (1059,50 ± 127,29 μ g g⁻¹ s.m.) dla kiełków rzodkiewki traktowanych 50 μ M Cu²⁺. Najmniejszą zawartość AMP (78,01 ± 0,24 μ g g⁻¹s.m.) oznaczono w 0 DAT dla 50 μ M Mn²⁺, a największą (557,53 ± 39,34 μ g g⁻¹ s.m.) w 3 DAT dla 5 μ M Zn²⁺. Jednak najmniejszą pulę nukleotydów adeninowych – ponad 2-krotnie niższą ADP i AMP – stanowiło ATP, którego średnia zawartość w poszczególnych dniach trwania hodowli wynosiła odpowiednio: 142,87; 159,08; 154,06; 154,08; 134,37 µg g⁻¹ s.m. Najmniejszą zawartość ATP (30,88 \pm 5,82 µg g⁻¹ s.m.) oznaczono w kiełkach traktowanych 0,5 μ M Mn²⁺ w 3 DAT, a najwyższą (319,49 ± 10,66 μ g g⁻¹ s.m.) dla 50 Cu²⁺ w 2 DAT. Charakter zmian zawartości AMP i ATP w czasie trwania hodowli zależał od zastosowanego jonu metalu oraz w większości przypadków od stężenia. Podobne zależności można zauważyć dla kiełków rzodkiewki rozwijających się z dodatkiem 0,5 µM Zn²⁺ oraz 5 i 50 µM Mn²⁺ oraz 5 i 50 µM Cu²⁺, dla których początkowo zarejestrowano wzrost, a następnie spadek zawartość AMP. Natomiast zawartość ATP utrzymywała się na względnie stałym poziomie w kiełkach rzodkiewki traktowanych roztworami 0,5 μ M Cu²⁺, 0,5 i 5 μ M Zn²⁺, a w przypadku zastosowania jonów manganu(II) zawartość trifosforanów adenozyny spadała w czasie trwania hodowli.



Wykres 15. Zawartość nukleotydów adeninowych – AMP (A), ADP (B), ATP (C) – w kiełkach rzodkiewki traktowanych roztworami metali zawierających różne stężenia jonów Cu^{2+} , Mn^{2+} lub Zn^{2+} .

Analizując wpływ dodatku wybranych jonów metali na zmiany średniego współczynnika zawartości nukleotydów adeninowych (Wykres 16.) można zauważyć, że zarówno dodatek jonów miedzi(II), jak i cynku(II) do podłoża hodowlanego doprowadził do istotnego zwiększenie zawartości AMP w kiełkach rzodkiewki w odniesieniu do kontroli. Natomiast wprowadzenie jonów Mn²⁺ skutkowało obniżeniem zawartości AMP w tkankach badanych roślin. Wyjątek stanowi 2 DAT dla 0,5 µM Mn²⁺, dla którego zawartość była wyższa o 20% w porównaniu do warunków kontrolnych. Dodatek jonów cynku(II) do podłoża hodowlanego powodował również istotne zwiększenie zawartości ADP w początkowych dniach rozwoju roślin (Wykres 16. B), natomiast nie wpływał negatywnie na zawartość difosforanu adenozyny w 3 i 4 DAT. Jednakże wprowadzenie jonów Mn²⁺ do podłoża przyczyniło się do istotnego obniżenia zawartości ADP w kiełkach rzodkiewki w porównaniu do warunków kontrolnych. Dla każdego ze stosowanych stężeń jonów Zn²⁺ zawartość ATP w kiełkach rzodkiewki w czasie trwania eksperymentu była wyższa w porównaniu do kontroli. Wyjątek stanowi 0,5 i 5 µM Zn²⁺ w 1 DAT. Natomiast w przypadku jonów Cu²⁺ i Mn²⁺ wartości te były niższe, za wyjątkiem Cu²⁺ w 1 DAT.



Wykres 16. Średni współczynnik zawartości AMP (A), ADP (B), ATP (C) oraz średni współczynnik AEC (D) w kiełkach rzodkiewki rozwijającej się w z dodatkiem wybranych jonów metali. Wartości dla odpowiednich hodowli kontrolnych przyjęto w każdym przypadku jako 100%, "*" oznaczono różnice istotne statystycznie ($p \le 0.05$) w odniesieniu do kontroli.

Odnosząc się do stresu fizjologicznego roślin indukowanego dodatkiem jonów miedzi(II) zauważono, że obecność tych jonów w podłożu, w stężeniu powyżej 5 µM wpływa na status metaboliczny rzodkiewki, powodując obniżenie wartości parametru AEC w odniesieniu do warunków kontrolnych. Natomiast w przypadku jonów manganu(II) i cynku(II) zmiany w wartości parametru AEC w odniesieniu do kontroli zależały od zastosowanego stężenia oraz czasu narażenia roślin na badany czynnik. Ponadto, w przypadku nasion rzodkiewki rozwijających się z dodatkiem jonów miedzi(II) w stężeniu 5 oraz 50 µM wartość parametru AEC nie przekraczała 0,5 w pierwszych dwóch dniach kiełkowania i wzrastała liniowo w czasie, osiągając maksymalnie wartość 0,55 w czwartym dniu trwania hodowli. Takie zmiany parametru AEC wskazują na kierunek przemian metabolicznych – z reakcji katabolicznych, na rekcję anaboliczne. Podobną zależność uzyskano dla roślin traktowanych jonami manganu(II) o stężeniu 5 µM, jednak maksymalna wartość parametru AEC w 4 DAT była na poziomie 0,45, co świadczy o przewadze reakcji katabolicznych. Natomiast w przypadku dodatku roztworów zawierających jonów miedzi(II) o stężeniu 0,5 µM, pomimo że wartość parametru AEC malała w czasie trwania hodowli (0,56 ± 0,01 w 0 DAT; 0,51 ± 0,01 w 4 DAT) w komórkach kiełków rzodkiewki przeważały reakcje anaboliczne. Analizując

średni współczynnik AEC (Wykres 16. D) można zauważyć, że jony miedzi(II) istotnie obniżały wartość parametru AEC w każdym dniu trwania eksperymentu. Największe zmiany odnotowano dla 5 µM Cu²⁺ w 1 DAT (o 20%), natomiast najmniejsze dla 0,5 Cu²⁺ w 2 DAT (o 4%). Wynik ten świadczy o przesunięciu przemian metabolicznych w kierunku procesów katabolicznych u kiełków rzodkiewki rozwijających się z dodatkiem jonów miedzi(II) w porównaniu do warunków kontrolnych. Natomiast, wprowadzenie jonów manganu(II) do podłoża spowodowało istotne statystycznie zwiększenie średniego współczynnika AEC w 0 DAT o około 20% w porównaniu do kontroli. Jednak w ostatnich dniach trwania eksperymentu w przypadku zastosowania 50 µM Mn²⁺ wartość parametru AEC była niższa odpowiednio o 5% (3 DAT) i 9% (4 DAT) w porównaniu do warunków kontrolnych. Różnice istotne statystycznie w przypadku kiełków rzodkiewki rozwijających się z dodatkiem jonów cynku odnotowano w 0 DAT oraz 3 DAT dla wszystkich zastosowanych stężeń, a także w 1 DAT w przypadku 50 μ M Zn²⁺. Warto jednak zwrócić uwage, że charakter wywołanych zmian jest różny – w 0 DAT dodatek jonów cynku(II) do podłoża spowodował zwiększenie wartości średniego współczynnika AEC, natomiast w 3 DAT istotne zwiększenie odnotowano jedynie w przypadku 0,5 µM Zn²⁺. Taki wynik świadczy o przesunięciu przemian metabolicznych w kierunku procesów anabolicznych w porównaniu do kontroli.

Biochemiczne podstawy odporności roślin na stres środowiskowy opierają się między innymi na ciągłej regeneracji ATP w celu zachowaniu prawidłowego przebiegu procesów fizjologicznych [103]. Pomimo iż, toksyczność cynku prowadząca do inhibicji fotosystemu I i II, negatywnie wpływa na proces fotosyntezy i ogólną syntezę ATP [308], przeprowadzone badania nie potwierdzaja tego spostrzeżenia, nawet w przypadku kiełków z 4 DAT, kiedy to liścienie były już w pełni rozwinięte. W kiełkujących nasion, kiedy nie rozwinęły się w pełni liścienie, synteza ATP nie zależy od aktywności fotosystemów. Jednak, inne badania wskazują, że imbibicja nasion w roztworze zawierającym jony cynku(II), również wywiera istotny efekt hamujący na syntezę ATP [309]. Uzyskane wyniki wskazują, że jony cynku przyczyniły się do zwiększenia syntezy ATP. Rozbieżności te wynikają prawdopodobnie z zastosowanych stężeń roztworów jonów Zn²⁺, które były niższe i nie wykazywały toksycznego efektu względem rozwijających się nasion rzodkiewki. Warto również zwrócić uwagę na fakt, iż jony metali, takich jak miedź, żelazo oraz cynk są niezbędne w prawidłowym funkcjonowaniu kilku enzymów biorących udział w cyklu TCA, transporcie elektronów, obronie antyoksydacyjnej, jak również syntezie ATP [310–312]. Przeprowadzone badania wykazały, że jony miedzi(II) charakteryzowały się dużo większą toksyczność względem rzodkiewki. Uzyskane wyniki są zbieżne z danymi literaturowymi [308]. Pomimo iż, największy toksyczny efekt na syntezę nukleotydów adeninowych uzyskano dla jonów manganu(II), wartości parametru AEC były zbieżne z warunkami kontrolnymi. Ponadto na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że brak zmian wartości parametru AEC oraz charakteru zachodzących przemian metabolicznych (katabolizm) wynika z proporcjonalnego zahamowania biosyntezy nukleotydów adeninowych – ATP, ADP i AMP. Warto zwrócić uwagę na fakt, iż zaburzenie syntezy nukleotydów adeninowych wskutek działania jonów Mn²⁺ jest powiązane ze zmniejszeniem zawartości wewnątrzkomórkowego poziomu Pi w kiełkach rzodkiewki.

4.4 Profil wzrostu

Profil wzrostu kiełków rzodkiewki rozwijających się z dodatkiem jonów metali w podłożu przedstawiono na Wykresie 17. Wykiełkowane nasiona zbierano przez cztery kolejne dni, począwszy od pojawienia się korzonka zarodkowego (1 DAT).



Wykres 17. Dynamika kiełkowania nasion rzodkiewki rozwijających się z dodatkiem jonów metali wyrażona w procentach jako stosunek całkowitej liczby badanych nasion.

Analizując uzyskane wyniki można zauważyć, że największy wpływ na proces kiełkowania miały jony miedzi(II) oraz manganu(II), a ich działanie było odmienne. Dla jonów Cu²⁺ odnotowano istotne zwiększenie wykiełkowanych nasion w 1 i 2 DAT, odpowiednio o 18% i 10%. Natomiast w przypadku jonów Mn²⁺ zaobserwowano istotne zmniejszenie odsetku wykiełkowanych nasion w 1 DAT (5 μ M i 50 μ M) o 11% oraz 4 DAT (50 μ M) o 8 %. Dane literaturowe wskazują, że jony metali działają bardziej toksycznie na wzrost siewek niż proces kiełkowania [313,314]. W nasionach, łupina nasienna pełni rolę ochronną przed niekorzystnymi czynnikami zewnętrznymi, ograniczając między innymi przenikanie toksycznych czynników chemicznych, w tym jonów metali do zarodka [315]. Natomiast w przypadku siewek, obecne w podłożu hodowlanym jony metali są pobierane

przez specyficzne białkowe transportery, które następnie są rozprowadzane (ulegają translokacji i redystrybucji) po całej roślinie [316]. Jednak dla przedstawionych wyników, zależność taka została zaobserwowano dopiero w ostatnim dniu prowadzenia eksperymentu, jedynie w przypadku jonów manganu(II) powyżej stężenia 50 µM. Ponadto, dane literaturowe wskazują, że dla jonów Cu²⁺, Pb²⁺, czy Zn²⁺ nie wykazano nadmiernej toksyczności dla kiełkujących nasion roślin – IC₅₀ [stężenie powodujące 50%-inhibicję kiełkowania] dla tych metali wykazano dla stężeń >50 mM [314]. Warto zaznaczyć, że toksyczne działanie jonów metali ciężkich na kiełkowanie nasion i wzrost sadzonek mają wpływ czynniki środowiskowe, takie jak pH podłoża, czy dostępność składników odżywczych (np. innych jonów metali bezpośrednio wpływających na działanie białkowych transporterów) [317].

4.5 Zawartość barwników fotosyntetycznych

W wyniku stresu wywołanego metalami ciężkimi, w wielu przypadkach dochodzi do zaburzeń w procesie fotosyntezy. Zaburzenia te są związane przede wszystkim z zahamowanie aktywności fotosystemu I i II wynikających ze zmniejszenia zawartości chlorofilu oraz wypierania jonów Mg²⁺ w cząsteczkach chlorofilu [317,318]. Ponadto udowodniono, że zwiększona koncentracja jonów kadmu prowadzi do zmniejszenia zawartości barwników fotosyntetycznych – chlorofili i karotenoidów [318]. Na Wykresie 18. przedstawione zostały zmiany średniego współczynnika zawartości karotenoidów oraz chlorofilu. Na podstawie przedstawionych danych można stwierdzić, że obecność jonów metali w podłożu wpływa na metabolizm barwników fotosyntetycznych. Zawartość karotenoidów wzrastała w czasie hodowli, a jej średnia wartość w poszczególnych dniach mieściła się w zakresie 0,02 mg g⁻¹ s.m. (0 – 2 DAT), 0,06 mg g⁻¹ s.m. (3 DAT) oraz 0,17 mg g⁻¹ s.m. (4 DAT). Największą zawartość (0,228 mg g⁻¹ s.m.) oznaczono w 4 DAT dla 50 μ M Cu, natomiast najmniejszą (0,012 mg g⁻¹ s.m.) dla 0,5 i 50 μ M Zn oraz 5 μ M Mn. Wpływ jonów metali na zawartość karotenoidów była zauważalny już od 1 DAT. Dla większości przypadków, zawartość karotenoidów była równa lub niższa w porównaniu do roślin rozwijających się w warunkach kontrolnych. Największe istotne różnice (powyżej 20%) odnotowano dla 50 µM Cu²⁺ w 1 DAT; 0,5 µM Mn²⁺, 50 µM Mn²⁺ i 50 µM Zn²⁺ w 2 DAT oraz $0.5 - 50 \mu M Mn^{2+}$ i 5 - 50 $\mu M Zn^{2+}$ w 3 DAT. Natomiast w przypadku 5 μM Mn^{2+} , 0,5 μM Zn^{2+} i 50 μM Zn^{2+} w 1 DAT; 0,5 μM Cu^{2+} w 3 DAT oraz 5 μM Zn^{2+} w 4 DAT zawartość karotenoidów była istotnie (≥20%) wyższa w porównaniu z kontrolą.



Wykres 18. Średni współczynnik zawartości karotenoidów (A) i chlorofilu (B) w kiełkach rzodkiewki rozwijającej się w podłożu z dodatkiem jonów metali. Wartości dla odpowiednich hodowli kontrolnych przyjęto w każdym przypadku jako 100%, "*" oznaczono różnice istotne statystycznie ($p \le 0.05$) w odniesieniu do kontroli.

Zawartość chlorofilu całkowitego w kiełkach rzodkiewki rozwijających się w podłożu z dodatkiem jonów metali, podobnie jak w poprzednio omówionym eksperymencie, była oznaczalna dopiero od 3 DAT. Średnia zawartość w 3 i 4 DAT wynosiła odpowiednio: 0,17 mg g⁻¹ s.m. i 0,96 mg g⁻¹ s.m.. Przy czym najniższą zawartość oznaczono dla 5 µM Mn²⁺ i 50 μ M Zn²⁺ (0.08 ± 0.00 i 0.09 ± 0.00 mg g⁻¹ s.m.) w 3 DAT, a najwyższa dla 50 μ M Cu²⁺ $(1,18 \pm 0.07 \text{ mg g}^{-1} \text{ s.m.})$ w 4 DAT. Pomimo iż, w początkowo jony miedzi (0,5 µM) wpływały korzystnie na syntezę chlorofilu (180% kontroli) to już w 4 DAT przyczyniły się do obniżenia zawartości chlorofilu w porównaniu do kontroli. Natomiast pozytywny efekt dodatku jonów Mn²⁺ i Zn²⁺ odnotowano w 4 DAT. Zawartość chlorofilu dla 50 µM Mn²⁺ była o 36% wyższa w porównaniu do kontroli. Ponadto, pomimo niższej wartości średniego współczynnika zawartości chlorofilu (57% kontroli) w 3 DAT w przypadku 5 µM Mn²⁺, w 4 DAT odnotowano znaczny wzrost zawartości omawianego barwnika fotosyntetycznego – do 122% kontroli. Podobne zależności odnotowano dla 5 µM Zn²⁺ i 50 µM Zn²⁺, dla których wzrost ten był odpowiednio z 74% do 138% kontroli oraz z 61% do 141% kontroli. Wpływ jonów miedzi(II) na zawartość barwników fotosyntetycznych jest zależny od zastosowanego stężenia. Dwunastodniowa ekspozycja kiełków rzodkiewki na jony Cu²⁺ nie wykazała istotnego wpływu na zawartość karotenoidów przy zastosowaniu stężenia 100 mg kg⁻¹ gleby natomiast wykazała istotne obniżenie zawartości dla stężenia 200 mg kg⁻¹ gleby [287]. Również w 30 dniowych roślinach rzodkiewki, lucerny i sałaty, zawartość chlorofilu malała wraz ze wzrostem stężenia jonów miedzi(II) i cynku(II) w zakresie od 0,1 do 1000 µM [319]. dane literaturowe wskazują, że zawartość barwników fotosyntetycznych Ponadto, w 7 dniowych kiełkach rzodkiewki rozwijających się z dodatkiem jonów Zn^{2+} (1 mM) była większa w porównaniu z kontrolą, natomiast zastosowanie wyższych stężeń (powyżej 5 mM) prowadziło do znacznego zmniejszenia zawartości barwników fotosyntetycznych, zarówno chlorofili, jak i karotenoidów [320]. Wyniki uzyskane w toku prowadzonych badań są tylko w niewielkim zakresie zbieżne z wynikami opublikowanymi wcześniej. Jest to spowodowane przede wszystkim brakiem danych dotyczących wpływu jonów metali na zawartość barwników fotosyntetycznych na tak wczesnym etapie wzrostu. Przedstawione wyniki prowadzonych badań są pierwszymi dostarczającymi informacji na temat wpływu jonów Cu²⁺, Mn²⁺ oraz Zn²⁺ na początkowy rozwój rzodkiewki – w trzy- i czterodniowych kiełkach.

4.6 Zmiany aktywności przeciwutleniającej i zawartości antyoksydantów, w tym związków fenolowych i flawonoidów, w kiełkach rozwijających się w różnych warunkach oświetlenia

Skutki toksyczności metali ciężkich prowadzą nie tylko do zaburzenia syntezy chlorofilu, zmian w procesach fotosyntezy i oddychania, ale także powodują nadmierną akumulację reaktywnych form tlenu (ROS) w roślinach, co skutkuje uszkodzeniami oksydacyjnymi [321]. Rośliny wykształciły różne mechanizmy usuwania reaktywnych form tlenu, w tym wytwarzanie metabolitów wtórnych wykazujących potencjał neutralizujący negatywne skutki ROS [322]. Na Wykresie 19. zestawiono średnie współczynniki aktywności przeciwutleniającej (A), zawartości antyoksydantów (B) oraz zawartości związków fenolowych (C). kiełków rzodkiewki rozwijających się w podłożu z dodatkiem wybranych jonów metali.

Średnia aktywność przeciwutleniająca (RSA) kiełków rzodkiewki wzrastających w podłożu z dodatkiem jonów metali wahała się od 61 do 74%. Najmniejszą wartość RSA odnotowano dla kiełków rozwijających się z dodatkiem jonów Zn^{2+} w 1 DAT (5 µM – 50,6%) oraz w 2 DAT (0,5 µM – 50,3%), natomiast największą dla jonów Cu^{2+} o stężeniu 50 µM w 2 DAT (81,3%) i 3 DAT (82,7%). Badania wykazały, że ekstrakty z kiełków rzodkiewki w 1 DAT (50 µM Mn²⁺) oraz 4 DAT (5 i 50 µM Mn²⁺; 50 µM Zn²⁺) wykazywały wyższą aktywność przeciwutleniającą o 10 – 15% w porównaniu do ekstraktów z układów kontrolnych. Jednak wyniki te nie były istotne statystycznie. Istotny wpływ na aktywność przeciwutleniającą wykazano jednak dla 0,5 µM Cu²⁺, Mn²⁺ i Zn²⁺ oraz 50 µM Zn²⁺ w 0 DAT; 5 µM Zn²⁺ w 1 DAT; 0,5 µM Cu²⁺, Mn²⁺ i Zn²⁺ oraz 5 µM Cu²⁺ w 2 DAT; 0,5 i 5 µM Cu²⁺ oraz 5 µM Mn²⁺ w 3 DAT, a także 0,5 – 50 µM Cu²⁺ w 4 DAT. W omawianych warunkach hodowli doszło do obniżenia aktywności przeciwutleniającej, a największe zmiany odnotowano w 2 DAT. Pomimo iż nie wykazano toksycznego wpływu badanych jonów metali na kiełkowanie nasion rzodkiewki, to już 4 godzinne namaczanie

w roztworach zawierających najniższe stężenie (0,5 µM) istotnie wpłynęło na zdolność zmiatania wolnych rodników. Warto zwrócić również uwagę, że negatywny wpływ jonów metali o wyższych stężeniach był zauważalny dopiero od 2 DAT. Jest to związane prawdopodobnie ze zmian sposobu transportowania, w początkowym w etapie kiełkowania łupina nasienna działa jako główna bariera ograniczająca szkodliwe działanie metali ciężkich, natomiast od 2 DAT, jony metali były pobierane bezpośrednio z podłoża hodowlanego przez wykształcone korzenie. Ponadto dane literaturowe wskazują, że aktywność przeciwutleniająca u roślin rozwijających się w warunkach stresu środowiskowego maleje w porównaniu do roślin rozwijających się w warunkach optymalnych [322]. Ciekawe wydaje się również obniżenie aktywności przeciwutleniającej w 1 DAT dla wszystkich badanych układów, łącznie z kontrolą. Zachodzące podczas kiełkowania procesy metaboliczne, prowadzą do powstawania reaktywnych form tlenu. Zwiększenie stężenie ROS w kiełkach rzodkiewki prowadzi natomiast do obniżenia aktywności przeciwutleniającej ekstraktów w teście z rodnikiem DPPH.



Wykres 19. Średni współczynnik aktywności przeciwutleniającej (A) oraz zawartości antyoksydantów (B) i związków fenolowych (C) w kiełkach rzodkiewki rozwijającej się z dodatkiem jonów metali. Wartości dla odpowiednich hodowli kontrolnych przyjęto w każdym przypadku jako 100%, "*" oznaczono różnice istotne statystycznie ($p \le 0,05$) w odniesieniu do kontroli.

Podobne zależności uzyskano w przypadku zawartości antyoksydantów. Zawartość antyoksydantów w rzodkiewce rozwijającej się w warunkach stresowych mieściła się w zakresie od 3,02 mg g⁻¹ s.m. (dla 50 μ M Zn²⁺ w 0 DAT) do 10,89 mg g⁻¹ s.m. (dla 0,5 μ M Zn^{2+} w 4 DAT). Średnia zawartość tych związków wzrastała w czasie i w kolejnych dniach rozwoju rzodkiewki wynosiła odpowiednio: 5,91 mg g⁻¹ s.m. (0 DAT); 5,26 mg g⁻¹ s.m. (1 DAT); 5,73 mg g⁻¹ s.m. (2 DAT); 6,71 mg g⁻¹ s.m. (3 DAT) oraz 7,00 mg g⁻¹ s.m. (4 DAT). Niewielki spadek zawartości antyoksydantów, podobnie jak aktywności RSA, odnotowano w 1 DAT dla wszystkich układów eksperymentalnych. Wyjątek stanowił układ, w którym do podłoża dodano jony cynku(II) (0,5; 5 i 50 µM). W tym przypadku odnotowano nieznaczny wzrost zawartości związków o aktywności przeciwutleniającej. Analizując uzyskane wyniki, można również zauważyć, że już 4-godzinne namaczanie w roztworach zawierających jony metali wpływa na zawartość antyoksydantów. Największe zmiany w zawartości antyoksydantów stwierdzono w kiełkach rzodkiewki rozwijających się z dodatkiem jonów miedzi w podłożu hodowlanym. W zależności od dnia wzrostu i zastosowanego stężenia zawartości te były o 20 – 45% niższe w porównaniu z kontrolą. Natomiast istotny statystycznie wpływ jonów manganu(II) stwierdzono jedynie w przypadku stężenia 0,5 µM w 1 DAT i 2 DAT oraz 5 µM w 3 DAT. W innych przypadkach, dodatek jonów Mn²⁺ powodował nieznaczne zwiększenie zawartości antyoksydantów o 12% (5 µM w 2 DAT i 50 µM w 4 DAT) lub zmniejszenie o 18% (50 µM w 3 DAT), jednak różnice te nie były istotne statystycznie. Podczas gdy, istotny negatywny wpływ jonów cynku(II) stwierdzono dla 0,5 i 5 µM (o 33%) oraz 50 µM (o 51%) w 0 DAT; 0,5 µM (o 32%) i 50 µM (o 35%) w 2 DAT; 5 µM (o 28%) w 3 DAT oraz 5 µM (o 24%) w 4 DAT. Warto zwrócić również uwagę, że w przypadku 0,5 µM Zn²⁺ w 4 DAT odnotowano zwiększenie zawartości antyoksydantów o 20%, jednak różnice te nie były istotne statystycznie.

Dane literaturowe wskazują na obniżenie zawartości antyoksydantów w roślinach w odpowiedzi na stres środowiskowy (w tym stres związany z metalami ciężkimi). Do głównych antyoksydantów chroniących komórki roślinne przed szkodliwym działaniem ROS, zalicza się glutation (GSH) i kwas askorbinowy (AsA), których działanie polega na tłumieniu wolnych rodników [278,323]. Dodatkowo GSH odgrywa zasadniczą rolę w wielu komórkowych procesach detoksykacji, pełniąc funkcję prekursora fitochelatyn – peptydów wiążących metale ciężkie. Po aktywacji i sprzęganiu z metalami, utworzone koniugaty transportowane są do wakuoli, chroniąc tym samym komórki przed szkodliwym działaniem wolnych jonów metali [324]. Ponadto, w połączeniu ze swoją utlenioną formą (GSSG), glutation utrzymuje równowagę redoks w substrukturach komórkowych [325].

