

Streszczenie rozprawy doktorskiej pt. „Zastosowanie badań fosforomicznych w ocenie kondycji roślin”

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 istotną rolę odegrała spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego – technika ^{31}P 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 katabolicznych 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. Rezultaty te mogą znacząco

poszerzyć możliwości prowadzenia badań 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 ^{31}P NMR do badania metabolomu fosforowego, uzupełnione określeniem statusu energetycznego organizmu na podstawie adenyłowego ładunku energetycznego, umożliwia stworzenie dynamicznych profili fosforowych 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)