Wzmożony udział GSH w różnych mechanizmach detoksykacji metali ciężkich skutkuje, przynajmniej przejściowo, zmniejszeniem jego zawartości w cytozolu prowadząc do zaburzenia stanu równowagi redoks [326]. Taki skutek zaobserwowano między innymi w przypadku arsenu(III), który istotnie obniżał zawartość GSH w korzeniach ryżu na skutek jego konwersji do fitochelatyn [327]. Ponadto GSH odpowiada za regenerację kwasu askorbinowego poprzez cykl glutationowo-askorbinianowy. Natomiast, ze względu na zdolność do oddawania elektronów, kwas askorbinowy może bezpośrednio redukować rodniki hydroksylowe i tlen singletowy oraz redukować H₂O₂ do wody poprzez reakcję peroksydazy askorbinianowej, jak również regenerować tokoferole chroniąc błony biologiczne [327]. Jednak wpływ metali na zawartość kwasu askorbinowego zależy od czasu trwania ekspozycji oraz części rośliny [328]. Jony miedzi(II) (5 – 100 µM) prowadziły do krótkoterminowego wzrostu zawartości AsA w rzodkiewniku pospolitym (Arabidopsis *thaliana*)[329]; jony cynku(II) (50 µM) spowodowały obniżenie zawartości kwasu askorbinowego w korzeniach oraz zwiększenie AsA w liściach 10-dniowych sadzonek fasoli zwyczajnej (*Phaseolus vulgaris*) [330]; natomiast jony manganu(II) (50 i 100 µM) przyczyniły się do obniżenia zawartości AsA w liściach 21-dniowych wspięgi wężowatej (*Vigna unquiculata*) [331]. Niestety, ze względu na brak informacji dotyczących wpływu testowanych jonów na ogólną zawartość antyoksydantów w kiełkach rzodkiewki, nie jest możliwe porównanie uzyskanych wyników z wartościami literaturowymi. Niemniej jednak, na podstawie przedstawionych danych, można stwierdzić, że odpowiedź roślin na obecność jonów metali w podłożu hodowlanym zależy od zastosowanego metalu. Przeprowadzone badania wskazuja, że kiełki rzodkiewki sa najbardziej wrażliwe na obecność jonów miedzi(II). Jony Zn²⁺ prowadząc do nadmiernego powstawania reaktywnych form tlenu, zaburzają równowagę redoks, w wyniku czego dochodzi do obniżenia całkowitej zawartości antyoksydantów w początkowych dniach rozwoju rzodkiewki. Jednak, wraz z czasem trwania hodowli, jony cynk wpływają na procesy metaboliczne, w wyniku których występuje tendencja do zwiększania zawartości związków antyoksydacyjnych. Natomiast dodatek jonów manganu powoduje fluktuacje w syntezie związków przeciwutleniających.

Pomimo iż, glutation i kwas askorbinowy stanowią główną pulę związków przeciwutleniających, do grupy nieenzymatycznych antyoksydantów licznie występujących w komórkach roślinnych zalicza się również związki fenolowe. Zawartość związków fenolowych w badanych próbkach mieściła się w zakresie 6,03 – 15,30 mg GAE g⁻¹ s.m., przy czym najmniejszą wartość oznaczono dla roślin traktowanych 50 μM Zn²⁺ w 2 DAT, a najwyższą w 4 DAT. Wpływ dodatku jonów metali po 4-godzinnym namaczaniu

119

odnotowano jedynie dla 0,5 μM i 5 μM Cu²⁺ oraz 0,5 μM Zn²⁺. Jednak tylko dodatek 5 μM roztworu jonów miedzi(II) przyczynił się do zwiększenia zawartości związków fenolowych. Natomiast dodatek 0,5 µM stężenia jonów cynku(II) spowodował obniżenie zawartości związków fenolowych o 21% względem kontroli. Podczas gdy, dodatek 0,5 µM Cu²⁺ przyczynił się do istotnego statystycznie obniżenia zawartości związków fenolowych w każdym dniu prowadzenia hodowli odpowiednio o: 7% w 0 DAT, 21% w 1 DAT, 18% w 2 DAT i 14% w 4 DAT. W przypadku 3 DAT zawartość ta była nieznacznie wyższa, jednak wynik ten nie był istotny statystycznie. Warto zwrócić uwagę, że niezależnie od zastosowanego stężenia oraz jonu metalu największy wpływ na zawartość związków fenolowych odnotowano w 2 DAT. Wyjątek stanowi 50 µM Cu²⁺ i 50 µM Mn²⁺, dla których różnice nie były istotne statystycznie oraz 5 µM Zn²⁺, który od 2 DAT nie wpływał na zawartość związków fenolowych w kiełkach rzodkiewki. Związki fenolowe, oprócz zdolności zmiatania wolnych rodników, podczas stresu wywołanego metalami ciężkimi działają jako chelatory metali [332]. Obniżenie średniego współczynnika zawartości związków fenolowych w 2 DAT może wynikać ze zwiększenia ilości utworzonych kompleksów związków fenolowych z jonami metali co było następstwem akumulacji jonów metali w komórkach roślinnych. Jednak dane literaturowe sugerują, że w warunkach stresu wywołanego metalami dochodzi do zwiększenia biosyntezy związków fenolowych. Taka odpowiedź roślin uzyskano między innymi w pszenicy poddanej działaniu Ni²⁺ [333], kukurydzy w odpowiedzi na Al³⁺ [334] oraz fasoli wystawionej na działanie Cd²⁺ [335]. Analizując przedstawione wyniki można stwierdzić, że do zwiększenia biosyntezy związków fenolowych w 1 DAT doprowadziła obecność w podłożu jonów manganu(II). Jednakże już w kolejnym dniu rozwoju rzodkiewki, średni współczynnik zawartości związków fenolowych uległ znacznemu obniżeniu, osiągając w 3 DAT (dla 5 µM) 78% kontroli. Taki wynik wskazuje na zniwelowanie szkodliwego wpływu jonów manganu(II) poprzez chelatację metali związkami fenolowymi. Zawartość związków fenolowych w kiełkach rzodkiewki wzrastała również wraz z czasem trwania hodowli w przypadku dodatku do podłoża hodowlanego 50 µM roztworu zawierającego jony Zn²⁺. Jednak dopiero w 4 DAT wzrost ten był istotnie wyższy (o 13%). Natomiast najmniejszy wpływ wywarły jony Cu²⁺ (50 μM), gdzie zmianę zawartości – istotne statystycznie obniżenie zawartości związków fenolowych o 10% – uzyskano dopiero w 4 DAT. Wynik ten jest zgodny danymi literaturowymi. Opublikowane wcześniej wyniki wskazują, że zawartość fenoli była istotnie niższa (o 32%) w 7 dniowych kiełkach rzodkiewki traktowanych 0,2 mM roztworem Cu²⁺ [336]. Ponadto, uzyskany wynik sugeruje, że związki fenolowe nie biorą udziału w detoksykacji jonów

miedzi(II), wprowadzonych do podłoża hodowlanego w wysokich stężeniach (50 μM), na początkowym etapie rozwoju rzodkiewki. Rolę tą przejmują prawdopodobnie inne antyoksydanty, między innymi wspomniany wcześniej glutation lub pozostałe związki niwelujące toksyczny wpływ metali, np. osmoregulatory. Wyniki uzyskane w toku prowadzonych badań dostarczają informacji na temat wpływu jonów Cu²⁺, Mn²⁺ oraz Zn²⁺ na wybrane aspekty systemu antyoksydacyjnego na początkowym etapie wzrostu rzodkiewki – kiełkowaniu nasion i rozwoju kiełków.

4.7 Podsumowanie

Macierzowa analiza skupień hierarchicznych (MHCA), przedstawiona w postaci mapy cieplnej, podsumowuje wpływ jonów metali na wybrane aspekty metabolizmu określające kondycję roślin (Rysunek 33.). Hierarchiczną analizę skupień i grupowanie wybranych czynników stresowych na mapie cieplnej przeprowadzono w programie PermuMatrix, korzystając z algorytmu wykorzystującego miarę odległości euklidesowej i metodę całkowitego połączenia. Wszystkie zmienne zostały znormalizowane względem kontroli. Kolorem jasnozielonym oznaczono markery biochemiczne, które uległy zmniejszeniu na skutek wpływu badanych czynników. Natomiast kolor jasnoczerwony zastosowano dla tych markerów, które uległy zwiększeniu. W przypadku braku zmian, pola mapy zostały zaznaczone na czarno.

Z analizy dendrogramu wynika, że odpowiedzi roślin na testowane stężenia jonów miedzi(II), manganu(II) i cynku(II) w poszczególnych dniach hodowli można podzielić na pięć klastrów. Pierwszy klaster (C1), obejmujący jedynie jony Zn²⁺, charakteryzuje się przede wszystkim zwiększeniem zawartości ATP (niezależnie od stężenia jonów i dnia hodowli) oraz obniżeniem zawartości związków o aktywności przeciwutleniającej – antyoksydantów, związków fenolowych i karotenoidów. Do drugiego klastra, zakwalifikowane zostały jony cynku i miedzi, które istotnie obniżały zawartość antvoksydantów oraz powodowały zwiekszenie zawartości AMP (5 µM Zn²⁺ w 3 i 4 DAT), 50 μM Zn²⁺ w 1, 3 i 4 DAT, 0,5 μM Cu²⁺ w 0 DAT, 5 μM Cu²⁺ w 0 i 2 DAT oraz 50 μM Cu²⁺ w 2 DAT). Klaster trzeci (C3), do którego w większości zostały zakwalifikowane jony miedzi(II), charakteryzował się zwiększoną aktywnością enzymatyczną fitaz oraz podobnie jak w przypadku C2 obniżoną zawartością antyoksydantów. Ponadto, do tego klastra przypisane zostały 0,5 μ M Mn²⁺ (0 i 2 DAT), 0,5 μ M Zn²⁺ (1 DAT) oraz 5 μ M Zn²⁺ (1 DAT).

121



Rysunek 33. MHCA oznaczanych markerów biochemicznych. Eksperymentalne warunki hodowli są wskazane po prawej stronie. Kolorowe słupki (skupiska C1–C3) po prawej stronie mapy cieplnej oznaczają odrębne główne gałęzie drzewa skupiającego, grupującego parametry biochemiczne o podobnych wzorach ekspresji na czynniki stresowe. Skala kolorów wskazuje wielkość różnic między wartościami parametrów biochemicznych kiełków rzodkiewki rozwijającej się w warunkach kontrolnych i eksperymentalnych (jasnoczerwony oznacza wartość dodatnią, jasnozielony oznacza wartość ujemną).

Największy klaster stanowił klaster 4 (C4), do którego zostały zakwalifikowane jedynie jony manganu(II). Wyjątek stanowiły jony miedzi(II) o stężeniu 0,5 µM z 4 DAT. W tym klastrze, badane warunki wzrostu powodowały znaczne obniżenie zawartości Pi i nukleotydów adeninowych w porównaniu do warunków kontrolnych, a także doprowadziły do nieznacznego obniżenia aktywność fitaz, pomimo nieznacznego zwiększenia całkowitej zawartości białka. Natomiast, klaster 5 obejmuje przede wszystkim pierwsze dni hodowli z dodatkiem jonów miedzi(II), które przyczyniły się do zwiększenia zawartości nukleotydów adeninowych i aktywności fitaz, przy jednoczesnym braku wpływu na zawartość wolnych jonów fosforanowych.

Analizując mapę ciepła można również zauważyć, że dwuwartościowe jony miedzi, cynku i manganu wykazują odmienne działanie na wczesnym etapie rozwoju rzodkiewki. Zmiany wybranych parametrów biochemicznych indukowane dodatkiem jonów miedzi(II) i cynku(II) w pewnym zakresie mają zbliżony charakter. Jony te przyczyniają się przede wszystkim do obniżenia zawartości związków o aktywności przeciwutleniającej oraz zwiększenia zawartości nukleotydów adeninowych. Jednak, o ile w przypadku jonów Zn²⁺ adeninowych można zauważyć zwiększoną syntezę pochodnych niezależnie od zastosowanego stężania oraz czasu trwania eksperymentu, tak jony Cu²⁺ powodują zwiększoną syntezę nukleotydów adeninowych jedynie w pierwszych dwóch dniach trwania eksperymentu. Co ciekawe, zupełnie inny wpływ na metabolizm kiełków rzodkiewki odnotowano dla manganu. U roślin traktowanych jonami Mn²⁺ dochodziło do istotnego zaburzenia gospodarki fosforowej – obniżeniu ulegała nie tylko zawartość nukleotydów adeninowych, mająca bezpośredni wpływ na status energetyczny, ale także wolnych jonów fosforanowych. Ponadto jony Mn²⁺ przyczyniły się do zaburzenia aktywności enzymatycznej fitaz.

5 Wpływ preparatów fungicydowych na kiełkowanie i kondycję siewek ogórka

Ogórek, należący do rodziny dyniowatych, jest trzecią najczęściej uprawianą rośliną owocowo-warzywną na świecie. Światowa produkcja ogórków w latach 2019 i 2020 wyniosła odpowiednio ponad 87 i 91 mln ton [337]. Na metabolizm ogórka, a co za tym idzie na jakość i ilość plonów, wpływają różne czynniki zewnętrzne, takie jak właściwości gleby [338,339], zasolenie [340] oraz stres wodny [341]. Jednym z najniebezpieczniejszych czynników środowiskowych powodującym straty ekonomiczne są infekcje grzybicze wywołane przez dwa rodzaje mączniaka – mączniak prawdziwy (głównie *Podosphaera fusca* [342]) i mączniak rzekomy (lęgniowiec *Pseudoperonospora cubensis* [343]). Szkodniki te przenoszone są głównie przez wiatr, ulewny deszcz [344] lub owady; ponadto niektóre doniesienia wskazują, że *P. cubensis* może być przenoszony przez zakażone nasiona [179]. Uszkodzenie liścieni i liści przez mączniaka rzekomego lub prawdziwego prowadzi do zmian metabolicznych, powodując przede wszystkim zakłócenia w procesach takich jak oddychanie [343], transpiracja i fotosynteza w wyniku których dochodzi do zamierania liści [345].

Leczenie chorób pleśniowych polega na stosowaniu środków ochrony roślin na bazie mykopasożytów [346] lub częściej stosowanych chemicznych środków ochrony roślin. Większość popularnych środków grzybobójczych przeciwko mączniakowi prawdziwemu i rzekomemu opiera się na związkach chemicznych, takich jak strobiluryny (np. azoksystrobina), fenyloamidy (metalaksyl), benzamidy (fluopikolid), amidy kwasów karboksylowych (dimetomorf), karbaminiany (propamokarb), triazole (difenokonazol) i oksym cyjanoacetamidu (cymoksanil) [347].

Niektóre dane wskazują, że wśród tych pestycydów istnieją grupy związków, które mają wpływ nie tylko na rozwój grzybów chorobotwórczych, ale także na metabolizm roślin. Negatywne lub korzystne zmiany fizjologiczne i biochemiczne w roślinach zależą od budowy chemicznej zastosowanych środków grzybobójczych. Zmiany te są w większości skorelowane z aktywnością enzymów, a nawet ekspresją genów i prowadzą do zakłócenia metabolizmu węgla lub azotu oraz wydajności fotosyntezy, wpływając tym samym na wzrost i rozwój roślin [348,349]. Jednym z przykładów jest propamokarb, który powoduje wzrost aktywności enzymów detoksykacyjnych (S-transferaza glutationowa (E.C. 2.5.1.18), reduktaza glutationowa (E.C. 1.6.4.2)) [350,351], aktywację enzymów ochronnych (peroksydaza, dysmutaza ponadtlenkowa (E.C. 1.15.1.1), katalaza) [352] i inne mechanizmy obronne (np. produkcja ligniny) [353]. Fungicydy triazolowe i strobilurynowe również wykazują

124

podobne działanie; jednakże oprócz zwiekszania aktywności enzymów antyoksydacyjnych (takich jak katalaza, dysmutaza ponadtlenkowa i peroksydaza askorbinianowa) [354], substancje te przejściowo zwiększają zawartość kwasu abscysynowego i zmniejszają produkcję etylenu. Ponadto dowiedziono, że substancje te wpływają także na stan hormonalny roślin. Fungicydy strobilurynowe zwiększają syntezę cytokinin i auksyny [355,356], natomiast triazole hamują syntezę giberelin, zapewniając w ten sposób lepszą równowagę hormonalną. Wpływ środków grzybobójczych na gospodarkę hormonalną może mieć odzwierciedlenie w morfologii roślin, np. w postaci ograniczenia wydłużania pedów i stymulacji ukorzeniania [357,358]. Rośliny traktowane triazolami wykazywały większą zawartość pigmentów fotosyntetycznych, lepszy wzrost roślin i wyższą biomasę wielu roślin okopowych [358]. Pozytywny wpływ na fotosyntezę wykazano także dla fungicydów strobilurynowych. Ich działanie opierało się na zwiększeniu szybkości fotosyntezy netto poprzez czasowe oddziaływanie w transpiracji mitochondriów, a także poprzez zwiększenie zawartości chlorofilu, powierzchni zielonych liści i opóźnionego starzenia się liści [359]. Pomimo dużej ilości informacji na temat działania poszczególnych substancji czynnych, w dalszym ciągu brakuje wiarygodnych informacji na temat działania dostępnych na rynku preparatów pestycydowych, które zawierają więcej niż jedną substancję czynną. Ponadto prowadzone badania nie dostarczają danych dotyczących wpływu preparatów fungicydowych na metabolizm fosforu i status energetyczny w roślinach poddanych działaniu związków o aktywności przeciwgrzybowej. Celem tej części pracy było zbadanie wpływu zastosowania dwóch dostępnych na rynku preparatów grzybobójczych o działaniu ogólnoustrojowym, Scorpion 325 SC i Magnicur Finito 687,5 SC, na kiełkowanie nasion ogórka oraz wybrane aspekty fizjologii roślin. Do sprawdzenia działania środków grzybobójczych na wczesnym etapie rozwoju roślin, kiedy zmiany metaboliczne zachodzą najbardziej dynamicznie, zastosowano dwie metody: przedsiewny zabieg zaprawiania nasion oraz oprysk liści siewek ogórka.

5.1 Wariant 1 – przedsiewne zaprawianie nasion ogórka

Niektóre środki grzybobójcze, takie jak difenokonazol (substancje czynne SCO), działają nie tylko systemicznie na liście, ale są także stosowane jako środki do zaprawiania nasion [360]. Dodatkowo dane literaturowe wskazują, że azoksystrobina jest stabilna, a jej pozostałości znaleziono w różnych matrycach [361]. Ponadto stosowanie tych chemikaliów prowadzi do wzrostu długoterminowych pozostałości w żywności i środowisku [362], dlatego stanowią zagrożenie dla zdrowia ludzi i organizmów niebędących przedmiotem zwalczania [360]. Ponieważ w nasionach mogą osadzać się pozostałości środków

grzybobójczych, a przez nasiona mogą być przenoszone choroby mączniakowe, zbadano przedsiewne zaprawianie nasion – pierwszej kolejności na kiełkujące nasiona aplikowano środki grzybobójcze.

5.1.1 Profile fosforowe kiełkujących nasion ogórka rozwijających się w podłożu z dodatkiem preparatów fungicydowych

W celu scharakteryzowania wszystkich form P w ekstraktach (35% HClO₄; 3 x 30 min; UAE) z kiełkujących nasion ogórka wykorzystano metodę ³¹P NMR. Grupy fosforu zdefiniowano na podstawie charakterystycznych przesunięć chemicznych przy pH zasadowym [288]. Dla wszystkich analizowanych próbek stwierdzono obecność sygnałów na widmach w zakresie przesunięć chemicznych od -0,2 do 7,0 ppm. Poszczególne grupy pasm, odpowiadają związkom należącym do: P1 – polifosforany/difosforany [(-23) – (-3,5) ppm], P2 – inne fosfodiestry [(-2) – 1,5 ppm], P3 – fosfolipidy [1,5 – 3 ppm]; P4 – fosfomonoestry [3,0 – 5,5 ppm]; P5 – ortofosforany [5,5 – 7,0 ppm] oraz P6 – fosfoniany [15 – 20 ppm].

Tabela 12. przedstawia względne ilości (%) form fosforu w ekstraktach kiełkujących nasion ogórka w 0, 2 i 4 DAT. Największy udział procentowy stanowią fosfomonoestry, których zawartość wahała się od 49,7% do 75,3%. Najniższą wartość zanotowano w 4 DAT dla Magnicu Finito 687,5 SC (MAG), natomiast najwyższą dla kontroli w 2 DAT. Udział ortofosforanów wahał się w granicach 24,5 – 49,8% i był skorelowany z udziałem fosfomonoestrów – największą wartość odnotowano dla MAG w 4 DAT, a najmniejszą dla kontroli w 2 DAT. Zawartość fosfodiestrów, w tym fosfolipidów, mieściła się w zakresie od 0,1% do 1,4%, a odnotowane różnice miały jedynie charakter ilościowy. W próbkach traktowanych preparatem Scorpion 325 SC (SCO) udziały poszczególnych grup P pozostały niezmienne, nie odnotowano różnic pomiędzy poszczególnymi dniami hodowli. Natomiast w przypadku MAG w pierwszych dniach rozwoju nastąpił wzrost ilości ortofosforanów i spadek ilości fosfomonoestrów, których udział procentowy w 4 DAT wyrównał się osiągając odpowiednio wartości 49,8% (P5) i 49,7% (P4). W przypadku kontroli zawartość ortofosforanów początkowo spadła z 31,5% (0 DAT) do 24,5% (2 DAT), a następnie wzrosła do 45,2% (4 DAT).

Tabela 12. Względne ilości (%) głównych form fosforu wykrytych w zasadowych ekstraktach kiełkujących nasion ogórka.

DAT	Warunki wzrostu	P1 (%)	P2 (%)	P3 (%)	P4 (%)	P5 (%)	P6 (%)
0	Kontrola	-	0,4	0,1	68,0	31,5	_
	Scorpion 235 SC	_	0,2	0,2	71,6	28,0	_

DAT	Warunki wzrostu	P1 (%)	P2 (%)	РЗ (%)	P4 (%)	Р5 (%)	Р6 (%)
	Magnicur Finito 687,5 SC	-	0,5	0,1	58,6	40,7	-
	Kontrola	-	_	0,1	75,3	24,5	-
2	Scorpion 235 SC	-	0,2	0,2	74,2	25,4	-
	Magnicur Finito 687,5 SC	_	1,0	0,4	62,1	36,5	-
	Kontrola	_	_	0,4	54,4	45,2	_
4	Scorpion 235 SC	_	_	0,4	71,6	28,0	-
	Magnicur Finito 687,5 SC	_	0,3	0,2	49,7	49,8	_

Zakres przesunięć chemicznych (ppm) poszczególnych form fosforu zarejestrowanych na widmach ³¹P NMR ekstraktu badanych próbek o odczynie zasadowym: P1 – polifosforany/difosforany ((-23) – (-3,5) ppm); P2 – inne fosfodiestry ((-2) – 1,5 ppm); P3 – fosfolipidy (1,5 – 3 ppm); P4 – fosfomonoestry (3,0 – 5,5 ppm); P5 – ortofosforany (5,5 – 7,0 ppm); P6 – fosfoniany (15 – 20 ppm); "–" – nie oznaczono. Błąd standardowy nie przekraczał 10% wartości podanych w tabeli.

Na podstawie danych przedstawionych graficznie w postaci zestawionych widm ³¹P NMR (Rysunek 34.), można stwierdzić, że profile fosforowe uległy zmianie w trakcie kiełkowania nasion ogórka. Największe różnice zaobserwowano w liczbie sygnałów znajdujących się w zakresie 4,4 – 5,0 ppm, co odpowiada sygnałom pochodzącym od fosfomonoestrów. Różnice te prawdopodobnie wynikają z dynamicznie postępujących przemian biochemicznych – w szczególności procesu fosforylacji związków biorących udział w szlakach metabolicznych.



Rysunek 34. Znormalizowane widma ³¹P NMR ekstraktów otrzymanych z kiełkujących nasion zaprawionych Magnicurem Finito 687,5 w 0 (A), 2 (B) i 4 (C) DAT. W prawej górnej części panelu zaprezentowano powiększoną część widma, aby pokazać subtelne różnice w jego strukturze. Obszar zaznaczony kolorem obejmuje sygnały odzwierciedlające najważniejsze zmiany.

5.1.2 Wpływ środków grzybobójczych na zawartość Pi, kwasu fitynowego, aktywność fitazy oraz zawartość białka w ekstraktach z kiełkujących nasion ogórka

W celu sprawdzenia wpływu wybranych środków grzybobójczych na proces kiełkowania określono aktywność enzymatyczną kwaśnej fitazy oraz wynikające z jej aktywności zmiany w zawartości kwasu fitynowego i Pi oraz zawartości białka.

Zawartość fosforu nieorganicznego w kiełkujących nasionach ogórka do 4 DAT, utrzymywała się względnie na stałym poziomie i oscylowała w zakresie od 1 do 2 mg g⁻¹ s.m.. W 7 DAT odnotowano dwukrotny wzrost zawartości Pi dla SCO oraz trzykrotny wzrost dla MAG. U kiełkujących nasion ogórka zaprawianych SCO zaobserwowano większą zawartość Pi (o 22 %) w 3 DAT w odniesieniu do kontroli, jednak różnice te nie były istotne

statystycznie (Wykres 20. A). Natomiast zaprawianie MAG spowodowało istotne zmniejszenie zawartości Pi w 3 DAT o 39 %. Istotne różnice statystyczne odnotowano także dla SCO w 7 DAT – zaprawianie nasion SCO spowodowało zmniejszenie zawartości Pi o 36 %.



Wykres 20. Średni współczynnik aktywności fitaz (A) oraz zawartości Pi (B), kwasu fitynowego (C) i białek (D) w kiełkujących nasionach ogórka (do 2 DAT) i kiełkach ogórka (3 – 7 DAT). Przedstawione dane dotyczą przedsiewnego zaprawiania nasion środkami grzybobójczymi. Wartości dla hodowli kontrolnej przyjęto jako 100%, "*" oznaczono różnice istotne statystycznie ($p \le 0,05$) w odniesieniu do kontroli.

kwasu Zawartość fitynowego w badanym materiale wahała się od 3,58 do 5,46 mg g⁻¹ s.m.. Najniższą wartość wyznaczono dla MAG w dniu 7 DAT, natomiast najwyższą dla kontroli w dniu 1 DAT. Zawartość kwasu fitynowego w czasie kiełkowania nasion ogórka zmniejszył się o około 17% dla kontroli, o 14% dla SCO i o 26% dla MAG w 7 DAT w porównaniu do 0 DAT (Wykres 20. B). Dane literaturowe wskazują, że w trakcie kiełkowania zawartość kwasu fitynowego w sorgo zmniejsza się o 25 - 35%, a wartości te zależą od odmiany [186]. Zastosowane preparaty nie spowodowały istotnych statystycznie zmian w zawartości kwasu fitynowego w czasie prowadzenia eksperymentu. Wyjątek stanowił MAG, który przyczynił się do zmniejszenia zawartości kwasu fitynowego w kiełkujących nasionach ogórka w 1 DAT (97% kontroli) i 7 DAT (87% kontroli).

Stwierdzono, że zastosowane preparaty fungicydowe doprowadziły do zaburzenia aktywności enzymatycznej fitaz (Wykres 20. C). Aktywność enzymatyczna fitaz w nasionach

ogórka rozwijającego się w warunkach kontrolnych zmniejszyła się po 4 DAT, podczas gdy aktywność badanego enzymu w kiełkujących nasionach ogórka traktowanych preparatami fungicydowymi wzrastała w czasie prowadzenia hodowli osiągając maksymalną wartość w 7 DAT dla SCO (285,5 \pm 18,9 mU g⁻¹ s.m.) i MAG (184,9 \pm 19,2 mU g⁻¹ s.m.). Jednakże, w 4 DAT dla SCO odnotowano spadek aktywności o 91 % względem 3 DAT. Ponadto, SCO doprowadziło do istotnego zmniejszenia aktywności enzymatycznej w 4 DAT o 62% w odniesieniu do kontroli oraz istotnego zwiększenia aktywności fitaz odpowiednio o 27% (0 DAT), 71% (1 DAT), 66% (2 DAT) i 170% (7 DAT) względem kontroli. Różnice istotne statystycznie w aktywności enzymatycznej fitaz kiełkujących nasion ogórka zaprawianych MAG odnotowano w 2 DAT(168% kontroli), 3 DAT (132% kontroli) oraz 7 DAT (181% kontroli). Przedstawione wyniki mogą wskazywać na korzystny wpływ SCO i MAG na aktywność fitaz poprzez przedłużanie ich aktywności enzymatycznej. Jednakże tendencja zmian zawartości kwasu fitynowego i Pi nie odpowiada zmianom aktywności fitaz. Może to wynikać z faktu, że fitazy obecne w tkankach roślinnych zaliczane są głównie do kwaśnych fosfataz histydynowych (HAP) [44]. Dane wskazują, że roślinne HAP wykazują szeroką specyficzność substratową i mogą katalizować nie tylko defosforylację kwasu fitynowego, ale także hydrolizę innych estrów fosforanowych, takich jak fruktozo-6-fosforan, B-glicerofosforan, Na-pirofosforan i adenylany (ATP, AMP) [45]. Obecnie nie ma jednak informacji na temat specyficzności substratowej fitaz izolowanych z kiełkujących nasion ogórka.

Dodatkowo, zaobserwowany wzrost aktywności badanego enzymu mógł być powiązany ze wzrostem zawartości białka w czasie kiełkowania nasion ogórka. Średnia zawartość białka w poszczególnych dniach rozwoju mieściła się w zakresie 7,15 – 13,07 mg g⁻¹ s.m.. Najniższą zawartość białka (6,28 ± 0,30 mg g⁻¹ s.m.) oznaczono w 0 DAT dla MAG, natomiast najwyższą (13,55 ± 0,48 mg g⁻¹ s.m.) w 7 DAT dla MAG. Na Wykresie 20. D przedstawiono zmiany średniego współczynnika zawartości białek w czasie prowadzenia eksperymentu. Istotnie niższą zawartość białek (78% i 82% kontroli) stwierdzono odpowiednio dla MAG w 0 DAT i SCO w 4 DAT. Natomiast istotny statystycznie wzrost zawartości białek określono dla MAG w 3 DAT (120% kontroli) i 7 DAT (109% kontroli).

5.1.3 Wpływ preparatów fungicydowych na zmiany zawartości nukleotydów adeninowych i wartości parametru AEC w kiełkujących nasionach ogórka

Na Wykresie 21. przedstawiono wpływ środków grzybobójczych stosowanych jako zaprawy nasienne na metabolizm kiełkujących nasion ogórka. Zawartość nukleotydów adeninowych wzrastała w czasie prowadzenia eksperymentu. Największy przyrost zawartości odnotowano dla ADP, natomiast w przypadku AMP i ATP wzrost ten był bardziej statyczny. Średnia zawartość AMP w poszczególnych dniach hodowli wynosiła: 19,39 µg g⁻¹ s.m. (0 DAT), 26,94 µg g⁻¹ s.m. (1 DAT), 38,23 µg g⁻¹ s.m. (2 DAT), 46,64 µg g⁻¹ s.m. (3 DAT), 46,28 µg g⁻¹ s.m. (4 DAT) i 92,41 µg g⁻¹ s.m. (7 DAT). Zarówno najmniejszą zawartość (19,10 \pm 2,17 µg g⁻¹ s.m.), jak i największą (104,38 \pm 9,37 µg g⁻¹ s.m.) oznaczono w kiełkujących nasionach ogórka zaprawianych MAG. Zastosowanie SCO jako zaprawy nasiennej doprowadziło do istotnie statystycznych zmian w zawartości adenozyno-5'-monofosforanu (Wykres 21. A), powodując wzrost jego zawartości w 1 DAT o 24% oraz zmniejszenie w 3, 4 i 7 DAT odpowiednio o 43%, 25% i 20% względem kontroli.

Spośród oznaczanych nukleotydów adeninowych dominującą formą był adenozyno-5'difosforan, którego średnia zawartość w kolejnych dniach eksperymentu wynosiła odpowiednio: 146,91 µg g⁻¹ s.m. (0 DAT), 153,29 µg g⁻¹ s.m. (1 DAT), 192,85 µg g⁻¹ s.m. (2 DAT), 182,94 µg g⁻¹ s.m. (3 DAT), 274,94 µg g⁻¹ s.m. (4 DAT) i 502,00 µg g⁻¹ s.m. (7 DAT). Najwyższą zawartość (590,72 ± 15,87 µg g⁻¹ s.m.) oznaczono w nasionach traktowanych MAG w 7 DAT, natomiast najniższą w nasionach traktowanych SCO w 0 DAT (141,69 ± 14,26 µg g⁻¹ s.m.) oraz 3 DAT (141,75 ± 13,57 µg g⁻¹ s.m.). Substancje aktywne zawarte w SCO doprowadziły do istotnego obniżenia zawartości ADP (Wykres 21. B) w 3 DAT (55% kontroli), 4 DAT (73% kontroli) i 7 DAT (52% kontroli). Natomiast zastosowanie preparatu MAG przyczyniło się do istotnego zwiększenia zawartości ADP o 34% w 2 DAT oraz obniżenia zawartości ADP o 40% w 3 DAT względem kontroli.



Wykres 21. Średni współczynnik zawartości AMP (A), ADP (B), ATP (C) oraz wartości parametru AEC (D) w kiełkujących nasionach ogórka (do 2 DAT) i kiełkach ogórka (3 – 7 DAT). Przedstawione dane dotyczą przedsiewnego zaprawiania nasion środkami grzybobójczymi. Wartości dla hodowli kontrolnej przyjęto jako 100%, "*" oznaczono różnice istotne statystycznie ($p \le 0,05$) w odniesieniu do kontroli.

Podobne zależności jak w przypadku AMP odnotowano dla ATP, którego średnia zawartość w czasie prowadzenia eksperymentu wynosiła: 44,00 µg g⁻¹ s.m. (0 DAT), 58,05 µg g⁻¹ s.m. (1 DAT), 70,86 µg g⁻¹ s.m. (2 DAT), 59,88 µg g⁻¹ s.m. (3 DAT), 81,68 µg g⁻¹ s.m. (4 DAT) i 47,78 µg g⁻¹ s.m. (7 DAT). Przy czym najniższą zawartość (25,77 ± 4,29 µg g⁻¹ s.m.) oznaczono w 0 DAT u roślin traktowanych SCO, a najwyższą (95,48 ± 7,78 µg g⁻¹ s.m.) w 4 DAT u roślin traktowanych MAG. Podobnie jak w przypadku AMP i ADP, zaprawianie nasion preparatem Scorpion 325 SC spowodowało istotne obniżenie zawartości adenozyno-5'-trifosforanu (Wykres 21. C) o 43% (0 DAT), 7% (1 DAT), 41% (3 DAT), 30% (4 DAT) i 21% (7 DAT). Ponadto zawartość ATP istotnie wzrosła (o 36 %) w 0 DAT oraz zmalała (o 43%) w 3 DAT u roślin traktowanych MAG.

Wartości parametru AEC (Wykres 21. D) mieściły się w przedziale od 0,46 do 0,58, co sugeruje, że dominowały procesy anaboliczne. Jednocześnie wartości nie ulegały znacznym zmianom w czasie i utrzymywały się na poziomie 0,53 \pm 0,02 dla SCO i 0,56 \pm 0,01 dla MAG. W przypadku SCO w 7 DAT odnotowano spadek wartości parametru AEC do 0,49 \pm 0,01, natomiast w przypadku MAG wartość parametru AEC ulega wahaniom w 3 DAT (0,49 \pm 0,05) oraz w 7 DAT (0,46 \pm 0,00). Różnice istotne statystycznie odnotowane

dla SCO w 1, 2 i 7 DAT świadczą o niekorzystnym wpływie zaprawiania nasion preparatami zawierającymi w swoim składzie azoksystrobinę i difenokonazol.

Dane literaturowe wskazują, że zawartość ATP znacząco wzrasta podczas pęcznienia nasion [363], jednak zależność ta nie została zaobserwowana dla uzyskanych wyników. Może być to związane z różnicami gatunkowymi, dla których przemiany metaboliczne zachodzą na różne sposoby. Ponadto największą zawartością spośród oznaczanych nukleotydów charakteryzował się ADP, co wskazuje na liczne zmiany metaboliczne z udziałem ATP, a wartość parametru AEC powyżej 0,50 sugeruje, że procesy dominują procesy anaboliczne [364], co potwierdza wcześniej sformułowany wniosek. Spadek wartości parametru AEC po 4 DAT jest zbieżny z danymi literaturowymi [365]. W procesie kiełkowania, gdy ziarno pęcznieje i aktywują się procesy metaboliczne, dochodzi do rozkładu materiału rezerwowego i syntezy wielu zwiazków budulcowych ścian komórkowych, DNA czy białek [366]. Malejąca wartość parametru AEC dodatkowo wskazuje, że zmienia się stosunek udziału procesów anabolicznych i katabolicznych. Związane jest to z faktem, że w kiełkujących nasionach początkowo dominują procesy oddychania, natomiast w momencie pojawienia się liścieni kiełki rozpoczynają fotosyntezę. Ponadto przedstawione wyniki badań wskazują, że działanie środków grzybobójczych wpływa nie tylko na patogeny, ale może również prowadzić do zaburzeń metabolicznych u roślin, co objawia się przede wszystkim w obniżeniu zawartości nukleotydów adeninowych. Taki efekt może być dodatkowo spowodowany szeroką specyficzność substratowa fitaz. Niestety obecnie nie ma szczegółowych informacji na temat specyficzności substratowej fitaz izolowanych z kiełkujących nasion ogórka.

5.1.4 Wpływ środków grzybobójczych na dynamikę kiełkowania nasion ogórka

Profil wzrostu (Wykres 22.) określono jako procent wykiełkowanych nasion do 7 DAT. Korzeń zarodkowy był zauważalny już od 2 DAT, a największy odsetek wykiełkowanych nasion zaobserwowano dla MAG na poziomie 52,4%, najniższy zaś dla SCO na poziomie 39,4%. Procent wykiełkowanych nasion osiągnął wartość maksymalną w 4 DAT dla MAG. Natomiast SCO minimalnie spowolniło proces kiełkowania, ale ustabilizowało się na poziomie 7 DAT.

133



Wykres 22. Dynamika kiełkowania nasion rzodkiewki traktowanych badanymi fungicydami wyrażona w procentach jako stosunek całkowitej liczby badanych nasion.

Największe, ale nieistotne statystycznie różnice zaobserwowano w 3 DAT, w którym kontrola wykiełkowała na poziomie 86,9 ± 4,7%, a SCO na poziomie 70,9 ± 7,4%. Ponadto spowolniony został także rozwój kiełkujących nasion ogórka traktowanych SCO, dla których zaobserwowano różnice morfologiczne w postaci ograniczenia wzrostu łodygi, a w 7 DAT stwierdzono mniejszą liczbę kiełkujących nasion z zielonymi liścieniami w porównaniu z roślinami rozwijającymi się w warunkach kontrolnych i traktowanych MAG. Dane literaturowe wskazują, że azoksystrobina i difenokonazol przejściowo zwiększają zawartość kwasu abscysynowego (ABA) [356,358,367], który negatywnie wpływa na kiełkowanie nasion [368–370]. Wysoki poziom ABA hamuje proces kiełkowania i elongację korzeni. Efekty te są jednak przejściowe i odsetek kiełkujących nasion w 7 DAT osiąga wartość porównywalną z kontrolą.

5.2 Wariant 2 – aplikacja dolistna

W drugim wariancie eksperymentu postanowiono sprawdzić wpływ standardowego użycia preparatów fungicydowych w formie oprysku na rozwój siewek ogórka. Rośliny na tym etapie wzrostu, u których rozwinęły się już pierwsze liście prawdziwe, prowadzą proces fotosyntezy, w wyniku którego mogą się utrzymać niezależnie od pożywienia zmagazynowanego w nasionach.

5.2.1 Profile fosforowe nadziemnych części siewek ogórka traktowanych preparatami grzybobójczymi

W celu scharakteryzowania wszystkich form P w ekstraktach (35% HClO₄; 3 x 30 min; UAE) z nadziemnych części siewek ogórka wykorzystano metodę ³¹P NMR. Grupy fosforu zdefiniowano na podstawie charakterystycznych przesunięć chemicznych przy pH

zasadowym [288]. Dla wszystkich analizowanych próbek zaobserwowano sygnały na widmach obecne w zakresie przesunięć chemicznych od -0,2 do 7,0 ppm, które odpowiadają pasmom pochodzącym od: P1 – polifosforany/difosforany [(-23) – (-3,5) ppm], P2 – inne fosfodiestry [(-2) – 1,5 ppm], P3 – fosfolipidy [1,5 – 3 ppm]; P4 – fosfomonoestry [3,0 – 5,5 ppm]; P5 – ortofosforany [5,5 – 7,0 ppm] oraz P6 – fosfoniany [15 – 20 ppm].

Tabela 13. przedstawia względne ilości (%) form fosforu w siewkach ogórka w 0, 2 i 4 DAT. Największy udział procentowy stanowią ortofosforany, których zawartość wahała się od 76,3 do 88,5%. Najniższą wartość zanotowano dla MAG, natomiast najwyższą dla SCO w 4 DAT. Udział fosfomonoestrów oscylował w granicach 11,1 – 22,8%, największą wartość odnotowano dla kontroli w 0 DAT, a najmniejszą dla SCO w 4 DAT. Najmniejszą grupę spośród oznaczonych związków fosforowych stanowiły fosfodiestry, których zawartość nie przekraczała 1%.

 Tabela 13. Względne ilości (%) głównych form fosforu wykrytych w zasadowych ekstraktach nadziemnych części siewek ogórka.

 Diaze za zastraktach zastraktach nadziemnych części siewek ogórka.

DAT	Warunki wzrostu	P1 (%)	P2 (%)	P3 (%)	P4 (%)	P5 (%)	P6 (%)
	Kontrola	-	0,7	0,2	22,8	76,3	_
0	SCO	-	0,4	0,1	13,3	86,1	-
	MAG	-	0,4	0,0	15,0	84,6	-
	Kontrola	-	0,0	0,1	15,4	84,5	_
2	SCO	-	0,0	0,1	14,0	85,9	-
	MAG	-	0,4	0,1	16,9	82,6	_
	Kontrola	-	0,3	0,0	14,5	85,2	-
4	SCO	-	0,3	0,1	11,1	88,5	-
·	MAG	_	0,5	0,3	22,2	77,0	_

Zakres przesunięć chemicznych (ppm) poszczególnych form fosforu zarejestrowanych na widmach ³¹P NMR ekstraktu badanych próbek o odczynie zasadowym: P1 – polifosforany/difosforany ((-23) – (-3,5) ppm); P2 – inne fosfodiestry ((-2) – 1,5 ppm); P3 – fosfolipidy (1,5 – 3 ppm); P4 – fosfomonoestry (3,7 – 6 ppm); P5 – ortofosforany (5,5 – 7 ppm); P6 – fosfoniany (15 – 20 ppm); "–" – nie oznaczono. Błąd standardowy nie przekraczał 10% wartości podanych w tabeli.

Rysunek 35. przedstawia zestawione widma ³¹P NMR ekstraktów z nadziemnych części ogórka w 2 DAT. Na podstawie uzyskanych danych można stwierdzić, że profile fosforowe roślin traktowanych SCO i MAG nie różniły się od kontroli pod względem obecności poszczególnych form fosforu, a zaobserwowane różnice mają jedynie charakter ilościowy.



Rysunek 35. Znormalizowane widma ³¹P NMR ekstraktów otrzymanych z nadziemnych części siewek ogórka w 2 DAT rozwijających się w warunkach kontrolnych (A) oraz traktowanych odpowiednio SCO (B) i MAG (C). W prawej górnej części panelu zaprezentowano powiększoną część widma, aby pokazać subtelne różnice w jego strukturze. Obszar zaznaczony kolorem obejmuje sygnały odzwierciedlające najważniejsze zmiany.

5.2.2 Zmiany w zawartości nukleotydów adeninowych i status metaboliczny siewek ogórka traktowanych preparatem fungicydowym

W celu określenia wpływu testowanych fungicydów systemicznych określono zmiany w zawartości trzech nukleotydów adeninowych oraz zmiany wartości parametru AEC w częściach nadziemnych (Wykres 23.) i korzeniach (Wykres 24.).

Największą zawartość spośród wszystkich nukleotydów adeninowych oznaczono dla ADP, najniższą zaś dla ATP (zarówno w korzeniach, jak i w częściach nadziemnych). Średnia zawartość AMP w nadziemnych częściach siewek ogórka w kolejnych dniach eksperymentu mieściła w zakresie od 99,18 do 100,63 µg g⁻¹ s.m.. Najniższą zawartość AMP

(92,86 \pm 9,70 µg g⁻¹ s.m.) stwierdzono dla SCO w 1 DAT, natomiast najwyższą (127,90 \pm 0,39 µg g⁻¹ s.m.) dla MAG w 3 DAT. Statystycznie istotne zmiany w odniesieniu do kontroli zaobserwowano w 1, 2 i 3 DAT dla MAG oraz 2 i 3 DAT dla SCO. Zastosowane preparaty w tych dniach hodowli przyczyniły się do zwiększenia zawartości AMP.

Największe zmiany zaobserwowano w zawartości ADP, którego średnia zawartość w kolejnych dniach trwania eksperymentu wynosiła odpowiednio 464,32 μ g g⁻¹ s.m. (0 DAT), 507,27 μ g g⁻¹ s.m. (1 DAT), 387,31 μ g g⁻¹ s.m. (2 DAT), 433,70 μ g g⁻¹ s.m. (3 DAT) oraz 412,37 μ g g⁻¹ s.m. (4 DAT). Przy czym najniższą wartość odnotowano dla SCO w 4 DAT (382,18 ± 62,68 μ g g⁻¹ s.m.), natomiast najwyższą w 3 DAT (512,41 ± 31,34 μ g g⁻¹ s.m.). Zastosowane fungicydy doprowadziły do istotnych zmian w 0 DAT oraz 3 DAT, powodując początkowo obniżenie zawartości ADP o około 30%, a następnie wzrost o 55% (SCO) i o 38% (MAG) względem kontroli.

Zawartość ATP w nadziemnych częściach siewek ogórka pozostawała stała i wahała się w granicach 20,59 – 29,28 μ g g⁻¹ s.m. dla SCO i 17,14 – 35,86 μ g g⁻¹ s.m. dla MAG. Dla kontroli nastąpił liniowy spadek z 579,77 ± 28,01 μ g g⁻¹ s.m. do 331,32 ± 40,45 μ g g⁻¹ s.m. w 3 DAT, a następnie ponownie wzrost do 400,86 ± 27,34 μ g g⁻¹ s.m. w 4 DAT. Zależność ta nie wystąpiła jednak w przypadku SCO i MAG, co może sugerować wpływ środka grzybobójczego na metabolizm roślin. Ponadto, analizując wyniki przedstawione na Wykresie 23. C, można zauważyć, że badane środki grzybobójcze doprowadziły do istotnego zmniejszenia zawartości ATP w siewkach ogórka w każdym dniu trwania hodowli.

Aby lepiej określić zmiany metaboliczne zachodzące w rozwijających się siewkach ogórka, wyznaczono współczynnik AEC. Wskaźnik AEC mieścił się w przedziale od 0,39 do 0,53, co odpowiada przewadze procesów katabolicznych. Zaobserwowano istotne różnice pomiędzy grupą kontrolną i SCO oraz pomiędzy grupą kontrolną i MAG.



Wykres 23. Średni współczynnik zawartości AMP (A), ADP (B), ATP (C) oraz wartości parametru AEC (D) w nadziemnych częściach siewek ogórka traktowanych testowanymi środkami grzybobójczymi. Wartości dla hodowli kontrolnej przyjęto jako 100%, "*" oznaczono różnice istotne statystycznie (p≤0,05) w odniesieniu do kontroli.

Jeśli chodzi o wpływ preparatów grzybobójczych na metabolizm korzeni ogórka, podobnie jak w części nadziemnej, najwyższą zawartością spośród oznaczanych nukleotydów charakteryzowało się ADP, a najniższą AMP. Średnia zawartość poszczególnych nukleotydów adeninowych mieściła się w zakresie 137,23 – 201,17 μ g g⁻¹ s.m. (AMP), 575,52 – 772,31 μ g g⁻¹ s.m. (ADP) oraz 48,03 – 99,86 μ g g⁻¹ s.m. (ATP). Co ciekawe, podobnie jak w przypadku części nadziemnych, najniższą zawartość ATP odnotowano w 1 DAT, a najwyższą w 3 DAT w siewkach traktowanych MAG. Jednocześnie zawartość poszczególnych nukleotydów adeninowych była wyższa w korzeniach w porównaniu do części nadziemnych. Ponadto wartość współczynnika AEC mieściła się w zakresie 0,40 – 0,49, przy czym wyższą wartość AEC zarejestrowano w 3 DAT. Początkowa niższa wartość AEC świadczy o silnie zachodzących procesach katabolicznych, natomiast dalszy wzrost parametru AEC od 2 DAT sugeruje zwiększenie udziału procesów anabolicznych.



Wykres 24. Średni współczynnik zawartości AMP (A), ADP (B), ATP (C) oraz wartości parametru AEC (D) w korzeniach siewek ogórka traktowanych testowanymi środkami grzybobójczymi. Wartości dla hodowli kontrolnej przyjęto jako 100%, "*" oznaczono różnice istotne statystycznie (p≤0,05) w odniesieniu do kontroli.

Występowanie istotnych różnic w wartościach AEC pomiędzy SCO a kontrolą oraz MAG a kontrolą wskazuje, że badane preparaty grzybobójcze wpływały na metabolizm w nadziemnych częściach siewek ogórka. W przypadku korzeni nie zaobserwowano tak istotnych różnic w wartościach adenylowanego ładunku energetycznego w porównaniu do kontroli. Badane preparaty, jako środki ogólnoustrojowe, rozprowadzane są po całej roślinie. Brak istotnych różnic może świadczyć o tym, że nie zakłócają one procesów metabolicznych w korzeniach siewek ogórka lub że nie są transportowane do korzeni. Tym samym testowane fungicydy są aktywne jedynie w częściach nadziemnych roślin bezpośrednio narażonych na zakażenia mączniakiem. Ponieważ nie odnotowano negatywnych zmian w metabolizmie korzeni, roślina traktowana tymi fungicydami może w niezakłócony sposób pobierać składniki pokarmowe, co wydaje się być istotną zaletą w ogólnym rozwoju roślin.

5.2.3 Zmiany zawartości barwników fotosyntetycznych w siewkach ogórka traktowanych preparatem fungicydowym

Zmiany zawartości barwników fotosyntetycznych w nadziemnych częściach siewek ogórka przedstawiono na Wykresie 25. Zawartość chlorofilu całkowitego wahała się w granicach 7,36 – 10,69 mg g⁻¹ s.m.. Najwyższą zawartość chlorofilu stwierdzono w 2 DAT

niezależnie od warunków wzrostu. Podobną zależność odnotowano dla zawartości chlorofilu a, którego wartość mieściła się w zakresie 5,28 – 8,10 mg g⁻¹ s.m.. Natomiast zawartość chlorofilu b w czasie trwania eksperymentu utrzymywała się na stałym poziomie i wahała się w granicach 2,00 – 2,70 mg g⁻¹ s.m.. Największą zawartość chlorofilu b zaobserwowano w 2 DAT i wyniosła ona odpowiednio 2,32 ± 0,31 mg g⁻¹ s.m. dla SCO i 2,50 ± 0,20 mg g⁻¹ s.m. dla MAG. Zmiany zawartości karotenoidów w nadziemnych częściach siewek ogórka odpowiadały zmianom zawartości chlorofilu b i mieściły się w zakresie 0,61 – 0,95 mg g⁻¹ s.m.. Z przedstawionych danych wynika, że jedynie w 1 DAT zaobserwowano istotne różnice w stężeniu pigmentów fotosyntetycznych pomiędzy kontrolą i SCO w odniesieniu do chlorofilu a, SCO i MAG w odniesieniu do chlorofilu b oraz pomiędzy grupą kontrolną a zastosowanymi preparatami fungicydowymi w odniesieniu do stężenia karotenoidów.



Wykres 25. Średni współczynnik zawartości chlorofilu a (A), chlorofilu b (B), chlorofilu całkowitego (C) oraz karotenoidów (D) w nadziemnych częściach siewek ogórka traktowanych testowanymi środkami grzybobójczymi. Wartości dla hodowli kontrolnej przyjęto jako 100%, "*" oznaczono różnice istotne statystycznie ($p \le 0,05$) w odniesieniu do kontroli.

Barwniki fotosyntetyczne odgrywają kluczową rolę w fotosyntezie, ponieważ inicjują transfer energii z pochłoniętego światła. Ponadto ich zawartość może dostarczyć informacji o rozwoju roślin i zmianach w metabolizmie. Spadek stężenia chlorofilu jest często spowodowany stresem środowiskowym, takim jak susza [371] i stres solny [372]. Do grupy stresorów zaliczają się także szkodliwe substancje chemiczne, takie jak środki

grzybobójcze [348,373]. Dane wskazują jednak, że grzybobójcze triazole i strobiluryny mogą działać protekcyjnie, zwiększając tolerancję na stres środowiskowy [354]. Aby ograniczyć intensywny wzrost zawartości chlorofilu i zwiększyć podatność siewek ogórka na działanie środków grzybobójczych, badane rośliny od początku doświadczenia podlewano bez nawożenia. Dane literaturowe wskazują, że triazole i strobiluryny powodują zwiększenie zawartości chlorofilu w roślinach ogórka [358,359]. Z przedstawionych danych wynika, że pomimo jednodniowego spadku w 1 DAT dla SCO, w ostatnim dniu doświadczenia zaobserwowano nieznacznie wyższą zawartość chlorofilu całkowitego w porównaniu do kontroli. Jednak w przypadku zastosowania MAG nie stwierdzono zwiększenia zawartości chlorofilu całkowitego, co jest zgodne z danymi literaturowymi [374].

5.2.4 Zmiany aktywności przeciwutleniającej i zawartości antyoksydantów, w tym związków fenolowych i flawonoidów w siewkach ogórka traktowanych preparatem fungicydowym

Obecność metabolitów wtórnych, takich jak polifenole i przeciwutleniacze, może dostarczyć informacji o mechanizmach obronnych rośliny przed warunkami stresowymi [348]. Aktywność przeciwutleniająca (Wykres 26. A), określona jako zdolność do zmiatania wolnych rodników, mieściła się w przedziale 4,45 – 13,79%. Najniższą wartość RSA wyznaczono w 0 DAT, a najwyższą w 4 DAT dla SCO. Natomiast od 1 DAT do 3 DAT wartość ta utrzymywała się na stałym poziomie, wynosząc około 8%. Natomiast w przypadku siewek traktowanych MAG zaobserwowano liniowy wzrost aktywności przeciwutleniającej po 1 DAT. Jednocześnie wartości te były nieznacznie wyższe w porównaniu do kontroli, z wyjątkiem 4 DAT, dla którego różnice osiągnęły istotność statystyczną na poziomie $p \le 0,05$.

Średnia zawartość antyoksydantów i średnia zawartość związków fenolowych mieściła się odpowiednio w zakresie 2,62 – 2,88 mg Troloksu g⁻¹ s.m. i 6,94 – 7,41 mg GAE g⁻¹ s.m.. Najniższą zawartość przeciwutleniaczy odnotowano w 0 DAT (2,26 ± 0,11 mg Troloksu g⁻¹ s.m.), a najwyższą w 4 DAT (3,06 ± 0,08 mg Troloksu g⁻¹ s.m) w próbkach traktowanych MAG. Natomiast najniższą zawartość związków fenolowych (6.62 ± 0,14 mg GAE g⁻¹ s.m.) oznaczono w 4 DAT dla MAG, a najwyższą (7,87 ± 0,21 mg GAE g⁻¹ s.m.) w 4 DAT dla SCO. Jednocześnie zawartość związków fenolowych w siewkach ogórka traktowanych SCO utrzymywały się na względnie stałym poziomie. Natomiast zmiany całkowitej zawartości związków fenolowych w próbkach traktowanych MAG są odwrotnie proporcjonalne do zmian zawartości przeciwutleniaczy. Zaobserwowano liniowy spadek zawartości związków fenolowych z 7,99 ± 0,18 do 6,62 ± 0,14 mg GAE g⁻¹ s.m.. Natomiast całkowita zawartość przeciwutleniaczy wzrosła z 2,26 ± 0,11 do 3,06 ± 0,08 mg Troloksu g⁻¹

s.m.. Analizując wpływ testowanych preparatów fungicydowych na zawartość związków o aktywności przeciwutleniającej można stwierdzić, że istotne różnice w odniesieniu do kontroli odnotowano w pierwszych dniach po zastosowaniu oprysku (0 i 1 DAT) zarówno dla SCO, jak i dla MAG. Natomiast w 4 DAT różnice te były istotne jedynie dla SCO.



Wykres 26. Średni współczynnik aktywności przeciwutleniającej (A) oraz zawartości antyoksydantów (B) i związków fenolowych (C) w nadziemnych częściach siewek ogórka traktowanych testowanymi środkami grzybobójczymi. Wartości dla hodowli kontrolnej przyjęto jako 100%, "*" oznaczono różnice istotne statystycznie ($p \le 0,05$) w odniesieniu do kontroli.

W procesie ewolucji, rośliny wykształciły różne mechanizmy obronne obejmujące syntezę metabolitów, takich jak związki fenolowe [375,376] oraz wzrost aktywności enzymów antyoksydacyjnych [377], chroniących przed negatywnymi skutkami stresu środowiskowego. Większa zawartość związków fenolowych w siewkach po zabiegu MAG w porównaniu z kontrolą może wiązać się z aktywacją syntezy ligniny przez propamokarb [353]. Aktywacja ta zachodzi na początku szlaku fenylopropanoidowego, co potwierdza skorelowany wzrost zawartości związków przeciwutleniających ze spadkiem zawartości związków fenolowych. Dodatkowo związki fenolowe tracą część swojej aktywności przeciwutleniającej podczas wzrostu roślin, gdy stają się częścią strukturalną rozwijającej się rośliny [366].

5.3 Podsumowanie

W wyniku pomiarów ³¹P NMR zaobserwowano różnice w substancjach biochemicznych zachodzących w procesie kiełkowania. Najważniejsze były zmiany względnych ilości (%) poszczególnych form związków fosforu oraz pojawienie się dodatkowych form tych substancji. Dodatkowo w funkcji czasu zmieniała się zależność poszczególnych sygnałów pochodzących od fosfomonoestrów. Ponadto uzyskane dane ³¹P NMR wskazują, że badane środki grzybobójcze nie wpływają na specjację fosforu w częściach nadziemnych. Różnice pomiędzy poszczególnymi grupami związków fosforu mają jedynie charakter ilościowy.

Podsumowując wpływ testowanych fungicydów na poszczególne parametry biochemiczne określające kondycję roślin, przeprowadzono macierzową analizę skupień hierarchicznych (MHCA), którą przedstawiono w postaci mapy cieplnej z dendrogramami (Rysunek 36.). Hierarchiczną analizę skupień i grupowanie wpływu badanych preparatów fungicydowych na mapie cieplnej przeprowadzono w programie PermuMatrix, korzystając z algorytmu wykorzystującego miarę odległości euklidesowej i metodę całkowitego połączenia. Wszystkie zmienne zostały znormalizowane względem kontroli. Kolorem jasnozielonym oznaczono markery biochemiczne, które uległy zmniejszeniu na skutek wpływu badanych czynników. Natomiast kolor jasnoczerwony zastosowano dla tych markerów, które uległy zwiększeniu. W przypadku braku zmian, pola mapy zostały zaznaczone na czarno.



Rysunek 36. MHCA oznaczanych markerów biochemicznych; A – *Wariant 1 – przedsiewne zaprawianie nasion*, B – *Wariant 2 – aplikacja dolistna*. Eksperymentalne warunki hodowli są wskazane po prawej stronie (SCO – Scorpion 325 C, MAG – Magnicur Finito 687,5 SC). Kolorowe słupki (skupiska C1 – C3) po prawej
stronie mapy cieplnej oznaczają odrębne główne gałęzie drzewa skupiającego, grupującego parametry biochemiczne o podobnych wzorach ekspresji na czynniki stresowe. Skala kolorów wskazuje wielkość różnic między wartościami parametrów biochemicznych kiełkujących nasion ogórka (A) lub siewek ogórka (B) rozwijających się w warunkach kontrolnych i eksperymentalnych (jasnoczerwony oznacza wartość dodatnią, jasnozielony oznacza wartość ujemną).

Z analizy dendrogramu wynika, że odpowiedzi roślin na testowane fungicydy w poszczególnych dniach hodowli można podzielić na trzy główne klastry. W przypadku Wariantu 1 – zaprawiania nasion preparatami grzybobójczymi (Rysunek 36. A), pierwszy klaster (C1) stanowią kiełki z 7 DAT traktowane SCO. Klaster ten wyróżnia silny wzrost aktywności fitaz, przy jednoczesnym obniżeniu zawartości Pi i nukleotydów adeninowych. Drugi klaster (C2) charakteryzuje się przede wszystkim zwiększeniem aktywności fitaz w 1 DAT (dla SCO), 2 DAT (dla SCO i MAG) oraz 7 DAT dla MAG). Największy klaster stanowił klaster 3 (C3), do którego zakwalifikowane 0 DAT, 3 DAT i 4 DAT niezależnie od stosowanego preparatu oraz 1 DAT dla MAG. W tym klastrze, badane warunki wzrostu, w większości przypadków, powodowały obniżenie zawartości nukleotydów adeninowych, a także prowadziły do nieznacznego zwiększenia aktywności fitaz w porównaniu do warunków kontrolnych.

Natomiast dla Wariantu 2 – dolistnej aplikacji preparatów grzybobójczych (Rysunek 36. B), pierwszy klaster (C1) stanowią łodygi siewek ogórka z 0 DAT traktowane SCO i MAG, a także 4 DAT traktowane SCO. Klaster ten wyróżnia silny spadek zawartości ATP oraz antyoksydantów, przy jednoczesnym wzroście zawartości związków fenolowych. Najmniejsze zmiany w tym klastrze uzyskano dla chlorofilu a oraz AMP. Drugi klaster (C2) również charakteryzuje duże obniżenie zawartości ATP, jednak znacznemu obniżeniu uległy zawartości AMP i ADP, a nie związki fenolowe jak w przypadku klastra C1. Do klastra 3 (C3) zakwalifikowane siewki ogórka z 2 i 4 DAT traktowane MAG oraz 1 i 2 DAT traktowane SCO. Badane preparaty zaklasyfikowane w tym klastrze w większości przypadków nieznacznie obniżały lub nie wpływały na zawartości poszczególnych barwników fotosyntetycznych, antyoksydantów oraz związków fenolowych. Natomiast wpływały na zawartość ATP, powodując jej obniżenie oraz na AMP i ADP, zwiększając ich zawartość.

Zmiany w zawartości barwników fotosyntetycznych i związków o właściwościach przeciwutleniających – parametrów stosowanych standardowo w ocenie wpływu warunków środowiskowych, nie wskazują na istotny wpływ preparatów fungicydowych na rozwój ogórka. Dopiero szczegółowa analiza fosforomiczna koncentrująca się na statusie energetycznym i różnicach w zawartości nukleotydów adeninowych, dostarczyła szczegółowych informacji na temat wrażliwości zarówno kiełkujących nasion, jak i siewek ogórka na komercyjnie dostępne preparaty fungicydowe.

Zastosowanie preparatu grzybobójczego w przedsiewnym zaprawianiu nasion spowodowało zaburzenia aktywności fitaz, co doprowadziło do zaburzeń metabolicznych kiełkujących nasion. Dodatkowo badane preparaty zmieniały morfologie kiełkujących nasion, ograniczając wzrost łodygi. Aplikacja badanych środków grzybobójczych na siewki również wykazała zaburzenie układu antyoksydacyjnego. Analizując wyniki tej serii doświadczeń stwierdzono również, że zarówno zaprawianie nasion, jak i dolistne zastosowanie fungicydów jako stresorów chemicznych ma wpływ na status energetyczny siewek ogórka. W przypadku zaprawiania nasion ogórka największe różnice w porównaniu do kontroli odnotowano Scorpion 325 SC (Agrecol). Substancje aktywne dla preparatu (azoksystrobina i difenokonazol) zaburzały syntezę nukleotydów adeninowych, co było najbardziej zauważane dla ATP. Natomiast w przypadku zastosowania preparatów w formie oprysków istotne różnice w wartości parametru AEC pomiędzy kontrolą i badanymi preparatami występowały w częściach nadziemnych ogórka. Wyniki te sugerują, że substancje aktywne zawarte w preparatach są transportowane jedynie w obrębie zielonych części rośliny (łodyga, liścienie, liście prawdziwe).

V Wnioski

- Wyniki oznaczeń potwierdziły skuteczność opracowanych i zastosowanych procedur wyodrębniania stabilnych połączeń związków fosforu z nasion wybranych gatunków roślin oraz homogenatów roślin modelowych poddanych działaniu stresorów.
- Opracowano sposób tworzenia i eksponowania zestawów danych zawierających ujednolicone informacje dotyczące obecności i zawartości poszczególnych form fosforu – profili fosforowych roślin rozwijających się w warunkach optymalnych oraz stresowych.
- Oznaczenie połączeń fosforoorganicznych za pomocą techniki ³¹P NMR i stworzenie w ten sposób profili fosforowych pozwoliło, po raz pierwszy, na potwierdzenie naturalnego występowanie związków fosfonowych w nasionach roślin. W ten sposób nie tylko poszerzono wiedzę na temat związków fosforu obecnych w roślinach, ale również wskazano obecność związków fosfonowych jako potencjalną cechę chemotaksonomiczną.
- Dowiedziono, że wyniki oznaczeń ufosforylowanych nukleotydów adeninowych oraz wyznaczenie ich wzajemnych relacji ilościowych wyrażonych jako AEC, rozszerza możliwość dyskutowania obserwowanych zmian metabolizmu fosforu w kontekście dominacji procesów anabolicznych, bądź katabolicznych.
- Zweryfikowano standardowo stosowane chemiczne wskaźniki odpowiedzi roślin rozwijających się w warunkach stresu fizjologicznego, dzięki czemu potwierdzono konieczność wprowadzenia nowych markerów, takich jak: aktywność enzymatyczna fitaz, zawartość fosforu nieorganicznego, kwasu fitynowego oraz nukleotydów adeninowych, do bardziej precyzyjnego określaniu wpływu czynników stresowych na rozwój roślin modelowych.
- Wyniki podstawowych analiz chemometrycznych ukazują zależności pomiędzy oznaczanymi markerami kondycji roślin, dostarczając informacji o intensywności działania stresorów, a tym samym o wrażliwości roślin na badany czynnik stresowy. Analiza statystyczna wybranych parametrów biochemicznych potwierdziła, że badania metabolomiczne, w szczególności z zakresu badań fosforomicznych dostarczają nowych narzędzi w diagnostyce metabolizmu i określaniu kondycji roślin.

Streszczenie

Fosfor jest jednym z kluczowych pierwiastków o wyjątkowym znaczeniu dla funkcjonowania żywych organizmów. Przemiany związków fosforu zachodzące w wyniku przebiegu procesów życiowych decydują o sprawności metabolicznej organizmu, a co za tym idzie o gotowości do prowadzenia określonych przemian biochemicznych umożliwiających jego rozwój i służących zachowaniu homeostazy. Oznaczanie i śledzenie tych przemian jest możliwe poprzez zastosowanie nowego podejścia w metabolomice – badań fosforomicznych, które pozwala na określenie potencjału rozwojowego organizmu, zakresu wpływu stresu fizjologicznego na stan energetyczny organizmu oraz charakteru oddziaływania (pozytywny, negatywny lub neutralny) wybranych czynników fizykochemicznych.

Wśród metod zastosowanych do określenia zmian zachodzących w metabolizmie testowanych roślin istotna rolę odegrała spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego – technika ³¹P NMR, która pozwoliła na stworzenie profili fosforowych. Z kolei zawartości ufosforylowanych nukleotydów adeninowych (ATP, ADP i AMP) oznaczono wykorzystując wysokosprawną chromatografię cieczową (HPLC), co pozwoliło ustalić status energetyczny, a szczególnie intensywność procesów kata- lub anabolicznych zachodzących w roślinach poddanych działaniu wybranych stresorów. Dodatkowo, w celu prześledzenia przemian związków fosforu na początkowym etapie rozwoju roślin, zestawiono zmiany zawartości fosforu nieorganicznego i białka z aktywnością kwaśnej fitazy oraz zawartością kwasu fitynowego – parametrów oznaczanych głównie w gatunkach zbóż i roślin strączkowych. W tym celu zaadaptowano metodę ekstrakcji kwasu fitynowego, którą w dalszych badaniach zastosowano do określenia wpływu preparatów o działaniu fungicydowym na kiełkowanie nasion ogórka. Opracowano również metodę ekstrakcji i oznaczania aktywności kwaśnej fitazy w kiełkach rzodkiewki i ogórka, rozszerzając w ten sposób zakres zastosowania tej procedury. Oznaczenie wspomnianych parametrów dostarczyło nowych informacji na temat charakteru przemian ilościowych w roślinach na początkowym etapie wzrostu, a ich zestawienie pozwoliło na lepsze zrozumienie przemian związków fosforu zachodzących w roślinach poddanych działaniu stresorów.

Realizacja niniejszej pracy zgodnie z przyjętymi założeniami badawczymi sprawiła, że znacząco udoskonalono procedury eksperymentalne wiodące do oznaczeń różnorodnych form fosforu w złożonych matrycach biologicznych. Dzięki temu jednoznacznie potwierdzono występowanie związków fosfonowych w roślinach, a także wykazano, że profile fosforowe (fosforomy) uwzględniające obecność tych substancji są wystarczająco specyficzne by stać się interesującymi markerami rodzajowymi lub nawet gatunkowymi.

147

Rezultaty poszerzyć możliwości prowadzenia badań te moga znacząco chemotaksonomicznych roślin wpływając zarówno na dyscyplinę nauk biologicznych, jak i dyscyplinę nauk chemicznych. Wyniki badań prowadzonych w toku realizacji niniejszej pracy pozwoliły na poszerzenie wiedzy na temat wpływu różnych stresorów fizjologicznych jak np.: barwa światła, obecność ksenobiotyków – w tym przypadku fungicydów, lub jonów metali przejściowych, na metabolizm kiełkujących nasion. Analizując wpływ stresorów fizycznych wykazano, że barwa światła wpływa nie tylko na standardowo oznaczane markery biochemiczne (np. związki antyoksydacyjne), ale także na przemiany związków fosforu. Światło, powoduje zmiany w aktywności fitaz – enzymów kluczowych w procesie kiełkowania, wpływając tym samym na zawartość wolnego fosforu (Pi). W zależności od długości fali, światło prowadzi do zmiany charakteru zachodzących procesów metabolicznych i wpływa na status energetyczny komórek roślinnych. W komórkach roślin wzrastających w nieoptymalnych warunkach oświetleniowych dochodziło do zwiększenia zawartości AMP, co było spowodowane aktywacją ścieżek biochemicznych, które cechowały się zwiększonym zapotrzebowaniem na energię zmagazynowaną w ATP. Odnosząc się do stresu fizjologicznego roślin indukowanego dodatkiem jonów miedzi(II), manganu(II) i cynku(II) zauważono, że obecność tych jonów w podłożu wywołuje odmienne zmiany w metabolizmie roślin. Wykazano, że jony miedzi powodowały obniżenie wartości parametru AEC w odniesieniu do warunków kontrolnych oraz w początkowych dniach hodowli przyczyniały się do zwiększenia zawartości AMP. Dodatek jonów cynku(II) prowadził do zwiększenia zawartości nukleotydów adeninowych, natomiast u roślin traktowanych jonami manganu(II) dochodziło do istotnego zaburzenia gospodarki fosforowej – obniżeniu ulegała nie tylko zawartość nukleotydów adeninowych, ale także wolnych jonów fosforanowych. Dowiedziono także, że zarówno zaprawianie nasion, jak i dolistne zastosowanie fungicydów jako stresorów chemicznych ma wpływ na status energetyczny siewek ogórka. W przypadku zaprawiania nasion ogórka największe różnice w porównaniu do kontroli odnotowano dla preparatu Scorpion 325 SC (Agrecol). Substancje aktywne (azoksystrobina i difenokonazol) zaburzały syntezę nukleotydów adeninowych, co było najbardziej zauważane dla ATP. Natomiast w przypadku zastosowania preparatów w formie oprysków istotne różnice w wartości parametru AEC pomiędzy kontrolą i badanymi preparatami występowały w częściach nadziemnych ogórka.

Komplementarne zastosowanie techniki ³¹P NMR do badania metabolomu fosforowego, uzupełnione określeniem statusu energetycznego organizmu na podstawie adenylowego ładunku energetycznego, umożliwia stworzenie dynamicznych profili fosforowych

148

odzwierciedlających stan fizjologiczny roślin i pozwala na rozszerzenie zestawu metod stosowanych w monitorowaniu przemian metabolicznych, a tym samym potwierdza możliwość zastosowania badań fosforomicznych w ocenie kondycji roślin.

Badania finansowane w ramach grantu: Profilowanie fosforowe jako metoda oceny rozwoju organizmów w warunkach stresu fizjologicznego - diagnostyka fosforomiczna (UMO-2017/27/B/NZ4/00698)

Summary

Phosphorus is a crucial element for the functioning of living organisms. The transformations of phosphorus compounds that occur as a result of vital processes determine the metabolic efficiency of each organism. Consequently, the efficiency of these processes determines the organism's readiness to carry out specific biochemical transformations that enable its development and maintain homeostasis. The research on these transformations is feasible by implementing a novel approach in metabolomics, namely phosphoromic research. This approach allows for the assessment of an organism's energy state, and the nature of the impact (positive, negative, or neutral) of selected physicochemical factors.

Among the methods used to determine the changes occurring in the metabolism of the plants tested, nuclear magnetic resonance spectroscopy ³¹P NMR technique, played an important role, which allowed phosphorus profiles to be created. In turn, the content of phosphorylated adenine nucleotides (ATP, ADP and AMP) was determined using highperformance liquid chromatography (HPLC), which made it possible to establish the energy status and, in particular, the intensity of the catabolic or anabolic processes occurring in plants exposed to selected stressors. In addition, in order to trace the transformation of phosphorus compounds at the initial stage of plant development, changes in inorganic phosphorus and protein content were compared with the activity of acid phytase and phytic acid content – parameters thought to be useful so far mainly in cereal and legume species. For this purpose, a phytic acid extraction method was adapted and used in further studies to determine the effect of fungicide preparations on cucumber seed germination. A method for the extraction and determination of acid phytase activity in radish and cucumber sprouts was also developed, extending application of this thus the procedure. Determination of the aforementioned parameters provided new information on the nature of the quantitative transformations of phosphorus forms in plants at the initial growth stage, and their collation allowed a better understanding of the transformations of phosphorus compounds occurring in stressed plants.

The implementation of the present study in accordance with the research objectives has markedly enhanced the experimental procedures, thereby facilitating the determination of diverse forms of phosphorus in complex biological matrices. As a consequence, the presence of phosphonate compounds in plants has been irrefutably established, and it has been demonstrated that the phosphorus profiles (phosphoromes) associated with these

150

substances are sufficiently distinctive to warrant consideration as genus or even species markers of interest. These results have the potential to significantly expand the scope of plant chemotaxonomic research, influencing both the biological sciences discipline and the chemical sciences discipline. The findings of this research contribute to our understanding of the impact of diverse physiological stressors, including light colour, the presence of xenobiotics (in this case, fungicides) and transition metal ions, on the metabolism of germinating seeds. The effects of physical stressors were also analysed, and it was demonstrated that light colour affects not only standard biochemical markers (e.g. antioxidant compounds) but also the metabolism of phosphorus compounds. Light, causes changes in the activity of phytases - enzymes crucial in the germination process, thus influencing the free phosphorus (Pi) content. Depending on the wavelength, light leads to changes in the nature of the metabolic processes taking place and influences the energy status of plant cells. In plant cells growing under suboptimal light conditions, there was an increase in AMP content, due to the activation of biochemical pathways characterised by an increased demand for energy stored in ATP. With regard to the physiological stress of plants induced by the addition of copper(II), manganese(II) and zinc(II) ions, it was observed that the presence of these ions in the medium gave rise to disparate changes in plant metabolism. It was demonstrated that copper ions resulted in a reduction of the AEC parameter in comparison to the control conditions, and in the initial stages of plant development, contributed to an increase in the AMP content. The addition of zinc(II) ions resulted in an increase in adenine nucleotide content, whereas plants treated with manganese(II) ions exhibited a significant disruption of phosphorus metabolism. This was evidenced by a decrease in adenine nucleotide content and an accompanying decrease in free phosphate ion content. Furthermore, it was demonstrated that the application of fungicides, whether via seed treatment or foliar application, can exert a detrimental impact on the energy status of cucumber seedlings. With regard to cucumber seed treatment, the greatest differences in comparison to the control were observed in the case of Scorpion 325 SC (Agrecol). The active substances (azoxystrobin and difenoconazole) were observed to disrupt adenine nucleotide synthesis, with the greatest impact on ATP. However, when the preparations were applied as sprays, significant differences in the value of the AEC parameter between the control and the tested preparations were observed in the aboveground parts of the cucumber.

The complementary application of the ³¹P NMR technique to the study of the phosphorus metabolome, complemented by the determination of the energy status of the organism based on adenylyl energy charge, enables the creation of dynamic phosphorus profiles reflecting

the physiological state of plants and allows the set of methods used in monitoring metabolism to be extended, thus confirming the applicability of phosphoromic studies in the assessment of plant health.

This work was supported by Polish National Science Centre (NCN) grant number 2017/27/B/NZ4/00698.

Bibliografia

- 1. Pandey, N. Role of plant nutrients in plant growth and physiology. W *Plant Nutrients and Abiotic Stress Tolerance*; Springer Singapore, 2018; ss. 51–93 ISBN 9789811090448.
- 2. Kumar Chauhan, D.; Kumar Tripathi, D.; Pratap Singh, V.; Mohan Prasad, S.; Dubey, N.K. Role of macronutrients in plant growth and acclimation: Recent advances and future prospective. *Improv. Crop. Era Clim. Chang.* **2014**, *2*, 197–216, doi:10.1007/978-1-4614-8824-8_8/TABLES/1.
- 3. Elad, Y.; Nisan, Z.; Kleinman, Z.; Rav-David, D.; Yermiyahu, U. Effects of microelements on downy mildew (Peronospora belbahrii) of sweet basil. *Plants* **2021**, *10*, 1793, doi:10.3390/plants10091793.
- 4. Zeļonka, L.; Stramkale, V.; Vikmane, M. Effect and after-eff ect of barley seed coating with phosphorus on germination, photosynthetic pigments and grain yield. *Acta Univ. Latv.* **2005**, *691*, 111–119.
- 5. Sajid, M.; Khan, M.A.; Rab, A.; Shah, S.N.M.; Arif, M.; Jan, I.; Hussain, Z.; Mukhtiar, M. Impact of nitrogen and phosphorus on seed yield and yield components of okra cultivars. *J. Anim. Plant Sci.* **2012**, *22*, 704–707.
- 6. Wieczorek, D.; Żyszka-Haberecht, B.; Kafka, A.; Lipok, J. Phosphonates as unique components of plant seeds—a promising approach to use phosphorus profiles in plant chemotaxonomy. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 11501, doi:10.3390/ijms222111501.
- 7. Nussaume, L.; Kanno, S.; Javot, H.; Marin, E.; Pochon, N.; Ayadi, A.; Nakanishi, T.M.; Thibaud, M.C. Phosphate import in plants: focus on the PHT1 transporters. **2011**, *2*, 14345.
- 8. Schachtman, D.P.; Reid, R.J.; Ayling, S.M. Phosphorus Uptake by Plants: From Soil to Cell. **1998**, *116*, 447–453, doi:10.1104/PP.116.2.447.
- 9. Gerendás, J.; Schurr, U. Physicochemical aspects of ion relations and pH regulation in plants—a quantitative approach. J. Exp. Bot. **1999**, 50, 1101–1114, doi:10.1093/JXB/50.336.1101.
- Vreugdenhil, D.; Koot-Gronsveld, E.A.M. Measurements of pH, sucrose and potassium ions in the phloem sap of castor bean (Ricinus communis) plants. *Physiol. Plant.* 1989, 77, 385–388, doi:10.1111/J.1399-3054.1989.TB05657.X.
- Pagliarani, C.; Casolo, V.; Ashofteh Beiragi, M.; Cavalletto, S.; Siciliano, I.; Schubert, A.; Gullino, M.L.; Zwieniecki, M.A.; Secchi, F. Priming xylem for stress recovery depends on coordinated activity of sugar metabolic pathways and changes in xylem sap pH. *Plant. Cell Environ.* 2019, *42*, 1775–1787, doi:10.1111/PCE.13533.
- 12. BEFFAGNA, N.; ROMANI, G. Suitability of Arabidopsis for studies on intracellular pH regulation: correlation between H + pump activity, cytosolic pH and malate level in wild-type and in a mutant partially insensitive to fusicoccin. *Plant. Cell Environ.* **1994**, *17*, 681–690, doi:10.1111/j.1365-3040.1994.tb00160.x.
- 13. Brunings, A.M.; Liu, G.; Simonne, E.H.; Zhang, S.; Li, Y.; Datnoff, L.E. Are Phosphorous and Phosphoric Acids Equal Phosphorous Sources for Plant Growth? *EDIS* **2012**, *2012*, doi:10.32473/edis-hs254-2012.
- 14. Rausch, C.; Bucher, M. Molecular mechanisms of phosphate transport in plants. *Planta* **2002**, *216*, 23–37, doi:10.1007/S00425-002-0921-3.
- 15. Javot, H.; Pumplin, N.; Harrison, M.J. Phosphate in the arbuscular mycorrhizal symbiosis: transport properties and regulatory roles. *Plant. Cell Environ.* **2007**, *30*, 310–322, doi:10.1111/J.1365-3040.2006.01617.X.
- 16. Bieleski, R.L. Phosphate Pools, Phosphate Transport, and Phosphate Availability. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **1973**, *24*, 225–252, doi:10.1146/annurev.pp.24.060173.001301.
- 17. Hinsinger, P. Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes: A review. *Plant Soil* **2001**, *237*, 173–195, doi:10.1023/A:1013351617532/METRICS.
- 18. Wang, Y.; Chen, Y.F.; Wu, W.H. Potassium and phosphorus transport and signaling in plants. *J. Integr. Plant Biol.* **2021**, *63*, 34–52, doi:10.1111/JIPB.13053.
- Prathap, V.; Kumar, A.; Maheshwari, C.; Tyagi, A. Phosphorus homeostasis: acquisition, sensing, and long-distance signaling in plants. *Mol. Biol. Rep.* 2022, 49, 8071–8086, doi:10.1007/S11033-022-07354-9/METRICS.
- 20. Gaxiola, R.A.; Palmgren, M.G.; Schumacher, K. Plant proton pumps. *FEBS Lett.* **2007**, *581*, 2204–2214, doi:10.1016/J.FEBSLET.2007.03.050.
- 21. Sakano, K. Proton/phosphate stoichiometry in uptake of inorganic phosphate by cultured cells of Catharanthus roseus (L.) G. Don. *Plant Physiol.* **1990**, *93*, 479–483, doi:10.1104/pp.93.2.479.
- 22. Mudge, S.R.; Rae, A.L.; Diatloff, E.; Smith, F.W. Expression analysis suggests novel roles for members of the Pht1 family of phosphate transporters in Arabidopsis. *Plant J. cell Mol. Biol.* **2002**, *31*, 341–353, doi:10.1046/J.1365-313X.2002.01356.X.
- 23. Liu, T.Y.; Huang, T.K.; Tseng, C.Y.; Lai, Y.S.; Lin, S.I.; Lin, W.Y.; Chen, J.W.; Chioua, T.J. PHO2-Dependent Degradation of PHO1 Modulates Phosphate Homeostasis in Arabidopsis. *Plant Cell* **2012**, 24, 2168–2183, doi:10.1105/TPC.112.096636.
- 24. Daram, P.; Brunner, S.; Persson, B.L.; Amrhein, N.; Bucher, M. Functional analysis and cell-specific

expression of a phosphate transporter from tomato. *Planta* **1998**, *206*, 225–233, doi:10.1007/S004250050394/METRICS.

- 25. Zhu, W.; Miao, Q.; Sun, D.; Yang, G.; Wu, C.; Huang, J.; Zheng, C. The mitochondrial phosphate transporters modulate plant responses to salt stress via affecting ATP and gibberellin metabolism in Arabidopsis thaliana. *PLoS One* **2012**, *7*, doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0043530.
- 26. Guo, B.; Jin, Y.; Wussler, C.; Blancaflor, E.B.; Motes, C.M.; Versaw, W.K. Functional analysis of the Arabidopsis PHT4 family of intracellular phosphate transporters. *New Phytol.* **2008**, *177*, 889–898, doi:10.1111/J.1469-8137.2007.02331.X.
- Wang, C.; Yue, W.; Ying, Y.; Wang, S.; Secco, D.; Liu, Y.; Whelan, J.; Tyerman, S.D.; Shou, H. Rice SPX-Major Facility Superfamily3, a Vacuolar Phosphate Efflux Transporter, Is Involved in Maintaining Phosphate Homeostasis in Rice. *Plant Physiol.* 2015, *169*, 2822, doi:10.1104/PP.15.01005.
- Liu, T.Y.; Huang, T.K.; Yang, S.Y.; Hong, Y.T.; Huang, S.M.; Wang, F.N.; Chiang, S.F.; Tsai, S.Y.; Lu, W.C.; Chiou, T.J. Identification of plant vacuolar transporters mediating phosphate storage. *Nat. Commun.* 2016, 7, 1–11, doi:10.1038/ncomms11095.
- 29. Secco, D.; Bouain, N.; Rouached, A.; Prom-u-thai, C.; Hanin, M.; Pandey, A.K.; Rouached, H. *Phosphate, phytate and phytases in plants: from fundamental knowledge gained in Arabidopsis to potential biotechnological applications in wheat*; Taylor & Francis, 2017; T. 37, ss. 898–910;.
- 30. Martinoia, E.; Meyer, S.; De Angeli, A.; Nagy, R. Vacuolar transporters in their physiological context. *Annu. Rev. Plant Biol.* 2012, *63*, 183–213, doi:10.1146/ANNUREV-ARPLANT-042811-105608.
- 31. Marty, F. Plant Vacuoles. *Plant Cell* 1999, 11, 587–599, doi:10.1105/TPC.11.4.587.
- 32. Yang, S.Y.; Huang, T.K.; Kuo, H.F.; Chiou, T.J. Role of vacuoles in phosphorus storage and remobilization. J. Exp. Bot. 2017, 68, 3045–3055, doi:10.1093/JXB/ERW481.
- 33. Versaw, W.K.; Garcia, L.R. Intracellular transport and compartmentation of phosphate in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2017**, *39*, 25–30, doi:10.1016/J.PBI.2017.04.015.
- 34. Pratt, J.; Boisson, A.M.; Gout, E.; Bligny, R.; Douce, R.; Aubert, S. Phosphate (Pi) starvation effect on the cytosolic Pi concentration and Pi exchanges across the tonoplast in plant cells: An in vivo 31Pnuclear magnetic resonance study using methylphosphonate as a Pi analog. *Plant Physiol.* 2009, 151, 1646–1657, doi:10.1104/pp.109.144626.
- 35. Luan, M.; Zhao, F.; Han, X.; Sun, G.; Yang, Y.; Liu, J.; Shi, J.; Fu, A.; Lan, W.; Luan, S. Vacuolar Phosphate Transporters Contribute to Systemic Phosphate Homeostasis Vital for Reproductive Development in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **2019**, *179*, 640–655, doi:10.1104/PP.18.01424.
- 36. Veneklaas, E.J.; Lambers, H.; Bragg, J.; Finnegan, P.M.; Lovelock, C.E.; Plaxton, W.C.; Price, C.A.; Scheible, W.R.; Shane, M.W.; White, P.J.; i in. Opportunities for improving phosphorus-use efficiency in crop plants. **2012**, *195*, 306–320, doi:10.1111/J.1469-8137.2012.04190.X.
- 37. Smith, F.W.; Mudge, S.R.; Rae, A.L.; Glassop, D. Phosphate transport in plants. *Plant Soil* **2003**, *248*, 71–83, doi:10.1023/A:1022376332180/METRICS.
- Aerts, R. Nutrient Resorption from Senescing Leaves of Perennials: Are there General Patterns? J. Ecol. 1996, 84, 597, doi:10.2307/2261481.
- 39. Himelblau, E.; Amasino, R.M. Nutrients mobilized from leaves of Arabidopsis thaliana during leaf senescence. J. Plant Physiol. 2001, 158, 1317–1323, doi:10.1078/0176-1617-00608.
- 40. Plaxton, W.C.; Tran, H.T. Metabolic Adaptations of Phosphate-Starved Plants. *Plant Physiol.* **2011**, *156*, 1006–1015, doi:10.1104/PP.111.175281.
- 41. Stigter, K.A.; Plaxton, W.C. Molecular Mechanisms of Phosphorus Metabolism and Transport during Leaf Senescence. *Plants* **2015**, *4*, 773–798, doi:10.3390/PLANTS4040773.
- 42. Yu, B.; Xu, C.; Benning, C. Arabidopsis disrupted in SQD2 encoding sulfolipid synthase is impaired in phosphate-limited growth. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2002**, *99*, 5732–5737, doi:10.1073/PNAS.082696499.
- 43. Bhadouria, J.; Giri, J. Purple acid phosphatases: roles in phosphate utilization and new emerging functions. *Plant Cell Rep.* **2022**, *41*, 33–51, doi:10.1007/s00299-021-02773-7.
- 44. Veljanovski, V.; Vanderbeld, B.; Knowles, V.L.; Snedden, W.A.; Plaxton, W.C. Biochemical and Molecular Characterization of AtPAP26, a Vacuolar Purple Acid Phosphatase Up-Regulated in Phosphate-Deprived Arabidopsis Suspension Cells and Seedlings. *Plant Physiol.* **2006**, *142*, 1282–1293, doi:10.1104/PP.106.087171.
- 45. Zhang, Z.; Liao, H.; Lucas, W.J. Molecular mechanisms underlying phosphate sensing, signaling, and adaptation in plants. *J. Integr. Plant Biol.* **2014**, *56*, 192–220, doi:10.1111/JIPB.12163.
- 46. Viégas, I. de J.M.; Cordeiro, R.A.M.; Almeida, G.M. de; Silva, D.A.S.; Silva, B.C. da; Okumura, R.S.; Júnior, M.L. da S.; Silva, S.P. da; Freitas, J.M.N. de; Viégas, I. de J.M.; i in. Growth and Visual Symptoms of Nutrients Deficiency in Mangosteens (Garcinia mangostana L.). *Am. J. Plant Sci.* 2018, *9*, 1014–1028, doi:10.4236/AJPS.2018.95078.
- 47. Ticconi, C.A.; Abel, S. Short on phosphate: Plant surveillance and countermeasures. *Trends Plant Sci.* **2004**, *9*, 548–555, doi:10.1016/j.tplants.2004.09.003.
- 48. Chen, C.H.; Tseng, I.T.; Lo, S.C.; Yu, Z.R.; Pang, J.J.; Chen, Y.H.; Huang, C.C.; Li, S.Y. Manipulating ATP supply improves in situ CO2 recycling by reductive TCA cycle in engineered Escherichia coli. *3*

Biotech 2020, 10, 1-8, doi:10.1007/S13205-020-2116-7/FIGURES/4.

- 49. Hashida, S.N.; Kawai-Yamada, M. Inter-Organelle NAD Metabolism Underpinning Light Responsive NADP Dynamics in Plants. *Front. Plant Sci.* **2019**, *10*, 960, doi:10.3389/fpls.2019.00960.
- 50. Rao, I.M.; Arulanantham, A.R.; Terry, N. Leaf phosphate status, photosynthesis and carbon partitioning in sugar beet: II. diurnal changes in sugar phosphates, adenylates, and nicotinamide nucleotides. *Plant Physiol.* **1989**, *90*, 820–826, doi:10.1104/pp.90.3.820.
- 51. Fredeen, A.L.; Raab, T.K.; Rao, I.M.; Terry, N. Effects of phosphorus nutrition on photosynthesis in Glycine max (L.) Merr. *Planta* **1990**, *181*, 399–405, doi:10.1007/BF00195894.
- 52. Lauer, M.J.; Pallardy, S.G.; Blevins, D.G.; Randall, D.D. Whole Leaf Carbon Exchange Characteristics of Phosphate Deficient Soybeans (Glycine max L.). *Plant Physiol.* **1989**, *91*, 848–854, doi:10.1104/PP.91.3.848.
- 53. Heldt, H.W.; Chon, C.J.; Maronde, D.; Herold, A.; Stankovic, Z.S.; Walker, D.A.; Kraminer, A.; Kirk, M.R.; Heber, U. Role of Orthophosphate and Other Factors in the Regulation of Starch Formation in Leaves and Isolated Chloroplasts. *Plant Physiol.* **1977**, *59*, 1146–1155, doi:10.1104/PP.59.6.1146.
- 54. Plaxton, W.C.; Carswell, M.C. Metabolic Aspects of the Phosphate Starvation Response in Plants. *Plant Responses to Environ. Stress.* **2018**, 349–372, doi:10.1201/9780203743157-16.
- 55. Lorenzo-Orts, L.; Couto, D.; Hothorn, M. Identity and functions of inorganic and inositol polyphosphates in plants. *New Phytol.* **2020**, *225*, 637–652, doi:10.1111/NPH.16129.
- 56. Lee, S.K.; Jeon, J.S. Crucial role of inorganic pyrophosphate in integrating carbon metabolism from sucrose breakdown to starch synthesis in rice endosperm. *Plant Sci.* **2020**, *298*, 110572, doi:10.1016/J.PLANTSCI.2020.110572.
- Gutiérrez-Luna, F.M.; Hernández-Domínguez, E.E.; Valencia-Turcotte, L.G.; Rodríguez-Sotres, R. Pyrophosphate and pyrophosphatases in plants, their involvement in stress responses and their possible relationship to secondary metabolism. *Plant Sci.* 2018, 267, 11–19, doi:10.1016/J.PLANTSCI.2017.10.016.
- 58. Weiner, H.; Stitt, M.; Heldt, H.W. Subcellular compartmentation of pyrophosphate and alkaline pyrophosphatase in leaves. *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* **1987**, *893*, 13–21, doi:10.1016/0005-2728(87)90143-5.
- 59. Noack, S.R.; McLaughlin, M.J.; Smernik, R.J.; McBeath, T.M.; Armstrong, R.D. Crop residue phosphorus: Speciation and potential bio-availability. *Plant Soil* **2012**, *359*, 375–385, doi:10.1007/S11104-012-1216-5/TABLES/3.
- 60. Igamberdiev, A.U.; Kleczkowski, L.A. Pyrophosphate as an alternative energy currency in plants. *Biochem. J.* **2021**, 478, 1515–1524, doi:10.1042/BCJ20200940.
- 61. Stitt, M. Pyrophosphate as an Energy Donor in the Cytosol of Plant Cells: an Enigmatic Alternative to ATP. *Bot. Acta* **1998**, *111*, 167–175, doi:10.1111/J.1438-8677.1998.TB00692.X.
- 62. Rao, N.N.; Gómez-García, M.R.; Kornberg, A. Inorganic polyphosphate: Essential for growth and survival. *Annu. Rev. Biochem.* **2009**, *78*, 605–647, doi:10.1146/ANNUREV.BIOCHEM.77.083007.093039/CITE/REFWORKS.
- 63. Kolozsvari, B.; Firth, S.; Saiardi, A. Raman spectroscopy detection of phytic acid in plant seeds reveals the absence of inorganic polyphosphate. *Mol. Plant* **2015**, *8*, 826–828, doi:10.1016/j.molp.2015.01.015.
- 64. Havlin, J.L.; Schlegel, A.J. Review of phosphite as a plant nutrient and fungicide. *Soil Syst.* **2021**, *5*, 52, doi:10.3390/SOILSYSTEMS5030052.
- Varadarajan, D.K.; Karthikeyan, A.S.; Matilda, P.D.; Raghothama, K.G. Phosphite, an analog of phosphate, suppresses the coordinated expression of genes under phosphate starvation. *Plant Physiol.* 2002, *129*, doi:10.1104/PP.010835.
- 66. Schroetter, S.; Angeles-Wedler, D.; Kreuzig, R.; Schnug, E. Effects of phosphite on phosphorus supply and growth of corn (Zea mays). *Landbauforsch. Völkenrod* **2006**, *56*, 87–99.
- 67. Förster, H.; Adaskaveg, J.E.; Kim, D.H.; Stanghellini, M.E. Effect of phosphite on tomato and pepper plants and on susceptibility of pepper to phytophthora root and crown rot in hydroponic culture. *Plant Dis.* **1998**, *82*, 1165–1170, doi:10.1094/PDIS.1998.82.10.1165.
- Carswell, C.; Grant, B.R.; Theodorou, M.E.; Harris, J.; Niere, J.O.; Plaxton, W.C. The Fungicide Phosphonate Disrupts the Phosphate-Starvation Response in Brassica nigra Seedlings. *Plant Physiol.* 1996, 110, 105–110, doi:10.1104/PP.110.1.105.
- 69. Carswell, M.C.; Grant, B.R.; Plaxton, W.C. Disruption of the phosphate-starvation response of oilseed rape suspension cells by the fungicide phosphonate. *Planta* **1997**, *203*, 67–74, doi:10.1007/S00050166/METRICS.
- McDonald, A.E.; Grant, B.R.; Plaxton, W.C. Phosphite (phosphorus acid): its relevance in the environment and agriculture and influence on plant phosphate starvation response. J. Plant Nutr. 2001, 24, 1505–1519, doi:10.1081/PLN-100106017.
- 71. Abel, S.; Ticconi, C.A.; Delatorre, C.A. Phosphate sensing in higher plants. *Physiol. Plant.* **2002**, *115*, 1–8, doi:10.1034/J.1399-3054.2002.1150101.X.
- 72. Loera-Quezada, M.M.; Leyva-González, M.A.; López-Arredondo, D.; Herrera-Estrella, L. Phosphite

cannot be used as a phosphorus source but is non-toxic for microalgae. *Plant Sci.* 2015, 231, 124–130, doi:10.1016/J.PLANTSCI.2014.11.015.

- 73. Malhotra, H.; Vandana; Sharma, S.; Pandey, R. Phosphorus nutrition: Plant growth in response to deficiency and excess. W *Plant Nutrients and Abiotic Stress Tolerance*; Springer Singapore, 2018; ss. 171–190 ISBN 9789811090448.
- 74. McClain, A.M.; Sharkey, T.D. Triose phosphate utilization and beyond: from photosynthesis to end product synthesis. *J. Exp. Bot.* **2019**, *70*, 1755–1766, doi:10.1093/JXB/ERZ058.
- 75. Plaxton, W.C. The organization and regulation of plant glycolysis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **1996**, *47*, 185–214, doi:10.1146/ANNUREV.ARPLANT.47.1.185/CITE/REFWORKS.
- 76. Börnke, F.; Sonnewald, S. Biosynthesis and metabolism of starch and sugars. W *Plant Metabolism and Biotechnology*; John Wiley & Sons, Ltd, 2011; ss. 1–25 ISBN 9780470747032.
- 77. Ponnu, J.; Wahl, V.; Schmid, M. Trehalose-6-phosphate: Connecting plant metabolism and development. *Front. Plant Sci.* **2011**, *2*, 15488, doi:10.3389/fpls.2011.00070.
- 78. Paul, M.J.; Primavesi, L.F.; Jhurreea, D.; Zhang, Y. Trehalose metabolism and signaling. *Annu. Rev. Plant Biol.* **2008**, *59*, 417–441, doi:10.1146/ANNUREV.ARPLANT.59.032607.092945/CITE/REFWORKS.
- 79. Loewus, F.A.; Murthy, P.P.N. myo-Inositol metabolism in plants. *Plant Sci.* **2000**, *150*, 1–19, doi:10.1016/S0168-9452(99)00150-8.
- 80. Bloot, A.P.M.; Kalschne, D.L.; Amaral, J.A.S.; Baraldi, I.J.; Canan, C. A Review of Phytic Acid Sources, Obtention, and Applications. *Food Rev. Int.* **2023**, *39*, 73–92, doi:10.1080/87559129.2021.1906697.
- 81. Rasmussen, S.K.; Ingvardsen, C.R.; Torp, A.M. Mutations in genes controlling the biosynthesis and accumulation of inositol phosphates in seeds. *Biochem. Soc. Trans.* **2010**, *38*, 689–694, doi:10.1042/BST0380689.
- 82. Silva, V.M.; Putti, F.F.; White, P.J.; Reis, A.R. dos Phytic acid accumulation in plants: Biosynthesis pathway regulation and role in human diet. *Plant Physiol. Biochem.* **2021**, *164*, 132–146, doi:10.1016/J.PLAPHY.2021.04.035.
- Kumar, A.; Dash, G.K.; Sahoo, S.K.; Lal, M.K.; Sahoo, U.; Sah, R.P.; Ngangkham, U.; Kumar, S.; Baig, M.J.; Sharma, S.; i in. Phytic acid: a reservoir of phosphorus in seeds plays a dynamic role in plant and animal metabolism. *Phytochem. Rev.* 2023, *22*, 1281–1304, doi:10.1007/S11101-023-09868-X.
- 84. Kumar, A.; Singh, B.; Raigond, P.; Sahu, C.; Mishra, U.N.; Sharma, S.; Lal, M.K. Phytic acid: Blessing in disguise, a prime compound required for both plant and human nutrition. *Food Res. Int.* **2021**, *142*, 110193, doi:10.1016/J.FOODRES.2021.110193.
- 85. Nissar, J.; Ahad, T.; Naik, H.R.; Hussain, S.Z. A review phytic acid: As antinutrient or nutraceutical. *J. Pharmacogn. Phytochem.* **2017**, *6*, 1554–1560.
- 86. Kumar, V.; Sinha, A.K.; Makkar, H.P.S.; Becker, K. Dietary roles of phytate and phytase in human nutrition: A review. *Food Chem.* **2010**, *120*, 945–959, doi:10.1016/J.FOODCHEM.2009.11.052.
- 87. Marolt, G.; Kolar, M. Analytical methods for determination of phytic acid and other inositol phosphates: A review. *Molecules* 2021, *26*, 174.
- Sharma, S.; AnandKumar, L.H.D.; Tyagi, A.; Muthumilarasan, M.; Kumar, K.; Gaikwad, K. An insight into phytic acid biosynthesis and its reduction strategies to improve mineral bioavailability. *Nucl.* 2022, 65, 255–267, doi:10.1007/S13237-021-00371-2/TABLES/2.
- 89. Liu, X.; Han, R.; Cao, Y.; Turner, B.L.; Ma, L.Q. Enhancing phytate availability in soils and phytate-P acquisition by plants: A review. *Environ. Sci. Technol.* **2022**, *56*, 9196–9219.
- 90. Filippovich, S.Y.; Isakova, E.P.; Gessler, N.N.; Deryabina, Y.I. Advances in immobilization of phytases and their application. *Bioresour. Technol.* **2023**, *379*, 129030, doi:10.1016/J.BIORTECH.2023.129030.
- 91. Raboy, V. myo-Inositol-1,2,3,4,5,6-hexakisphosphate. *Phytochemistry* **2003**, *64*, 1033–1043, doi:10.1016/S0031-9422(03)00446-1.
- 92. Williams, S.P.; Gillaspy, G.E.; Perera, I.Y. Biosynthesis and possible functions of inositol pyrophosphates in plants. *Front. Plant Sci.* **2015**, *6*, 127764, doi:10.3389/FPLS.2015.00067/BIBTEX.
- Bentsink, L.; Yuan, K.; Koornneef, M.; Vreugdenhil, D. The genetics of phytate and phosphate accumulation in seeds and leaves of Arabidopsis thaliana, using natural variation. *Theor. Appl. Genet.* 2003, 106, 1234–1243, doi:10.1007/S00122-002-1177-9/FIGURES/8.
- 94. Bowater, R.P.; Gates, A.J. Nucleotides: Structure and Properties. *Encycl. Life Sci.* 2015, 1–9, doi:10.1002/9780470015902.A0001333.PUB3.
- 95. Zrenner, R.; Stitt, M.; Sonnewald, U.; Boldt, R. Pyrimidine and purine biosynthesis and degradation in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* **2006**, *57*, 805–836, doi:10.1146/ANNUREV.ARPLANT.57.032905.105421/CITE/REFWORKS.
- 96. Stasolla, C.; Katahira, R.; Thorpe, T.A.; Ashihara, H. Purine and pyrimidine nucleotide metabolism in higher plants. **2003**, *160*, 1271–1295, doi:10.1078/0176-1617-01169.
- 97. Witte, C.P.; Herde, M. Nucleotide Metabolism in Plants. *Plant Physiol.* **2020**, *182*, 63–78, doi:10.1104/PP.19.00955.
- 98. Zrenner, R.; Ashihara, H. Nucleotide Metabolism. Plant Metab. Biotechnol. 2011, 135-162,

doi:10.1002/9781119991311.CH5.

- 99. Wagner, K.G.; Backer, A.I. Dynamics of Nucleotides in Plants Studied on a Cellular Basis. *Int. Rev. Cytol.* **1992**, *134*, 1–84, doi:10.1016/S0074-7696(08)62027-6.
- 100. Meyer, R.; Wagner, K.G. Nucleotide pools in leaf and root tissue of tobacco plants: Influence of leaf senescence. *Physiol. Plant.* **1986**, *67*, 666–672, doi:10.1111/J.1399-3054.1986.TB05075.X.
- 101. Haferkamp, I.; Fernie, A.R.; Neuhaus, H.E. Adenine nucleotide transport in plants: much more than a mitochondrial issue. *Trends Plant Sci.* 2011, *16*, 507–515, doi:10.1016/J.TPLANTS.2011.04.001.
- 102. Geigenberger, P.; Riewe, D.; Fernie, A.R. The central regulation of plant physiology by adenylates. *Trends Plant Sci.* **2010**, *15*, 98–105, doi:10.1016/J.TPLANTS.2009.11.004.
- 103. Byczyńska, A.; Lorenc-Plucińska, G. Status energetyczny komórek roślinnych oraz jego regulacja w odpowiedzi na zmieniające sie warunki środowiska. *Postępy Biol. Komórki* **1998**, *25*, 487–499.
- 104. Drzyzga, D. Katalizowane przez cyjanobakterie przemiany stosowanych przemysłowo fosfonowych kompleksonów jonów metali, Uniwersytet Opolski, 2017.
- 105. Kaplan, B.; Sherman, T.; Fromm, H. Cyclic nucleotide-gated channels in plants. *FEBS Lett.* **2007**, *581*, 2237–2246, doi:10.1016/J.FEBSLET.2007.02.017.
- 106. Marondedze, C.; Wong, A.; Thomas, L.; Irving, H.; Gehring, C. Cyclic Nucleotide Monophosphates in Plants and Plant Signaling. *Handb. Exp. Pharmacol.* **2017**, *238*, 87–103, doi:10.1007/164_2015_35.
- 107. Newton, R.P.; Smith, C.J. Cyclic nucleotides. *Phytochemistry* **2004**, *65*, 2423–2437, doi:10.1016/j.phytochem.2004.07.026.
- 108. Świeżawska, B.; Duszyn, M.; Jaworski, K.; Szmidt-Jaworska, A. Downstream Targets of Cyclic Nucleotides in Plants. *Front. Plant Sci.* **2018**, *9*, doi:10.3389/FPLS.2018.01428.
- 109. Teng, Y.; Xu, W.; Ma, M. cGMP is required for seed germination in Arabidopsis thaliana. J. Plant Physiol. 2010, 167, 885–889, doi:10.1016/J.JPLPH.2010.01.015.
- 110. Sandoval, F.J.; Zhang, Y.; Roje, S. Flavin nucleotide metabolism in plants: Monofunctional enzymes synthesize FAD in plastids. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 30890–30900, doi:10.1074/jbc.M803416200.
- 111. Noctor, G.; Queval, G.; Gakière, B. NAD(P) synthesis and pyridine nucleotide cycling in plants and their potential importance in stress conditions. *J. Exp. Bot.* **2006**, *57*, 1603–1620, doi:10.1093/JXB/ERJ202.
- 112. Hashida, S.N.; Takahashi, H.; Uchimiya, H. The role of NAD biosynthesis in plant development and stress responses. *Ann. Bot.* **2009**, *103*, 819–824, doi:10.1093/AOB/MCP019.
- Bar-Peled, M.; O'Neill, M.A. Plant nucleotide sugar formation, interconversion, and salvage by sugar recycling. *Annu. Rev. Plant Biol.* 2011, 62, 127–155, doi:10.1146/ANNUREV-ARPLANT-042110-103918.
- 114. Kafka, A.; Wieczorek, D.; Lipok, J. Metody oznaczania chemicznych połączeń fosforu wyekstrahowanych z matrycy biologicznej. W Na Pograniczu Chemii i Biologii; Koroniak, H., Barciszewski, J., Red.; Wydawnictwo Naukowe UAM: Poznań, 2019; ss. 211–222 ISBN 978-83-232-3593-4.
- 115. Travers, A.; Muskhelishvili, G. DNA structure and function. FEBS J. 2015, 282, 2279–2295.
- 116. Khedkar, G.D.; Prakash, B.; Khedkar, C.D.; Chopade, B.A. Nucleic Acids. W *Encyclopedia of Food and Health*; Academic Press, 2016; ss. 84–92 ISBN 9780123849533.
- Bereta, J.; Jemioła-Rzemińska, M.; Jura, J.; Guzdek, A.; Kasza, A.; Kruk, J.; Mak, P.; Myśliwa-Kurdziel, B.; Szymańska, R.; Waloszek, A.; i in. Kwasy nukleinowe. W *Praktikium z biochemii*; Guzdek, A., Mak, P., Red.; Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego: Kraków, 2009; ss. 77–82 ISBN 978-83-88519-79-6.
- 118. Wang, D.; Farhana, A. Biochemistry, RNA Structure; 2021;
- 119. Pincus, M.R. The Physiological Structure and Function of Proteins. W Cell Physiology Source Book; Academic Press, 1995; ss. 18–35.
- 120. Damaris, R.N.; Yang, P. Protein Phosphorylation Response to Abiotic Stress in Plants. W *Methods in Molecular Biology*; Humana, New York, NY, 2021; T. 2358, ss. 17–43 ISBN 978-1-0716-1625-3.
- 121. Yang, X.J. Multisite protein modification and intramolecular signaling. *Oncogene 2005 2410* **2004**, *24*, 1653–1662, doi:10.1038/sj.onc.1208173.
- 122. Meimoun, P.; Ambard-Bretteville, F.; Colas-des Francs-Small, C.; Valot, B.; Vidal, J. Analysis of plant phosphoproteins. *Anal. Biochem.* 2007, *371*, 238–246, doi:10.1016/J.AB.2007.08.022.
- 123. van Wijk, K.J.; Friso, G.; Walther, D.; Schulze, W.X. Meta-Analysis of Arabidopsis thaliana Phospho-Proteomics Data Reveals Compartmentalization of Phosphorylation Motifs. *Plant Cell* 2014, 26, 2367– 2389, doi:10.1105/TPC.114.125815.
- 124. Champion, A.; Kreis, M.; Mockaitis, K.; Picaud, A.; Henry, Y. Arabidopsis kinome: After the casting. *Funct. Integr. Genomics* **2004**, *4*, 163–187, doi:10.1007/s10142-003-0096-4.
- 125. Li, P.; Liu, J. Protein Phosphorylation in Plant Cell Signaling. *Methods Mol. Biol.* **2021**, *2358*, 45–71, doi:10.1007/978-1-0716-1625-3_3.
- 126. Hubbard, M.J.; Cohen, P. On target with a new mechanism for the regulation of protein phosphorylation. *Trends Biochem. Sci.* **1993**, *18*, 172–177, doi:10.1016/0968-0004(93)90109-Z.
- 127. Hodges, M.; Jossier, M.; Boex-Fontvieille, E.; Tcherkez, G. Protein phosphorylation and

photorespiration. Plant Biol. 2013, 15, 694-706, doi:10.1111/J.1438-8677.2012.00719.X.

- 128. Millar, A.H.; Heazlewood, J.L.; Giglione, C.; Holdsworth, M.J.; Bachmair, A.; Schulze, W.X. The Scope, Functions, and Dynamics of Posttranslational Protein Modifications. *Annu. Rev. Plant Biol.* 2019, 70, 119–151, doi:10.1146/ANNUREV-ARPLANT-050718-100211/1.
- 129. Nakamura, Y. Plant Phospholipid Diversity: Emerging Functions in Metabolism and Protein–Lipid Interactions. *Trends Plant Sci.* **2017**, *22*, 1027–1040, doi:10.1016/J.TPLANTS.2017.09.002.
- 130. Mudd, S.H.; Datko, A.H. Phosphoethanolamine Bases as Intermediates in Phosphatidylcholine Synthesis by Lemna. *Plant Physiol.* **1986**, *82*, 126–135, doi:10.1104/PP.82.1.126.
- 131. Cowan, A.K. Phospholipids as plant growth regulators. *Plant Growth Regul.* 2006, 48, 97–109, doi:10.1007/S10725-005-5481-7/METRICS.
- 132. Meijer, H.J.G.; Munnik, T. Phospholipid-Based Signaling in Plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 2003, 54, 265–306, doi:10.1146/ANNUREV.ARPLANT.54.031902.134748/CITE/REFWORKS.
- 133. Munnik, T.; Irvine, R.F.; Musgrave, A. Phospholipid signalling in plants. *Biochim. Biophys. Acta Lipids Lipid Metab.* **1998**, *1389*, 222–272, doi:10.1016/S0005-2760(97)00158-6.
- 134. Roots, L.; Kasamo, K.; NoUCHI, I. The Role of Phospholipids in Plasma Membrane ATPase Activity in Vigna radiata L. (Mung Bean) Roots and Hypocotyls. *Plant Physiol.* **1987**, *83*, 323–328, doi:10.1104/PP.83.2.323.
- 135. Xue, H.W.; Chen, X.; Mei, Y. Function and regulation of phospholipid signalling in plants. *Biochem. J.* **2009**, *421*, 145–156, doi:10.1042/BJ20090300.
- Quinn, J.P.; Kulakova, A.N.; Cooley, N.A.; McGrath, J.W. New ways to break an old bond: the bacterial carbon–phosphorus hydrolases and their role in biogeochemical phosphorus cycling. *Environ. Microbiol.* 2007, *9*, 2392–2400, doi:10.1111/J.1462-2920.2007.01397.X.
- 137. Jia, Y.; Lu, Z.; Huang, K.; Herzberg, O.; Dunaway-Mariano, D. Insight into the mechanism of phosphoenolpyruvate mutase catalysis derived from site-directed mutagenesis studies of active site residues. *Biochemistry* 1999, 38, 14165–14173, doi:10.1021/BI990771J/ASSET/IMAGES/LARGE/BI990771JF00004.JPEG.
- 138. Kafarski, P. Phosphonates: Their Natural Occurrence and Physiological Role. W Contemporary Topics about Phosphorus in Biology and Materials; Churchill, D., Dutour Sikiric, M., Čolović, B., Füredi Milhofer, H., Red.; IntechOpen: London, 2020; ss. 1–19 ISBN 978-1-78985-039-0.
- 139. Moschidis, M.C. Thin-layer chromatographic and infared spectral evidence for the presence of phosphonolipids in ground apricot kernel. J. Chromatogr. A 1984, 294, 519–524, doi:10.1016/S0021-9673(01)96177-1.
- 140. Mukhamedova, K.S.; Tolibaev, I.; Glushenkova, A.I. Purification of total phospho- and phosphonolipids of cotton and kenaf seeds from accompanying substances. *Chem. Nat. Compd.* **1989**, *24*, 666–668, doi:10.1007/BF00598178/METRICS.
- 141. Bergman, B.; Zheng, W.-W.; Klint, J.; Ran, L. On the origin of plants and relations to contemporary cyanobacterial-plant symbioses. *Plant Biotechnol.* **2008**, *25*, 213–220.
- 142. Blouin, M.; Mathieu, J.; Leadley, P.W. Plant homeostasis, growth and development in natural and artificial soils. *Ecol. Complex.* **2012**, *9*, 10–15, doi:10.1016/J.ECOCOM.2011.11.001.
- 143. Sterner, R.W.; Elser, J.J. Stechiometry and homeostasis. W *Ecological Stoichiometry: The Biology of Elements from Molecules to the Biosphere*; Princeton University Press, 2002; ss. 1–43.
- 144. Gaspar, T.; Franck, T.; Bisbis, B.; Kevers, C.; Jouve, L.; Hausman, J.F.; Dommes, J. Concepts in plant stress physiology. Application to plant tissue cultures. *Plant Growth Regul.* **2002**, *37*, 263–285, doi:10.1023/A:1020835304842.
- 145. Galindo, F.G.; Sjöholm, I.; Rasmusson, A.G.; Widell, S.; Kaack, K. Plant stress physiology: Opportunities and challenges for the food industry. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2007**, *47*, 749–763, doi:10.1080/10408390601062211.
- 146. Suzuki, N.; Mittler, R. Reactive oxygen species and temperature stresses: A delicate balance between signaling and destruction. *Physiol. Plant.* 2006, *126*, 45–51.
- 147. Mittler, R. Abiotic stress, the field environment and stress combination. *Trends Plant Sci.* 2006, *11*, 15–19, doi:10.1016/j.tplants.2005.11.002.
- Shulaev, V.; Cortes, D.; Miller, G.; Mittler, R. Metabolomics for plant stress response. *Physiol. Plant.* 2008, 132, 199–208, doi:10.1111/J.1399-3054.2007.01025.X.
- 149. Hopkins, W.G.; Hiiner, N.P.A. Responses of plant to environmental stresses. W Introduction to Plant Physiology Fourth Edition; Wiley, 1955; ss. 223–240.
- 150. Auriga, A. Ocena oddziaływania preparatów EM i Tytanit® na kształtowanie się parametrów biochemicznych, fizjologicznych i jakościowych wybranych roślin ogrodniczych, Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie: Szczecin, 2021.
- 151. Rhodes, D.; Nadolska-Orczyk, A. Plant Stress Physiology. *Encycl. Life Sci.* 2001, doi:10.1038/NPG.ELS.0001297.
- 152. Yan, A.; Chen, Z. The Control of Seed Dormancy and Germination by Temperature, Light and Nitrate. *Bot. Rev.* **2020**, *86*, 39–75, doi:10.1007/s12229-020-09220-4.

- 153. Finch-Savage, W.E.; Leubner-Metzger, G. Seed dormancy and the control of germination. *New Phytol.* **2006**, *171*, 501–523, doi:10.1111/J.1469-8137.2006.01787.X.
- 154. Yang, M.F.; Liu, Y.J.; Liu, Y.; Chen, H.; Chen, F.; Shen, S.H. Proteomic analysis of oil mobilization in seed germination and postgermination development of Jatropha curcas. *J. Proteome Res.* **2009**, *8*, 1441–1451, doi:10.1021/PR800799S/SUPPL_FILE/PR800799S_SI_001.PDF.
- 155. Füzy, A.; Kovács, R.; Cseresnyés, I.; Parádi, I.; Szili-Kovács, T.; Kelemen, B.; Rajkai, K.; Takács, T. Selection of plant physiological parameters to detect stress effects in pot experiments using principal component analysis. *Acta Physiol. Plant.* 2019, *41*, 1–10, doi:10.1007/S11738-019-2842-9/FIGURES/3.
- 156. Munné-Bosch, S.; Alegre, L. Die and let live: leaf senescence contributes to plant survival under drought stress. *Funct. Plant Biol.* **2004**, *31*, 203–216, doi:10.1071/FP03236.
- 157. Bates, T.R.; Lynch, J.P. Stimulation of root hair elongation in Arabidopsis thaliana by low phosphorus availability. *Plant. Cell Environ.* **1996**, *19*, 529–538, doi:10.1111/J.1365-3040.1996.TB00386.X.
- 158. Niu, Y.F.; Chai, R.S.; Jin, G.L.; Wang, H.; Tang, C.X.; Zhang, Y.S. Responses of root architecture development to low phosphorus availability: a review. *Ann. Bot.* **2013**, *112*, 391–408, doi:10.1093/AOB/MCS285.
- 159. Galindo, F.G.; Sjöholm, I.; Rasmusson, A.G.; Widell, S.; Kaack, K. Plant stress physiology: opportunities and challenges for the food industry. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2007**, *47*, 749–763, doi:10.1080/10408390601062211.
- 160. Arbona, V.; Manzi, M.; de Ollas, C.; Gómez-Cadenas, A. Metabolomics as a tool to investigate abiotic stress tolerance in plants. *Int. J. Mol. Sci.* 2013, *14*, 4885–4911, doi:10.3390/ijms14034885.
- 161. Kopačková, V.; Lhotáková, Z.; Oulehle, F.; Albrechtová, J. Assessing forest health via linking the geochemical properties of a soil profile with the biochemical parameters of vegetation. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* 2015, *12*, 1987–2002, doi:10.1007/S13762-014-0602-3/FIGURES/7.
- 162. Fahad, S.; Bajwa, A.A.; Nazir, U.; Anjum, S.A.; Farooq, A.; Zohaib, A.; Sadia, S.; Nasim, W.; Adkins, S.; Saud, S.; i in. Crop production under drought and heat stress: Plant responses and management options. *Front. Plant Sci.* 2017, *8*, 265598, doi:10.3389/FPLS.2017.01147/BIBTEX.
- Labrou, N.E.; Papageorgiou, A.C.; Pavli, O.; Flemetakis, E. Plant GSTome: Structure and functional role in xenome network and plant stress response. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2015, 32, 186–194, doi:10.1016/j.copbio.2014.12.024.
- 164. Koźmińska Aleksandra, K.I.H.-F.E. Rola osmolitów w tolerancji roślin na stres zasolenia. W Różnorodność biologiczna - od komórki do ekosystemu. Rośliny i grzyby - badania środowiskowe i laboratoryjne; Bajguz Andrzej, C.I., Red.; Polskie Towarzystwoi Botanicznne: Białystok, 2016; ss. 113– 125.
- Fraire-Velázquez, S.; Balderas-Hernández, V.E.; Fraire-Velázquez, S.; Balderas-Hernández, V.E. Abiotic Stress in Plants and Metabolic Responses. *Abiotic Stress - Plant Responses Appl. Agric.* 2013, doi:10.5772/54859.
- 166. Chen, T.H.H.; Murata, N. Glycinebetaine: an effective protectant against abiotic stress in plants. *Trends Plant Sci.* **2008**, *13*, 499–505, doi:10.1016/J.TPLANTS.2008.06.007.
- Kerchev, P.I.; Fenton, B.; Foyer, C.H.; Hancock, R.D. Plant responses to insect herbivory: interactions between photosynthesis, reactive oxygen species and hormonal signalling pathways. *Plant. Cell Environ.* 2012, *35*, 441–453, doi:10.1111/J.1365-3040.2011.02399.X.
- 168. Chaves, M.M.; Flexas, J.; Pinheiro, C. Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. *Ann. Bot.* **2009**, *103*, 551–560, doi:10.1093/AOB/MCN125.
- 169. Musavi, S.A.M.; Ahmad, S.; Abbas, S.; Athar, H. ur R.; Ahmed, I. Omics Technology: Revolution in Plant Biology. W Principles and Practices of OMICS and Genome Editing for Crop Improvement; Springer, Cham, 2022; ss. 197–212 ISBN 978-3-030-96925-7.
- 170. Vailati-Riboni, M.; Palombo, V.; Loor, J.J.; Vailati-Riboni, M.; Palombo, V.; Loor, J.J. What Are Omics Sciences? W Periparturient Diseases of Dairy Cows: A Systems Biology Approach; Springer, Cham, 2017; ss. 1–7 ISBN 978-3-319-43033-1.
- 171. Pérez-Clemente, R.M.; Vives, V.; Zandalinas, S.I.; López-Climent, M.F.; Muñoz, V.; Gómez-Cadenas, A. Biotechnological approaches to study plant responses to stress. *Biomed Res. Int.* 2013, 2013, 654120, doi:10.1155/2013/654120.
- 172. Chatterjee, S.; Srivastava, S.; Khalid, A.; Singh, N.; Sangwan, R.S.; Sidhu, O.P.; Roy, R.; Khetrapal, C.L.; Tuli, R. Comprehensive metabolic fingerprinting of Withania somnifera leaf and root extracts. *Phytochemistry* **2010**, *71*, 1085–1094, doi:10.1016/J.PHYTOCHEM.2010.04.001.
- 173. Weckwerth, W. Metabolomics in Systems Biology. Annu. Rev. Plant Biol. 2003, 54, 669–689, doi:10.1146/ANNUREV.ARPLANT.54.031902.135014/CITE/REFWORKS.
- 174. Fiehn, O. Metabolomics the link between genotypes and phenotypes. W *Functional Genomics*; Springer, Dordrecht, 2002; ss. 155–171 ISBN 978-94-010-0448-0.
- 175. Ghatak, A.; Chaturvedi, P.; Weckwerth, W. Metabolomics in plant stress physiology. W Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology; Springer Science and Business Media Deutschland GmbH, 2018; T. 164, ss. 187–236.

- 176. Halket, J.M.; Waterman, D.; Przyborowska, A.M.; Patel, R.K.P.; Fraser, P.D.; Bramley, P.M. Chemical derivatization and mass spectral libraries in metabolic profiling by GC/MS and LC/MS/MS. *J. Exp. Bot.* 2005, 56, 219–243, doi:10.1093/JXB/ERI069.
- 177. Shulaev, V. Metabolomics technology and bioinformatics. *Brief. Bioinform.* 2006, 7, 128–139, doi:10.1093/bib/bbl012.
- 178. Hong, J.; Yang, L.; Zhang, D.; Shi, J. Plant metabolomics: An indispensable system biology tool for plant science. *Int. J. Mol. Sci.* 2016, *17*, 767, doi:10.3390/ijms17060767.
- 179. Cohen, Y.; Rubin, A.E.; Galperin, M.; Ploch, S.; Runge, F.; Thines, M. Seed transmission of Pseudoperonospora cubensis e109766. *PLoS One* **2014**, *9*, e109766, doi:10.1371/journal.pone.0109766.
- 180. Djalali Farahani-Kofoet, R.; Römer, P.; Grosch, R. Systemic spread of downy mildew in basil plants and detection of the pathogen in seed and plant samples. *Mycol. Prog.* **2012**, *11*, 961–966, doi:10.1007/s11557-012-0816-z.
- 181. Chen, X.; Wang, W.; Liu, F.; Bian, Y. Improved analysis of propamocarb and cymoxanil for the investigation of residue behavior in two vegetables with different cultivation conditions. J. Sci. Food Agric. 2020, 100, 3157–3163, doi:10.1002/jsfa.10350.
- 182. Abd-Alrahman, S.H.; Almaz, M.M. Degradation of propamocarb-hydrochloride in tomatoes, potatoes and cucumber using HPLC-DAD and QuEChERS methodology. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **2012**, *89*, 302–305, doi:10.1007/s00128-012-0703-y.
- Cade-Menun, B.J. Improved peak identification in 31P-NMR spectra of environmental samples with a standardized method and peak library. *Geoderma* 2015, 257–258, 102–114, doi:10.1016/j.geoderma.2014.12.016.
- 184. Mcdowell, R.W.; Stewart, I. Peak assignments for phosphorus-31 nuclear magnetic resonance spectroscopy in pH range 5–13 and their application in environmental samples. *Chem. Ecol.* 2005, *21*, 211–226, doi:10.1080/02757540500211590.
- 185. Forlani, G.; Pavan, M.; Gramek, M.; Kafarski, P.; Lipok, J. Biochemical bases for a widespread tolerance of cyanobacteria to the phosphonate herbicide glyphosate. *Plant Cell Physiol.* **2008**, *49*, 443–456, doi:10.1093/pcp/pcn021.
- 186. Afify, A.E.M.M.R.; El-Beltagi, H.S.; El-Salam, S.M.A.; Omran, A.A. Bioavailability of iron, zinc, phytate and phytase activity during soaking and germination of white sorghum varieties. *PLoS One* 2011, 6, e25512, doi:10.1371/journal.pone.0025512.
- 187. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248–254, doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3.
- 188. Haug, W.; Lantzsch, H. -J Sensitive method for the rapid determination of phytate in cereals and cereal products. *J. Sci. Food Agric.* **1983**, *34*, 1423–1426, doi:10.1002/jsfa.2740341217.
- 189. Złotek, U.; Świeca, M.; Jakubczyk, A. Effect of abiotic elicitation on main health-promoting compounds, antioxidant activity and commercial quality of butter lettuce (Lactuca sativa L.). Food Chem. 2014, 148, 253–260, doi:10.1016/j.foodchem.2013.10.031.
- 190. Vale, A.P.; Cidade, H.; Pinto, M.; Oliveira, M.B.P.P. Effect of sprouting and light cycle on antioxidant activity of Brassica oleracea varieties. *Food Chem.* 2014, 165, 379–387, doi:10.1016/j.foodchem.2014.05.122.
- 191. Zhishen, J.; Mengcheng, T.; Jianming, W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem.* **1999**, *64*, 555–559, doi:10.1016/S0308-8146(98)00102-2.
- 192. Korzeniowska, K.; Łęska, B.; Wieczorek, P.P. Isolation and determination of phenolic compounds from freshwater Cladophora glomerata. *Algal Res.* **2020**, *48*, 101912, doi:10.1016/j.algal.2020.101912.
- 193. Caraux, G.; Pinloche, S. PermutMatrix: a graphical environment to arrange gene expression profiles in optimal linear order. *Bioinformatics* **2005**, *21*, 1280–1281, doi:10.1093/BIOINFORMATICS/BTI141.
- 194. Ebuele, V.O.; Santoro, A.; Thoss, V. Characterization of Plant Seeds by Phosphorus-31 Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *Anal. Lett.* **2017**, *50*, 999–1012, doi:10.1080/00032719.2016.1206910.
- 195. Kaya, K.; Morrison, L.F.; Codd, G.A.; Metcalf, J.S.; Sano, T.; Takagi, H.; Kubo, T. A novel biosurfactant, 2-acyloxyethylphosphonate, isolated from waterblooms of Aphanizomenon flos-aquae. *Molecules* **2006**, *11*, 539–548, doi:10.3390/11070539.
- 196. Kim, A.; Kim, J.; Martin, B.M.; Dunaway-Mariano, D. Isolation and characterization of the carbonphosphorus bond-forming enzyme phosphoenolpyruvate mutase from the mollusk Mytilus edulis. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 4443–4448, doi:10.1074/jbc.273.8.4443.
- 197. Karaismailoğlu, M.C. COMPARATIVE MORPHOLOGY AND ANATOMY OF SEEDS OF SOME AETHIONEMA W.T. AITON (BRASSICACEAE) TAXA FROM TURKEY. Bangladesh J. Plant Taxon 2019, 26, 1–12.
- Farrokh Tehrani, P.; Majd, A.; Mahmoodzadeh, H.; Satari, T.N. Effect of Red and Blue Light-Emitting Diodes on Germination, Morphological and Anatomical Features of Brassica napus. *Adv. Stud. Biol.* 2016, *8*, 173–180, doi:10.12988/asb.2016.6832.

- 199. O. Aremu, M.; Agaji Okpele, J.; Ibrahim, H.; C. Ortutu, S.; Alhaji Mohammed, M.; Bolakale Salau, R. Comparative Studies on Nutrient and Anti-nutrient Composition of Carrot (Daucus carota L.) and Cucumber (Cucumis sativus L.). *Int. J. Sci.* **2022**, *11*, 13–21, doi:10.18483/ijsci.2543.
- 200. Chiera, J.M.; Finer, J.J.; Grabau, E.A. Ectopic expression of a soybean phytase in developing seeds of Glycine max to improve phosphorus availability. *Plant Mol. Biol.* 2004, 56, 895–904, doi:10.1007/s11103-004-5293-6.
- 201. Ranal, M.A.; De Santana, D.G. How and why to measure the germination process? *Brazilian J. Bot.* **2006**, *29*, 1–11, doi:10.1590/S0100-84042006000100002.
- 202. Davies, R.; Sacco, A. Di; Newton, R. Germination testing: procedures and evaluation. *Tech. Inf. Sheet_13a* **2015**, 4.
- 203. Nawaz, T.; Ahmad, N.; Ali, S.; Khan, M.; Fazal, H.; Khalil, S.A. Developmental variation during seed germination and biochemical responses of Brassica rapa exposed to various colored lights. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 2018, 179, 113–118, doi:10.1016/J.JPHOTOBIOL.2018.01.008.
- 204. Ahmad, P.; Kumar, A.; Gupta, A.; Hu, X.; Ul Rehman Hakeem, K.; Azooz, M.M.; Sharma, S. Polyamines: Role in plants under abiotic stress. W Crop Production for Agricultural Improvement; Springer Netherlands, 2012; T. 9789400741, ss. 491–512 ISBN 9789400741164.
- 205. Carvalho, S.D.; Schwieterman, M.L.; Abrahan, C.E.; Colquhoun, T.A.; Folta, K.M. Light quality dependent changes in morphology, antioxidant capacity, and volatile production in sweet basil (Ocimum basilicum). *Front. Plant Sci.* **2016**, *7*, 203420, doi:10.3389/FPLS.2016.01328/BIBTEX.
- 206. Auge, G.A.; Perelman, S.; Crocco, C.D.; Sánchez, R.A.; Botto, J.F. Gene expression analysis of lightmodulated germination in tomato seeds. *New Phytol.* 2009, 183, 301–314, doi:10.1111/J.1469-8137.2009.02867.X.
- 207. Mastropasqua, L.; Dipierro, N.; Paciolla, C. Effects of darkness and light spectra on nutrients and pigments in radish, soybean, mung bean and pumpkin sprouts. *Antioxidants* 2020, 9, 1–12, doi:10.3390/ANTIOX9060558.
- 208. Colquhoun, T.A.; Schwieterman, M.L.; Gilbert, J.L.; Jaworski, E.A.; Langer, K.M.; Jones, C.R.; Rushing, G. V.; Hunter, T.M.; Olmstead, J.; Clark, D.G.; i in. Light modulation of volatile organic compounds from petunia flowers and select fruits. *Postharvest Biol. Technol.* 2013, *86*, 37–44, doi:10.1016/J.POSTHARVBIO.2013.06.013.
- Hosseini, A.; Zare Mehrjerdi, M.; Aliniaeifard, S.; Seif, M. Photosynthetic and growth responses of green and purple basil plants under different spectral compositions. *Physiol. Mol. Biol. Plants* 2019, 25, 741–752, doi:10.1007/S12298-019-00647-7/FIGURES/9.
- Benech-Arnold, R.L.; Sánchez, R.A.; Forcella, F.; Kruk, B.C.; Ghersa, C.M. Environmental control of dormancy in weed seed banks in soil. *F. Crop. Res.* 2000, 67, 105–122, doi:10.1016/S0378-4290(00)00087-3.
- 211. Bowden, L.; Landais, L. The impact of light and high light on seed germination and the radicle emergence test. *Seed Sci. Technol.* **2018**, *46*, 465–471, doi:10.15258/SST.2018.46.3.03.
- 212. Carta, A.; Skourti, E.; Mattana, E.; Vandelook, F.; Thanos, C.A. Photoinhibition of seed germination: occurrence, ecology and phylogeny. *Seed Sci. Res.* 2017, 27, 131–153, doi:10.1017/S0960258517000137.
- 213. Shinomura, T.; Nagatani, A.; Hanzawa, H.; Kubota, M.; Watanabe, M.; Furuya, M. Action spectra for phytochrome A- and B-specific photoinduction of seed germination in Arabidopsis thaliana. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1996**, *93*, 8129–8133, doi:10.1073/PNAS.93.15.8129.
- 214. Hennig, L.; Stoddart, W.M.; Dieterle, M.; Whitelam, G.C.; Scháfer, E. Phytochrome E Controls Light-Induced Germination of Arabidopsis. *Plant Physiol.* **2002**, *128*, 194–200, doi:10.1104/PP.010559.
- 215. Seo, M.; Hanada, A.; Kuwahara, A.; Endo, A.; Okamoto, M.; Yamauchi, Y.; North, H.; Marion-Poll, A.; Sun, T.P.; Koshiba, T.; i in. Regulation of hormone metabolism in Arabidopsis seeds: phytochrome regulation of abscisic acid metabolism and abscisic acid regulation of gibberellin metabolism. *Plant J.* 2006, 48, 354–366, doi:10.1111/J.1365-313X.2006.02881.X.
- 216. Shichijo, C.; Katada, K.; Tanaka, O.; Hashimoto, T. Phytochrome A-mediated inhibition of seed germination in tomato. *Planta* **2001**, *213*, 764–769, doi:10.1007/S004250100545/METRICS.
- 217. Park, W.T.; Kim, Y.B.; Seo, J.M.; Kim, S.J.; Chung, E.; Lee, J.H.; Park, S.U. Accumulation of anthocyanin and associated gene expression in radish sprouts exposed to light and methyl jasmonate. J. Agric. Food Chem. 2013, 61, 4127–4132, doi:10.1021/JF400164G/ASSET/IMAGES/LARGE/JF-2013-00164G_0004.JPEG.
- 218. Li, Q.; Kubota, C. Effects of supplemental light quality on growth and phytochemicals of baby leaf lettuce. *Environ. Exp. Bot.* 2009, *67*, 59–64, doi:10.1016/J.ENVEXPBOT.2009.06.011.
- 219. Lin, K.H.; Huang, M.Y.; Huang, W.D.; Hsu, M.H.; Yang, Z.W.; Yang, C.M. The effects of red, blue, and white light-emitting diodes on the growth, development, and edible quality of hydroponically grown lettuce (Lactuca sativa L. var. capitata). *Sci. Hortic. (Amsterdam).* 2013, *150*, 86–91, doi:10.1016/J.SCIENTA.2012.10.002.
- 220. Folta, K.M.; Carvalho, S.D. Photoreceptors and control of horticultural plant traits. HortScience 2015,

50, 1274-1280, doi:10.21273/hortsci.50.9.1274.

- 221. Yamazaki, J.Y. Is light quality involved in the regulation of the photosynthetic apparatus in attached rice leaves? *Photosynth. Res.* **2010**, *105*, 63–71, doi:10.1007/S11120-010-9567-3/TABLES/4.
- 222. Johkan, M.; Shoji, K.; Goto, F.; Hashida, S. nosuke; Yoshihara, T. Blue Light-emitting Diode Light Irradiation of Seedlings Improves Seedling Quality and Growth after Transplanting in Red Leaf Lettuce. *HortScience* **2010**, *45*, 1809–1814, doi:10.21273/HORTSCI.45.12.1809.
- 223. Hogewoning, S.W.; Trouwborst, G.; Maljaars, H.; Poorter, H.; van Ieperen, W.; Harbinson, J. Blue light dose-responses of leaf photosynthesis, morphology, and chemical composition of Cucumis sativus grown under different combinations of red and blue light. *J. Exp. Bot.* **2010**, *61*, 3107–3117, doi:10.1093/jxb/erq132.
- 224. Su, N.; Wu, Q.; Shen, Z.; Xia, K.; Cui, J. Effects of light quality on the chloroplastic ultrastructure and photosynthetic characteristics of cucumber seedlings. *Plant Growth Regul.* 2014, 73, 227–235, doi:10.1007/S10725-013-9883-7/FIGURES/5.
- 225. Wang, X.Y.; Xu, X.M.; Cui, J. The importance of blue light for leaf area expansion, development of photosynthetic apparatus, and chloroplast ultrastructure of Cucumis sativus grown under weak light. *Photosynthetica* **2015**, *53*, 213–222, doi:10.1007/s11099-015-0083-8.
- 226. Johkan, M.; Shoji, K.; Goto, F.; Hahida, S.; Yoshihara, T. Effect of green light wavelength and intensity on photomorphogenesis and photosynthesis in Lactuca sativa. *Environ. Exp. Bot.* **2012**, *75*, 128–133, doi:10.1016/J.ENVEXPBOT.2011.08.010.
- 227. Folta, K.M. Green Light Stimulates Early Stem Elongation, Antagonizing Light-Mediated Growth Inhibition. *Plant Physiol.* **2004**, *135*, 1407–1416, doi:10.1104/PP.104.038893.
- 228. Yang, L.; Guo, J.; Pan, A.; Zhang, H.; Zhang, K.; Wang, Z.; Zhang, D. Event-specific quantitative detection of nine genetically modified maizes using one novel standard reference molecule. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 15–24, doi:10.1021/jf0615754.
- 229. Ohashi-Kaneko, K.; Matsuda, R.; Goto, E.; Fujiwara, K.; Kurata, K. Growth of rice plants under red light with or without supplemental blue light. *Soil Sci. Plant Nutr.* **2006**, *52*, 444–452, doi:10.1111/J.1747-0765.2006.00063.X.
- Matsuda, R.; Ohashi-Kaneko, K.; Fujiwara, K.; Goto, E.; Kurata, K. Photosynthetic Characteristics of Rice Leaves Grown under Red Light with or without Supplemental Blue Light. *Plant Cell Physiol.* 2004, 45, 1870–1874, doi:10.1093/PCP/PCH203.
- 231. Khattak, A.B.; Zeb, A.; Bibi, N.; Khalil, S.A.; Khattak, M.S. Influence of germination techniques on phytic acid and polyphenols content of chickpea (Cicer arietinum L.) sprouts. *Food Chem.* **2007**, *104*, 1074–1079, doi:10.1016/J.FOODCHEM.2007.01.022.
- 232. Bouajila, A.; Ammar, H.; Chahine, M.; Khouja, M.; Hamdi, Z.; Khechini, J.; Salem, A.F.Z.M.; Ghorbel, A.; López, S. Changes in phytase activity, phosphorus and phytate contents during grain germination of barley (Hordeum vulgare L.) cultivars. *Agrofor. Syst.* 2020, 94, 1151–1159, doi:10.1007/S10457-019-00443-Y/TABLES/4.
- Dogra, V.; Ahuja, P.S.; Sreenivasulu, Y. Change in protein content during seed germination of a high altitude plant Podophyllum hexandrum Royle. J. Proteomics 2013, 78, 26–38, doi:10.1016/J.JPROT.2012.10.025.
- 234. Schlattner, U.; Wagner, E. The adenylate kinase family in plants: Isoenzyme activity is related to flower induction. *Endocytobiosis Cell Res.* **2001**, *14*, 67–73.
- 235. SCHILTZ, E.; BURGER, S.; GRAFMÜLLER, R.; DEPPERT, W.R.; HAEHNEL, W.; WAGNER, E. Primary structure of maize chloroplast adenylate kinase. *Eur. J. Biochem.* **1994**, *222*, 949–954, doi:10.1111/J.1432-1033.1994.TB18944.X.
- 236. Trojan, A.; Gabryś, H. Chloroplast Distribution in Arabidopsis thaliana (L.) Depends on Light Conditions during Growth. *Plant Physiol.* **1996**, *111*, 419–425, doi:10.1104/PP.111.2.419.
- 237. Kagawa, T.; Wada, M. Blue Light-Induced Chloroplast Relocation in Arabidopsis thaliana as Analyzed by Microbeam Irradiation. *Plant Cell Physiol.* **2000**, *41*, 84–93, doi:10.1093/PCP/41.1.84.
- 238. DeBlasio, S.L.; Luesse, D.L.; Hangarter, R.P. A Plant-Specific Protein Essential for Blue-Light-Induced Chloroplast Movements. *Plant Physiol.* **2005**, *139*, 101–114, doi:10.1104/PP.105.061887.
- Guajardo-Flores, D.; Serna-Guerrero, D.; Serna-Saldívar, S.O.; Jacobo-Velázquez, D.A. Effect of Germination and UV-C Radiation on the Accumulation of Flavonoids and Saponins in Black Bean Seed Coats. *Cereal Chem.* 2014, *91*, 276–279, doi:10.1094/CCHEM-08-13-0172-R.
- 240. SCHOPFER, P.; PLACHY, C. Photoinhibition of radish (Raphanus sativus L) seed germination: control of growth potential by cell-wall yielding in the embryo. *Plant. Cell Environ.* **1993**, *16*, 223–229, doi:10.1111/J.1365-3040.1993.TB00864.X.
- 241. Toyomasu, T.; Tsuji, H.; Yamane, H.; Nakayama, M.; Yamaguchi, I.; Murofushi, N.; Takahashi, N.; Inoue, Y. Light effects on endogenous levels of gibberellins in photoblastic lettuce seeds. J. Plant Growth Regul. 1993, 12, 85–90, doi:10.1007/BF00193238/METRICS.
- 242. Toyomasu, T.; Kawaide, H.; Mitsuhashi, W.; Inoue, Y.; Kamiya, Y. Phytochrome Regulates Gibberellin Biosynthesis during Germination of Photoblastic Lettuce Seeds. *Plant Physiol.* **1998**, *118*, 1517–1523,

doi:10.1104/PP.118.4.1517.

- 243. Yamaguchi, S.; Smith, M.W.; Brown, R.G.S.; Kamiya, Y.; Sun Tai-ping Phytochrome Regulation and Differential Expression of Gibberellin 3β-Hydroxylase Genes in Germinating Arabidopsis Seeds. *Plant Cell* 1998, 10, 2115–2126, doi:10.1105/TPC.10.12.2115.
- 244. Arana, M.V.; De Miguel, L.C.; Sánchez, R.A. A phytochrome-dependent embryonic factor modulates gibberellin responses in the embryo and micropylar endosperm of Datura ferox seeds. *Planta* **2006**, *223*, 847–857, doi:10.1007/S00425-005-0134-7/FIGURES/6.
- 245. Luo, Y.; Liang, J.; Zeng, G.; Chen, M.; Mo, D.; Li, G.; Zhang, D. Seed germination test for toxicity evaluation of compost: Its roles, problems and prospects. *Waste Manag.* 2018, *71*, 109–114, doi:10.1016/J.WASMAN.2017.09.023.
- 246. Qian, B.; Pan, Y.; Cai, Z.; Jing, P. Phytochemical composition, antioxidant capacity and ACE-inhibitory activity of China-grown radish seeds. *J. Appl. Bot. Food Qual.* **2017**, *90*, 315–322, doi:10.5073/JABFQ.2017.090.039.
- 247. Zhang, L.; Ma, G.; Kato, M.; Yamawaki, K.; Takagi, T.; Kiriiwa, Y.; Ikoma, Y.; Matsumoto, H.; Yoshioka, T.; Nesumi, H. Regulation of carotenoid accumulation and the expression of carotenoid metabolic genes in citrus juice sacs in vitro. *J. Exp. Bot.* **2012**, *63*, 871–886, doi:10.1093/JXB/ERR318.
- 248. Xiang, N.; Zhao, Y.; Wang, S.; Guo, X. The modulation of light quality on carotenoids in maize (Zea mays L.) sprouts. *Food Chem. Mol. Sci.* **2022**, *5*, 100128, doi:10.1016/J.FOCHMS.2022.100128.
- 249. Tuan, P.A.; Thwe, A.A.; Kim, Y.B.; Kim, J.K.; Kim, S.J.; Lee, S.; Chung, S.O.; Park, S.U. Effects of white, blue, and red light-emitting diodes on carotenoid biosynthetic gene expression levels and carotenoid accumulation in sprouts of tartary buckwheat (fagopyrum tataricum gaertn.). J. Agric. Food Chem. 2013, 61, 12356–12361, doi:10.1021/JF4039937/ASSET/IMAGES/LARGE/JF-2013-039937_0003.JPEG.
- 250. Wu, M.C.; Hou, C.Y.; Jiang, C.M.; Wang, Y.T.; Wang, C.Y.; Chen, H.H.; Chang, H.M. A novel approach of LED light radiation improves the antioxidant activity of pea seedlings. *Food Chem.* 2007, 101, 1753– 1758, doi:10.1016/J.FOODCHEM.2006.02.010.
- 251. Lefsrud, M.G.; Kopsell, D.A.; Sams, C.E. Irradiance from Distinct Wavelength Light-emitting Diodes Affect Secondary Metabolites in Kale. *HortScience* 2008, 43, 2243–2244, doi:10.21273/HORTSCI.43.7.2243.
- 252. Li, X.; Wu, X.; Huang, L. Correlation between antioxidant activities and phenolic contents of Radix Angelicae Sinensis (Danggui). *Molecules* **2009**, *14*, 5349–5361, doi:10.3390/molecules14125349.
- 253. Shahidi, F.; Ambigaipalan, P. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects A review. J. Funct. Foods 2015, 18, 820–897, doi:10.1016/J.JFF.2015.06.018.
- 254. Qian, H.; Liu, T.; Deng, M.; Miao, H.; Cai, C.; Shen, W.; Wang, Q. Effects of light quality on main health-promoting compounds and antioxidant capacity of Chinese kale sprouts. *Food Chem.* **2016**, *196*, 1232–1238, doi:10.1016/J.FOODCHEM.2015.10.055.
- 255. El-Maarouf-Bouteau, H.; Bailly, C. Oxidative signaling in seed germination and dormancy. *Plant Signal. Behav.* **2008**, *3*, 175–182, doi:10.4161/PSB.3.3.5539.
- 256. Jasicka-Misiak, I.; Makowicz, E.; Stanek, N. Chromatographic fingerprint, antioxidant activity, and colour characteristic of polish goldenrod (Solidago virgaurea L.) honey and flower. *Eur. Food Res. Technol.* 2018, 244, 1169–1184, doi:10.1007/S00217-018-3034-3/TABLES/4.
- 257. Wilczynska, A. Metody oznaczania aktywnosci antyoksydacyjnej miodow pszczelich. *Bromatol. i Chem. Toksykol.* **2009**, *42*, 870–874.
- Chung, I.M.; Paudel, N.; Kim, S.H.; Yu, C.Y.; Ghimire, B.K. The Influence of Light Wavelength on Growth and Antioxidant Capacity in Pachyrhizus erosus (L.) Urban. J. Plant Growth Regul. 2020, 39, 296–312, doi:10.1007/S00344-019-09982-1/TABLES/5.
- 259. Chen, C.; Kim, R.H.; Hwang, K.T.; Kim, J. Chemical compounds and bioactivities of the extracts from radish (Raphanus sativus) sprouts exposed to red and blue light-emitting diodes during cultivation. *Eur. Food Res. Technol.* 2023, 249, 1551–1562, doi:10.1007/s00217-023-04235-8.
- 260. Lepiniec, L.; Debeaujon, I.; Routaboul, J.M.; Baudry, A.; Pourcel, L.; Nesi, N.; Caboche, M. Genetics and biochemistry of seed flavonoids. *Annu. Rev. Plant Biol.* 2006, 57, 405–430, doi:10.1146/ANNUREV.ARPLANT.57.032905.105252/1.
- 261. Samanta, A.; Das, G.; Das, S.K. Roles of flavonoids in plants. Carbon N. Y. 2011, 100, 12–35.
- 262. Kubasek, W.L.; Shirley,'?', B.W.; Mckillop, A.; Goodman, H.M.; Briggs, W.; Ausubel, F.M. Regulation of Flavonoid Biosynthetic Genes in Germinating Arabidopsis Seedlings. *Plant Cell* **1992**, *4*, 1229–1236, doi:10.1105/TPC.4.10.1229.
- 263. Straney, D.; Khan, R.; Tan, R.; Bagga, S. Host Recognition by Pathogenic Fungi Through Plant Flavonoids. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2002, 505, 9–22, doi:10.1007/978-1-4757-5235-9_2.
- 264. Isobe, K.; Tateishi, A.; Nomura, K.; Inoue, H.; Tsuboki, Y. Flavonoids in the extract and exudate of the roots of leguminous crops. *Plant Prod. Sci.* **2001**, *4*, 278–279, doi:10.1626/pps.4.278.
- 265. Scervino, J.M.; Ponce, M.A.; Erra-Bassells, R.; Vierheilig, H.; Ocampo, J.A.; Godeas, A. Flavonoids

exhibit fungal species and genus specific effects on the presymbiotic growth of Gigaspora and Glomus. *Mycol. Res.* **2005**, *109*, 789–794, doi:10.1017/S0953756205002881.

- 266. Shirley, B.W. Flavonoids in seeds and grains: physiological function, agronomic importance and the genetics of biosynthesis. *Seed Sci. Res.* **1998**, *8*, 415–422, doi:10.1017/S0960258500004372.
- 267. Ji, H.; Tang, W.; Zhou, X.; Wu, Y. Combined Effects of Blue and Ultraviolet Lights on the Accumulation of Flavonoids in Tartary Buckwheat Sprouts. *Polish J. Food Nutr. Sci.* **2016**, *66*, 93–98, doi:10.1515/PJFNS-2015-0042.
- 268. Gao, L.; Liu, Y.; Wang, X.; Li, Y.; Han, R. Lower levels of UV-B light trigger the adaptive responses by inducing plant antioxidant metabolism and flavonoid biosynthesis in Medicago sativa seedlings. *Funct. Plant Biol.* 2019, 46, 896–906, doi:10.1071/FP19007.
- 269. Verdaguer, D.; Llorens, L.; Bernal, M.; Badosa, J. Photomorphogenic effects of UVB and UVA radiation on leaves of six Mediterranean sclerophyllous woody species subjected to two different watering regimes at the seedling stage. *Environ. Exp. Bot.* 2012, 79, 66–75, doi:10.1016/J.ENVEXPBOT.2012.01.008.
- 270. Reyes, T.H.; Scartazza, A.; Castagna, A.; Cosio, E.G.; Ranieri, A.; Guglielminetti, L. Physiological effects of short acute UVB treatments in Chenopodium quinoa Willd. *Sci. Rep.* 2018, *8*, 371, doi:10.1038/s41598-017-18710-2.
- 271. Diffey, B.L. Sources and measurement of ultraviolet radiation. *Methods* **2002**, *28*, 4–13, doi:10.1016/S1046-2023(02)00204-9.
- 272. Pilarski, J.; Tokarz, K.; Kocurek, M. Adaptacja roślin do składu spektralnego i intensywności promieniowania. *Pr. Inst. Elektrotechniki* **2012**, *Z. 256*, 223–236.
- 273. Jadidi, M.; Mumivand, H.; Nia, A.E.; Shayganfar, A.; Maggi, F. UV-A and UV-B combined with photosynthetically active radiation change plant growth, antioxidant capacity and essential oil composition of Pelargonium graveolens. *BMC Plant Biol.* **2023**, *23*, 1–14, doi:10.1186/S12870-023-04556-6/TABLES/5.
- 274. Emamverdian, A.; Ding, Y.; Mokhberdoran, F.; Xie, Y. Heavy Metal Stress and Some Mechanisms of Plant Defense Response. *Sci. World J.* 2015, *2015*, 756120, doi:10.1155/2015/756120.
- 275. Schützendübel, A.; Polle, A. Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *J. Exp. Bot.* **2002**, *53*, 1351–1365, doi:10.1093/JEXBOT/53.372.1351.
- 276. Hossain, M.A.; Piyatida, P.; Silva, J.A.T. da; Fujita, M. Molecular Mechanism of Heavy Metal Toxicity and Tolerance in Plants: Central Role of Glutathione in Detoxification of Reactive Oxygen Species and Methylglyoxal and in Heavy Metal Chelation. J. Bot. 2012, 2012, 872875, doi:10.1155/2012/872875.
- 277. Farid, M.; Shakoor, M.B.; Ehsan, S.; Ali, S.; Zubair, M.; Hanif, M. Morphological, physiological and biochemical responses of different plant species to Cd stress. *Int. J. Chem. Biochem. Sci.* **2013**, *3*, 53–60.
- 278. Al Mahmud, J.; Bhuyan, M.H.M.B.; Anee, T.I.; Nahar, K.; Fujita, M.; Hasanuzzaman, M. Reactive oxygen species metabolism and antioxidant defense in plants under metal/metalloid stress. *Plant Abiotic Stress Toler. Agron. Mol. Biotechnol. Approaches* 2019, 221–257, doi:10.1007/978-3-030-06118-0 10/FIGURES/4.
- 279. Gill, M. Heavy metal stress in plants: a review. Int. J. Adv. Res. 2014, 2, 1043–1055.
- 280. Sharma, S.S.; Dietz, K.J. The relationship between metal toxicity and cellular redox imbalance. *Trends Plant Sci.* **2009**, *14*, 43–50, doi:10.1016/j.tplants.2008.10.007.
- 281. Fargašová, A. Toxicity comparison of some possible toxic metals (Cd, Cu, Pb, Se, Zn) on young seedlings of Sinapis alba L. *Plant, Soil Environ.* **2004**, *50*, 33–38, doi:10.17221/3639-pse.
- 282. Mir, A.R.; Pichtel, J.; Hayat, S. Copper: uptake, toxicity and tolerance in plants and management of Cucontaminated soil. *BioMetals* 2021, *34*, 737–759.
- 283. Brown, P.H.; Cakmak, I.; Zhang, Q. Form and Function of Zinc Plants. *Zinc Soils Plants* **1993**, 93–106, doi:10.1007/978-94-011-0878-2_7.
- 284. Wissuwa, M.; Ismail, A.M.; Yanagihara, S. Effects of Zinc Deficiency on Rice Growth and Genetic Factors Contributing to Tolerance. *Plant Physiol.* **2006**, *142*, 731–741, doi:10.1104/PP.106.085225.
- 285. Arif, N.; Yadav, V.; Singh, S.; Singh, S.; Ahmad, P.; Mishra, R.K.; Sharma, S.; Tripathi, D.K.; Dubey, N.K.; Chauhan, D.K. Influence of high and low levels of plant-beneficial heavy metal ions on plant growth and development. *Front. Environ. Sci.* 2016, *4*, 217521, doi:10.3389/FENVS.2016.00069/BIBTEX.
- 286. Martins, L.L.; Mourato, M.P. Effect of Excess Copper on Tomato Plants: Growth Parameters, Enzyme Activities, Chlorophyll, and Mineral Content. J. Plant Nutr. 2006, 29, 2179–2198, doi:10.1080/01904160600972845.
- 287. Sun, B.Y.; Kan, S.H.; Zhang, Y.Z.; Deng, S.H.; Wu, J.; Yuan, H.; Qi, H.; Yang, G.; Li, L.; Zhang, X.H.; i in. Certain antioxidant enzymes and lipid peroxidation of radish (Raphanus sativus L.) as early warning biomarkers of soil copper exposure. *J. Hazard. Mater.* 2010, *183*, 833–838, doi:10.1016/J.JHAZMAT.2010.07.102.
- 288. Cade-Menun, B.J. Characterizing phosphorus in environmental and agricultural samples by 31P nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Talanta* **2005**, *66*, 359–371, doi:10.1016/j.talanta.2004.12.024.

- 289. Chaffai, R.; Elhammadi, M.A.; Seybou, T.N.; Tekitek, A.; Marzouk, B.; El Ferjani, E. Altered Fatty Acid Profile of Polar Lipids in Maize Seedlings in Response to Excess Copper. J. Agron. Crop Sci. 2007, 193, 207–217, doi:10.1111/J.1439-037X.2007.00252.X.
- 290. Berghetti, Á.L.P.; Wohlenberg, M.D.; da Silva, J.A.; Rodrigues, L.A.T.; Sarfaraz, Q.; de Conti, L.; Tiecher, T.L.; Tabaldi, L.A.; Stefanello, L.O.; Brunetto, G. Increase in phosphorus concentration reduces the toxicity of copper in wheat roots (Triticum aestivum L.). *J. Plant Nutr.* **2022**, *45*, 713–726, doi:10.1080/01904167.2021.1956533.
- 291. Kabala, K.; Janicka-Russak, M.; Anklewicz, A. Mechanism of Cd and Cu action on the tonoplast proton pumps in cucumber roots. *Physiol. Plant.* **2013**, *147*, 207–217, doi:10.1111/J.1399-3054.2012.01655.X.
- 292. Kawachi, M.; Kobae, Y.; Mori, H.; Tomioka, R.; Lee, Y.; Maeshima, M. A Mutant Strain Arabidopsis thaliana that Lacks Vacuolar Membrane Zinc Transporter MTP1 Revealed the Latent Tolerance to Excessive Zinc. *Plant Cell Physiol.* **2009**, *50*, 1156–1170, doi:10.1093/PCP/PCP067.
- 293. Das, N.; Tirunagari, P.; Maiti, M.K. Plant Metal Tolerance Proteins: Insight into Their Roles in Metal Transport and Homeostasis for Future Biotechnological Applications. W *Plant Metal and Metalloid Transporters*; Springer, Singapore, 2022; ss. 289–304 ISBN 978-981-19-6103-8.
- 294. Sharma, S.S.; Dietz, K.J.; Mimura, T. Vacuolar compartmentalization as indispensable component of heavy metal detoxification in plants. *Plant. Cell Environ.* **2016**, *39*, 1112–1126, doi:10.1111/PCE.12706.
- 295. Coleman, J.E. Zinc enzymes. Curr. Opin. Chem. Biol. 1998, 2, 222-234, doi:10.1016/S1367-5931(98)80064-1.
- 296. Lavrent'yeva, S.I.; Ivachenko, L.Y.; Golokhvast, K.S.; Nawaz, M.A. Ribonuclease activity of Glycine max and Glycine soja sprouts as a marker adaptation to copper sulphate and zinc sulphate toxicity. *Biochem. Syst. Ecol.* **2019**, *83*, 66–70, doi:10.1016/J.BSE.2019.01.007.
- 297. PAIVOKE, A. The short-term effects of zinc on the growth, anatomy and acid phosphatase activity of pea seedlings. *Ann. Bot. Fenn.* **1983**, *20*, 197–203.
- 298. Coban, H.B.; Demirci, A. Phytase as a Diet Ingredient: From Microbial Production to Its Applications in Food and Feed Industry. *Microb. Prod. Food Ingredients Addit.* 2017, 33–55, doi:10.1016/B978-0-12-811520-6.00002-7.
- 299. Guerrand, D. Economics of food and feed enzymes: Status and prospectives. *Enzym. Hum. Anim. Nutr. Princ. Perspect.* 2018, 487–514, doi:10.1016/B978-0-12-805419-2.00026-5.
- 300. Liu, B.L.; Rafiq, A.; Tzeng, Y.M.; Rob, A. The Induction and Characterization of Phytase and Beyond. *Enzyme Microb. Technol.* **1998**, *22*, 415–424, doi:10.1016/S0141-0229(97)00210-X.
- 301. Salmon, D.N.X.; Piva, L.C.; Binati, R.L.; Rodrigues, C.; Vandenberghe, L.P.D.S.; Soccol, C.R.; Spier, M.R. A bioprocess for the production of phytase from Schizophyllum commune: Studies of its optimization, profile of fermentation parameters, characterization and stability. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 2012, 35, 1067–1079, doi:10.1007/S00449-012-0692-6/FIGURES/7.
- 302. Ullah, A.H.J.; Sethumadhavan, K. Differences in the active site environment of aspergillus ficuum phytases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1998**, *243*, 458–462, doi:10.1006/bbrc.1998.8117.
- 303. Guo, J.; Bian, Y.Y.; Zhu, K.X.; Guo, X.N.; Peng, W.; Zhou, H.M. Activation of endogenous phytase and degradation of phytate in wheat bran. J. Agric. Food Chem. 2015, 63, 1082–1087, doi:10.1021/JF504319T/ASSET/IMAGES/LARGE/JF-2014-04319T 0003.JPEG.
- 304. Chatterjee, C.; Sinha, P.; Dube, B.; Gopal, R. Excess copper-induced oxidative damages and changes in radish physiology. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* **2006**, *37*, 2069–2076, doi:10.1080/00103620600770425.
- 305. Führs, H.; Hartwig, M.; Molina, L.E.B.; Heintz, D.; Van Dorsselaer, A.; Braun, H.P.; Horst, W.J. Early manganese-toxicity response in Vigna unguiculata L. a proteomic and transcriptomic study. *Proteomics* 2008, *8*, 149–159, doi:10.1002/PMIC.200700478.
- 306. Zhao, W.; Ma, T.; Zhou, P.; Wu, Z.; Tan, Z.; Rui, Y. Insights into the effect of manganese-based nanomaterials on the distribution trait and nutrition of radish (Raphanus sativus L.). *Plant Physiol. Biochem.* **2024**, *207*, 108428, doi:10.1016/J.PLAPHY.2024.108428.
- 307. Rajpoot, R.; Srivastava, R.K.; Rani, A.; Pandey, P.; Dubey, R.S. Manganese-induced oxidative stress, ultrastructural changes, and proteomics studies in rice plants. *Protoplasma* 2021, 258, 319–335, doi:10.1007/S00709-020-01575-0/TABLES/1.
- 308. Ghori, N.H.; Ghori, T.; Hayat, M.Q.; Imadi, S.R.; Gul, A.; Altay, V.; Ozturk, M. Heavy metal stress and responses in plants. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* 2019, *16*, 1807–1828.
- 309. Grossi, L. Changes in adenine nucleotide levels and energy charge in germinating seeds of Alyssum bertolonii in presence of heavy metals. *Biochem. und Physiol. der Pflanz.* **1985**, *180*, 277–283, doi:10.1016/s0015-3796(85)80003-2.
- 310. Keunen, E.; Remans, T.; Bohler, S.; Vangronsveld, J.; Cuypers, A. Metal-induced oxidative stress and plant mitochondria. *Int. J. Mol. Sci.* 2011, *12*, 6894–6918.
- 311. Nouet, C.; Motte, P.; Hanikenne, M. Chloroplastic and mitochondrial metal homeostasis. *Trends Plant Sci.* 2011, *16*, 395–404, doi:10.1016/J.TPLANTS.2011.03.005.
- 312. Tan, Y.F.; O'Toole, N.; Taylor, N.L.; Harvey Millar, A. Divalent Metal Ions in Plant Mitochondria and

Their Role in Interactions with Proteins and Oxidative Stress-Induced Damage to Respiratory Function. *Plant Physiol.* **2010**, *152*, 747–761, doi:10.1104/PP.109.147942.

- 313. Espen, L.; Pirovano, L.; Cocucci, S.M. Effects of Ni2+ during the early phases of radish (Raphanus sativus) seed germination. *Environ. Exp. Bot.* **1997**, *38*, 187–197, doi:10.1016/S0098-8472(97)00011-7.
- 314. Li, W.; Khan, M.A.; Yamaguchi, S.; Kamiya, Y. Effects of heavy metals on seed germination and early seedling growth of Arabidopsis thaliana. *Plant Growth Regul.* 2005, 46, 45–50, doi:10.1007/S10725-005-6324-2/METRICS.
- 315. Radchuk, V.; Borisjuk, L. Physical, metabolic and developmental functions of the seed coat. *Front. Plant Sci.* **2014**, *5*, 102496, doi:10.3389/FPLS.2014.00510/BIBTEX.
- 316. Jogawat, A.; Yadav, B.; Chhaya; Narayan, O.P. Metal transporters in organelles and their roles in heavy metal transportation and sequestration mechanisms in plants. *Physiol. Plant.* **2021**, *173*, 259–275, doi:10.1111/PPL.13370.
- 317. Reichman, S.M. The Responses of Plants to Metal Toxicity : A review focusing on Copper, Manganese and Zinc; Australian Minerals & Energy Environment Foundation: Melbourne, 2014; ISBN 187620513X.
- 318. EL-BELTAGI, H.S.; MOHAMED, A.A.; RASHED, M.M. Response of antioxidative enzymes to cadmium stress in leaves and roots of radish (Raphanus sativus L.). *Not. Sci. Biol.* 2010, *2*, 76–82, doi:10.15835/nsb245395.
- 319. Benzarti, S.; Mohri, S.; Ono, Y. Plant response to heavy metal toxicity: Comparative study between the hyperaccumulator Thlaspi caerulescens (ecotype Ganges) and nonaccumulator plants: Lettuce, radish, and alfalfa. *Environ. Toxicol.* **2008**, *23*, 607–616, doi:10.1002/TOX.20405.
- 320. Kösesakal, T.; Yüzbaşioğlu, E.; Kaplan, E.; Bariş, Ç.; Yüzbaşioğlu, S.; Belivermiş, M.; Cevahir-Öz, G.; Ünal, M. Uptake, accumulation and some biochemical responses in Raphanus sativus L. to zinc stress. *African J. Biotechnol.* **2011**, *10*, 5993–6000, doi:10.5897/AJB11.012.
- 321. Zhang, H.; Xu, Z.; Guo, K.; Huo, Y.; He, G.; Sun, H.; Guan, Y.; Xu, N.; Yang, W.; Sun, G. Toxic effects of heavy metal Cd and Zn on chlorophyll, carotenoid metabolism and photosynthetic function in tobacco leaves revealed by physiological and proteomics analysis. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2020, 202, 110856, doi:10.1016/J.ECOENV.2020.110856.
- 322. Siddiqui, M.M.; Abbasi, B.H.; Ahmad, N.; Ali, M.; Mahmood, T. Toxic effects of heavy metals (Cd, Cr and Pb) on seed germination and growth and DPPH-scavenging activity in Brassica rapa var. turnip. *Toxicol. Ind. Health* **2014**, *30*, 238–249, doi:10.1177/0748233712452605.
- 323. Kranner, I.; Colville, L. Metals and seeds: Biochemical and molecular implications and their significance for seed germination. *Environ. Exp. Bot.* **2011**, *72*, 93–105, doi:10.1016/J.ENVEXPBOT.2010.05.005.
- 324. Wawrzyński, A.; Kopera, E.; Wawrzyńska, A.; Kamińska, J.; Bal, W.; Sirko, A. Effects of simultaneous expression of heterologous genes involved in phytochelatin biosynthesis on thiol content and cadmium accumulation in tobacco plants. *J. Exp. Bot.* **2006**, *57*, 2173–2182, doi:10.1093/JXB/ERJ176.
- 325. Saed-Moucheshi, A.; Shekoofa, A.; Pessarakli, M. Reactive Oxygen Species (ROS) Generation and Detoxifying in Plants. *J. Plant Nutr.* **2014**, *37*, 1573–1585, doi:10.1080/01904167.2013.868483.
- 326. Yadav, S.K. Heavy metals toxicity in plants: An overview on the role of glutathione and phytochelatins in heavy metal stress tolerance of plants. *South African J. Bot.* **2010**, *76*, 167–179, doi:10.1016/J.SAJB.2009.10.007.
- 327. Das, K.; Roychoudhury, A. Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROSscavengers during environmental stress in plants. *Front. Environ. Sci.* 2014, *2*, 121942, doi:10.3389/FENVS.2014.00053/BIBTEX.
- 328. Bielen, A.; Remans, T.; Vangronsveld, J.; Cuypers, A. The influence of metal stress on the availability and redox state of ascorbate, and possible interference with its cellular functions. *Int. J. Mol. Sci.* 2013, *14*, 6382–6413.
- Drązkiewicz, M.; Skórzyńska-Polit, E.; Krupa, Z. Response of the ascorbate–glutathione cycle to excess copper in Arabidopsis thaliana (L.). *Plant Sci.* 2003, *164*, 195–202, doi:10.1016/S0168-9452(02)00383-7.
- Cuypers, A.; Vangronsveld, J.; Clijsters, H. The redox status of plant cells (AsA and GSH) is sensitive to zinc imposed oxidative stress in roots and primary leaves of Phaseolus vulgaris. *Plant Physiol. Biochem.* 2001, 39, 657–664, doi:10.1016/S0981-9428(01)01276-1.
- 331. Fecht-Christoffers, M.M.; Maier, P.; Horst, W.J. Apoplastic peroxidases and ascorbate are involved in manganese toxicity and tolerance of Vigna unguiculata. *Physiol. Plant.* **2003**, *117*, 237–244, doi:10.1034/J.1399-3054.2003.00022.X.
- 332. Ramakrishna, B.; Rao, S.S.R. 24-Epibrassinolide alleviated zinc-induced oxidative stress in radish (Raphanus sativus L.) seedlings by enhancing antioxidative system. *Plant Growth Regul.* 2012, 68, 249– 259, doi:10.1007/S10725-012-9713-3/FIGURES/5.
- PANDOLFINI, T.; GABBRIELLI, R.; COMPARINI, C. Nickel toxicity and peroxidase activity in seedlings of Triticum aestivum L. *Plant. Cell Environ.* 1992, 15, 719–725, doi:10.1111/J.1365-3040.1992.TB01014.X.

- 334. Kidd, P.S.; Llugany, M.; Poschenrieder, C.; Gunsé, B.; Barceló, J. The role of root exudates in aluminium resistance and silicon-induced amelioration of aluminium toxicity in three varieties of maize (Zea mays L.). *J. Exp. Bot.* 2001, *52*, 1339–1352, doi:10.1093/JEXBOT/52.359.1339.
- 335. FUHRER, J. Early effects of excess cadmium uptake in Phaseolus vulgaris. *Plant. Cell Environ.* **1982**, *5*, 263–270, doi:10.1111/1365-3040.EP11572648.
- 336. Choudhary, S.P.; Bhardwaj, R.; Gupta, B.D.; Dutt, P.; Gupta, R.K.; Kanwar, M.; Biondi, S. Enhancing effects of 24-epibrassinolide and Putrescine on the antioxidant capacity and free radical scavenging activity of Raphanus sativus seedlings under Cu ion stress. *Acta Physiol. Plant.* **2011**, *33*, 1319–1333, doi:10.1007/S11738-010-0665-9/FIGURES/13.
- 337. Kafka, A.; Wieczorek, D.; Żyszka-Haberecht, B.; Lipok, J. Metabolic Study of Cucumber Seeds and Seedlings in the Light of the New, Controversial Trend of Preventive Use of Systemic Fungicides. *Int. J. Mol. Sci.* 2023, 24, doi:10.3390/IJMS24065554.
- 338. Knowles, L.; Trimble, M.R.; Knowles, N.R. Phosphorus status affects postharvest respiration, membrane permeability and lipid chemistry of European seedless cucumber fruit (Cucumis sativus L.). *Postharvest Biol. Technol.* 2001, 21, 179–188, doi:10.1016/S0925-5214(00)00144-7.
- 339. Fadh, H.A.; Al-Hadithi, B.A.A.A.; Fadhl, H.A.; Al-Hadithi, B.A.A.A. The Effect of Fungi Inoculation Solvent Phosphate in Increasing Phosphorus availability in Calcareous Soil and its Concentration in Cucumis sativus L. Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci. 2016, 5, 750–763, doi:10.20546/ijcmas.2016.509.086.
- 340. Kaya, C.; Kirnak, H.; Higgs, D. Effects of supplementary potassium and phosphorus on physiological development and mineral nutrition of cucumber and pepper cultivars grown at high salinity (NaCl). *J. Plant Nutr.* **2001**, *24*, 1457–1471, doi:10.1081/PLN-100106995.
- 341. Sacała, E.; Demczuk, A.; Grzyś, E.; Spiak, Z. Effect of salt and water stresses on growth, nitrogen and phosphorus metabolism in Cucumis sativus L. seedlings. *Acta Soc. Bot. Pol.* 2008, 77, 23–28, doi:10.5586/asbp.2008.003.
- 342. Tanaka, K.; Fukuda, M.; Amaki, Y.; Sakaguchi, T.; Inai, K.; Ishihara, A.; Nakajima, H. Importance of prumycin produced by Bacillus amyloliquefaciens SD-32 in biocontrol against cucumber powdery mildew disease. *Pest Manag. Sci.* 2017, *73*, 2419–2428, doi:10.1002/ps.4630.
- 343. Oerke, E.C.; Steiner, U.; Dehne, H.W.; Lindenthal, M. Thermal imaging of cucumber leaves affected by downy mildew and environmental conditions. *J. Exp. Bot.* **2006**, *57*, 2121–2132, doi:10.1093/jxb/erj170.
- 344. Wang, Y.; VandenLangenberg, K.; Wehner, T.C.; Kraan, P.A.G.; Suelmann, J.; Zheng, X.; Owens, K.; Weng, Y. QTL mapping for downy mildew resistance in cucumber inbred line WI7120 (PI 330628). *Theor. Appl. Genet.* 2016, 129, 1493–1505, doi:10.1007/s00122-016-2719-x.
- 345. Mohamed, A.; Hamza, A.; Derbalah, A. Recent approaches for controlling downy mildew of cucumber under greenhouse conditions. *Plant Prot. Sci.* **2016**, *52*, 1–9, doi:10.17221/63/2015-PPS.
- 346. Ni, L.; Punja, Z.K. Management of powdery mildew on greenhouse cucumber (Cucumis sativus L.) plants using biological and chemical approaches. *Can. J. Plant Pathol.* **2021**, *43*, 35–42, doi:10.1080/07060661.2020.1746694.
- 347. Ojiambo, P.S.; Paul, P.A.; Holmes, G.J. A quantitative review of fungicide efficacy for managing downy mildew in cucurbits. *Phytopathology* **2010**, *100*, 109–115, doi:10.1094/PHYTO-12-09-0348.
- 348. Petit, A.N.; Fontaine, F.; Vatsa, P.; Clément, C.; Vaillant-Gaveau, N. Fungicide impacts on photosynthesis in crop plants. *Photosynth. Res.* **2012**, *111*, 315–326, doi:10.1007/s11120-012-9719-8.
- 349. Yang, H.; Zhang, Y.; Shi, H. Analysis of genes and metabolites associated with propamocarb hydrochloride response in tobacco. *Agron. J.* **2020**, *112*, 4939–4950, doi:10.1002/agj2.20368.
- 350. Wu, P.; Qin, Z.; Zhao, W.; Zhou, X.; Wu, T.; Xin, M.; Guo, Q. Transcriptome analysis reveals differentially expressed genes associated with propamocarb response in cucumber (Cucumis sativus L.) fruit. *Acta Physiol. Plant.* **2013**, *35*, 2393–2406, doi:10.1007/s11738-013-1274-1.
- 351. Wu, P.; Qin, Z. wei; Wu, T.; Zhou, X. yan; Xin, M.; Guo, Q. qian Proteomic Analysis of Cucumber Defense Responses Induced by Propamocarb. J. Integr. Agric. 2013, 12, 2022–2035, doi:10.1016/S2095-3119(13)60370-6.
- 352. Zhang, F.; Qin, Z.; Zhou, X.; Xin, M.; Li, S.; Luan, J. Expression and functional analysis of the propamocarb-related gene CsMAPEG in cucumber. *BMC Plant Biol.* 2019, 19, 1–18, doi:10.1186/S12870-019-1971-Z/FIGURES/9.
- 353. Wu, P.; Guo, Q. qian; Qin, Z. wei The fungicide propamocarb increases lignin by activating the phenylpropanoid pathway in Cucumis sativus L. *Hortic. Environ. Biotechnol.* 2016, *57*, 511–518, doi:10.1007/s13580-016-0049-1.
- 354. Mohsin, S.M.; Hasanuzzaman, M.; Borhannuddin Bhuyan, M.H.M.; Parvin, K.; Fujita, M. Exogenous tebuconazole and trifloxystrobin regulates reactive oxygen species metabolism toward mitigating salt-induced damages in cucumber seedling. *Plants* **2019**, *8*, 428, doi:10.3390/plants8100428.
- 355. Grossmann, K.; Kwiatkowski, J.; Caspar, Gü. Regulation of phytohormone levels, leaf senescence and transpiration by the strobilurin kresoxim-methyl in wheat (Triticum aestivum). *J. Plant Physiol.* **1999**, *154*, 805–808, doi:10.1016/S0176-1617(99)80262-4.

- 356. Amaro, A.C.E.; Ramos, A.R.P.; Macedo, A.C.; Ono, E.O.; Rodrigues, J.D. Effects of the fungicides azoxystrobin, pyraclostrobin and boscalid on the physiology of Japanese cucumber. *Sci. Hortic.* (*Amsterdam*). 2018, 228, 66–75, doi:10.1016/j.scienta.2017.10.016.
- 357. Porlingis, I.C.; Koukourikou-Petridou, M. Promotion of adventitious root formation in mung bean cuttings by four triazole growth retardants. J. Hortic. Sci. **1996**, 71, 573–579, doi:10.1080/14620316.1996.11515437.
- 358. Kishorekumar, A.; Jaleel, C.A.; Manivannan, P.; Sankar, B.; Sridharan, R.; Panneerselvam, R. Comparative effects of different triazole compounds on growth, photosynthetic pigments and carbohydrate metabolism of Solenostemon rotundifolius. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2007**, *60*, 207–212, doi:10.1016/j.colsurfb.2007.06.008.
- 359. Diaz-Espejo, A.; Cuevas, M.V.; Ribas-Carbo, M.; Flexas, J.; Martorell, S.; Fernández, J.E. The effect of strobilurins on leaf gas exchange, water use efficiency and ABA content in grapevine under field conditions. *J. Plant Physiol.* **2012**, *169*, 379–386, doi:10.1016/j.jplph.2011.11.014.
- 360. Li, Y.; Dong, F.; Liu, X.; Xu, J.; Li, J.; Kong, Z.; Chen, X.; Liang, X.; Zheng, Y. Simultaneous enantioselective determination of triazole fungicides in soil and water by chiral liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2012**, *1224*, 51–60, doi:10.1016/j.chroma.2011.12.044.
- 361. Bian, Y.; Guo, G.; Liu, F.; Chen, X.; Wang, Z.; Hou, T. Meptyldinocap and azoxystrobin residue behaviors in different ecosystems under open field conditions and distribution on processed cucumber. J. Sci. Food Agric. 2020, 100, 648–655, doi:10.1002/jsfa.10059.
- 362. Dias, M.C. Phytotoxicity: An Overview of the Physiological Responses of Plants Exposed to Fungicides. *J. Bot.* **2012**, *2012*, 1–4, doi:10.1155/2012/135479.
- 363. Raveneau, M.P.; Benamar, A.; MacHerel, D. Water content, adenylate kinase, and mitochondria drive adenylate balance in dehydrating and imbibing seeds. *J. Exp. Bot.* **2017**, *68*, 3501–3512, doi:10.1093/jxb/erx182.
- Al-Ani, A.; Bruzau, F.F.; Raymond, P.; Saint-Ges, V.V.; Leblanc, J.M.; Pradet, A. Germination, Respiration, and Adenylate Energy Charge of Seeds at Various Oxygen Partial Pressures. *Plant Physiol.* 1985, 79, 885–890, doi:10.1104/pp.79.3.885.
- 365. Chen, L.; Tan, G.J.T.; Pang, X.; Yuan, W.; Lai, S.; Yang, H. Energy Regulated Nutritive and Antioxidant Properties during the Germination and Sprouting of Broccoli Sprouts (Brassica oleracea var. italica). J. Agric. Food Chem. 2018, 66, 6975–6985, doi:10.1021/acs.jafc.8b00466.
- 366. Kruma, Z.; Tomsone, L.; Ķince, T.; Galoburda, R.; Senhofa, S.; Sabovics, M.; Straumite, E.; Sturite, I. Effects of germination on total phenolic compounds and radical scavenging activity in hull-less spring cereals and triticale. *Agron. Res.* **2016**, *14*, 1372–1383.
- 367. Shanmugapriya, A..; Sivakumar, T.; Panneerselvam, R. Difenoconazole and Tricyclazole induced changes in photosynthetic pigments of Lycopersicon esculentum, L. *Int. J. Agric. Food Sci.* **2013**, *2*, 72–75.
- 368. Ng, L.M.; Ng, L.M. Abscisic Acid Signalling as a Target for Enhancing Drought Tolerance. W *Abiotic* and *Biotic Stress in Plants - Recent Advances and Future Perspectives*; IntechOpen, 2016 ISBN 978-953-51-2250-0.
- 369. Ali, S.; Hayat, K.; Iqbal, A.; Xie, L. Implications of abscisic acid in the drought stress tolerance of plants. *Agronomy* **2020**, *10*, 1323, doi:10.3390/agronomy10091323.
- 370. Vishwakarma, K.; Upadhyay, N.; Kumar, N.; Yadav, G.; Singh, J.; Mishra, R.K.; Kumar, V.; Verma, R.; Upadhyay, R.G.; Pandey, M.; i in. Abscisic acid signaling and abiotic stress tolerance in plants: A review on current knowledge and future prospects. *Front. Plant Sci.* **2017**, *8*, 161, doi:10.3389/fpls.2017.00161.
- 371. Jaleel, C.A.; Manivannan, P.; Wahid, A.; Farooq, M.; Somasundaram, R.; Panneerselvam, R.; Al-Juburi, H.J.; Somasundaram, R.; Panneerselvam, R. Drought stress in plants: A review on morphological characteristics and pigments composition. *Int. J. Agric. Biol.* 2009, *11*, 100–105.
- 372. Parida, A.; Dam, A.B.; Dam, P.; Das, A.B.; Das, P. NaCl stress causes changes in photosynthetic pigments, proteins, and other metabolic components in the leaves of a true mangrove, Bruguiera parviflora, in hydroponic cultures. *J. Plant Biol.* **2002**, *45*, 28–36, doi:10.1007/bf03030429.
- 373. Shahid, M.; Ahmed, B.; Zaidi, A.; Khan, M.S. Toxicity of fungicides to: Pisum sativum: A study of oxidative damage, growth suppression, cellular death and morpho-anatomical changes. *RSC Adv.* 2018, 8, 38483–38498, doi:10.1039/c8ra03923b.
- 374. Borowy, A.; Kapłan, M.; Doluk, A. Evaluation of Infinito 687,5 SC Fungicide Usefulness for Downy Mildew Control in Cucumber Field Cultivation. *Curr. Investig. Agric. Curr. Res.* 2019, *6*, 858–859, doi:10.32474/ciacr.2019.06.000247.
- 375. Tak, Y.; Kumar, M. Phenolics: A Key Defence Secondary Metabolite to Counter Biotic Stress. W Plant Phenolics in Sustainable Agriculture; Springer, Singapore, 2020; T. 1, ss. 309–329 ISBN 978-981-15-4890-1.
- 376. Caretto, S.; Linsalata, V.; Colella, G.; Mita, G.; Lattanzio, V. Carbon fluxes between primary metabolism and phenolic pathway in plant tissues under stress. *Int. J. Mol. Sci.* 2015, *16*, 26378–26394,

doi:10.3390/ijms161125967.

377. Takahashi, N.; Sunohara, Y.; Fujiwara, M.; Matsumoto, H. Improved tolerance to transplanting injury and chilling stress in rice seedlings treated with orysastrobin. *Plant Physiol. Biochem.* **2017**, *113*, 161–167, doi:10.1016/j.plaphy.2017.02.004.

Dorobek naukowy

Publikacje:

- 1. <u>Kafka A.</u>, Wieczorek D., Żyszka-Haberecht B., Lipok J. *Metabolic study of cucumber seeds and seedlings in the light of the new, controversial trend of preventive use of systemic fungicides,* International Journal of Molecular Science, 2023, 24.6: 5554
- 2. Wieczorek D., Żyszka-Haberecht B., <u>Kafka A.</u>, Lipok J. Determination of phosphorus compounds in plant tissues: from colourimetry to advanced instrumental analytical chemistry, Plant Methods, 2022, 18.1: 22
- 3. Wieczorek D., Żyszka-Haberecht B., **Kafka A.**, Lipok J. Phosphonates as unique components of plant seeds—a promising approach to use phosphorus profiles in plant chemotaxonomy, International Journal of Molecular Science, 2021, 22.21: 11501
- 4. <u>Kafka A.</u>, Wieczorek D., Lipok J. Metody oznaczania chemicznych połączeń fosforu wyekstrahowanych z matrycy biologicznej, w: Na Pograniczu Chemii i Biologii XXXIX, red. Koroniak H, Barciszewski J, Wydawnictwo Naukowe UAM, Poznań 2019, s. 211-222

Ustne wystąpienia konferencyjne:

- 1. <u>Kafka A</u>, Bartela O., Wieczorek D., Lipok J. *Wpływ jonów miedzi(II) na rozwój i wartości odżywcze kiełków rzodkiewki*, 64. Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Chemicznego (Lublin, 11-16 IX 2022)
- Kafka A, Rudyk A., Wieczorek D., Lipok J. Wpływ światła UV na rozwój i wartości odżywcze kiełków rzodkiewki, XVIII Ogólnopolskie Seminarium dla Doktorantów i Studentów "Na pograniczu Chemii i Biologii" (Smardzewice, 12-15 VI 2022)
- 3. <u>Kafka A</u>, Wieczorek D., Lipok J. *Dobór sposobów ekstrakcji związków fosforu z nasion roślin należących do różnych jednostek taksonomicznych*, 62. Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Chemicznego (Warszawa, 2-6 IX 2019)
- 4. <u>Kafka A</u>, Praet K., Wieczorek D., Lipok J. *Metody oznaczania chemicznych połączeń fosforu wyekstrahowanych z matrycy biologicznej*, XVII Ogólnopolskie Seminarium dla Doktorantów i Studentów "Na pograniczu chemii i biologii" (Jastrzębia Góra, *12-15 V 2019*)
- 5. <u>Kafka A</u>, Wieczorek D. *Bakteriobójcze i bakteriostatyczne właściwości organicznych związków boru*, Zjazd Wiosenny Sekcji Studenckiej Polskiego Towarzystwa Chemicznego (Ustroń, *10-14 IV 2019*)

Wystąpienia konferencyjne w formie plakatu:

- 1. Manowska N., <u>Kafka A.</u>, Lipok J. *Wpływ wybranych jonów metali na rozwój rzodkiewki*, Zjazd Zimowy SMPTChem (Opole, *12 XII 2022*)
- Kafka A., Wieczorek D, Żyszka-Haberecht B., Lipok J. Effect of triazole and strobilurin fungicideson phosphorus compounds in cucumber sprouts, 23rd International Conference On Phosphorus Chemistry (ICPC23) (Częstochowa, 5 – 9 VII 2021)
- Wieczorek D, Żyszka-Haberecht B., Kafka A., Lipok J. Phosphonate compounds as the unique components of plant seeds, 23rd International Conference On Phosphorus Chemistry (ICPC23) (Częstochowa, 5 9 VII 2021)
- Żyszka-Haberecht B., Wieczorek D., Kafka A., Lipok J. Effect of different colours of light on phosphorus profiles, nutrients and pigments in radish sprouts, 23rd International Conference On Phosphorus Chemistry (ICPC23) (Częstochowa, 5 – 9 VII 2021)
- Kafka A., Wieczorek D, Żyszka-Haberecht B., Lipok J. Phosphorus compounds in seeds of some crop plants – similarities and differences, Quo Vadis Life Sciences Conference (Opole, 23-27 VI 2021)

- 6. <u>Kafka A.</u>, Wieczorek D, Żyszka-Haberecht B., Lipok J. *Phosphoric profiles of the dry seeds of some crop plants*, Zjazd Zimowy Sekcji Studenckiej Polskiego Towarzystwa Chemicznego (Gdańsk, 14 XII 2019)
- 7. <u>Kafka A.</u>, Lipok J. Zdolności wybranych cyjanobakterii do wytwarzania egzopolisacharydów, Zjazd Zimowy Sekcji Studenckiej Polskiego Towarzystwa Chemicznego (Warszawa, 8 *XII 2019*)

Udział w realizacji grantów i projektów naukowych:

- 1. Wykonawca w grancie przyznanym przez Narodowe Centrum Nauki w ramach konkursu OPUS 14, pt. "Profilowanie fosforowe jako metoda oceny rozwoju organizmów w warunkach stresu fizjologicznego diagnostyka fosforomiczna" nr UMO-2017/27/B/NZ4/00698 (2019 2023);
- 2. Kierownik projektów finansowanych ze środków statutowych przyznanych Doktorantom Instytutu Chemii będącym Słuchaczami Szkoły Doktorskiej UO Wydziału Chemii (*2019, 2020, 2021, 2022, 2023, 2024*).

Warsztaty i szkolenia:

- 1. VII Akademia Chemii Analitycznej Zapewnienie Jakości Badań w Chromatografii Cieczowej Sprzężonej ze Spektrometrią Mas, Od przygotowania próbki przez optymalizację metod do analizy LCMS(/MS) (*28 31 V 2023*)
- 2. Dobra Praktyka Laboratoryjna zapewnienie jakości badań laboratoryjnych zgodnie z zasadami DPL (*2 II 2023*)
- 3. Food Quality Leader (IV IX 2022)
- 4. Auditor Wewnętrzny Systemu Zarządzania w Laboratorium wg normy PN-EN ISO/IEC 17025:2005 (*12-13 I 2018*)

Nagrody i wyróżnienia:

1. Nagroda Rektora Uniwersytetu Opolskiego dla doktorantów (2021/2022; 2022/2023; 2023/2024)

Inna działalność naukowa i popularyzująca naukę:

- 1. Opieka techniczna w realizacji projektu magisterskiego Pani Natalii Manowskiej, pt. "Wpływ jonów cynku (II) na metabolizm rzodkiewki", wykonanego w Katedrze Farmacji i Chemii Ekologicznej.
- 2. Opieka techniczna w realizacji projektu magisterskiego Pani Olgi Barteli, pt. "Wpływ jonów miedzi (II) na wybrane aspekty metabolizmu kiełkujących nasion rzodkiewki", wykonanego w Katedrze Chemii Analitycznej i Ekologicznej.
- 3. Opieka techniczna w realizacji projektu licencjackiego Pani Aleksandry Rudyk, pt. "Wpływ światła UV na wybrane aspekty metabolizmu kiełkujących nasion rzodkiewki", wykonanego w Katedrze Chemii Analitycznej i Ekologicznej.
- 4. Opieka techniczna w realizacji projektu magisterskiego w ramach wymiany Erasmus+ Pana Arno Denolf, pt. "Effect of fungicide on phosphorus levels during cucumber germination"
- 5. Opieka techniczna w realizacji projektu magisterskiego w ramach wymiany Erasmus+ Pani Karen Praet, pt. "Determination of phosphorus profiles in sunflower seeds", wykonanego w Katedrze Chemii Analitycznej i Ekologicznej.
- 6. Członkostwo w Polskim Towarzystwie Chemicznym
- 7. Członkostwo w European Chemical Society
- 8. Organizacja zajęć prowadzonych w ramach Szkoły Letniej UO (2021, 2022)
- 9. Organizacja pokazów i warsztatów prowadzonych w ramach Opolskiego Festiwalu Nauki (2019, 2022, 2023)

10. Organizacja i prowadzenie kilkunastu zajęć dla młodzieży szkolnej, odbywających się na Wydziale Chemii UO (2019-2022)

Inna działalność:

- 1. Organizacja XX Ogólnopolskiego Seminarium dla Doktorantów i Studentów "Na Pograniczu Chemii, Biologii i Farmacjii" (Jarnołtówek, 26-29 V 2024)
- 2. Organizacja konferencji "Zjazd Zimowy Sekcji Młodych Polskiego Towarzystwa Chemicznego" (Opole, *10 XII 2022*)
- 3. Pomoc przy organizacji wydarzenia "Szkoła Letnia Uniwersytetu Opolskiego" (*VI VII 2022*)
- 4. Współpraca przy organizacji konferencji naukowej Quo Vadis Life Science (Opole, *23-27 VI* 2021)
- 5. Zastępca Przewodniczącego Samorządu Doktorantów Uniwersytetu Opolskiego (2022 2023)